

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

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO CATALÍTICO DE
COMPLEXOS MIMÉTICOS DAS ENZIMAS NITRITO
REDUTASE E ANIDRASE CARBÔNICA

Millena Pereira Ferreira*

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS,
área de concentração: QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientadora: Prof. Dra. Caterina Gruenwaldt Cunha Marques Netto.

Coorientador: Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha

***Bolsista Capes**

São Carlos – SP

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Millena Pereira Ferreira, realizada em 30/03/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Adriana Curi Aiub Casagrande (UFRGS)

Profa. Dra. Anamaria Dias Pereira Alexiou (Mackenzie)

Prof. Dr. Henrique Eisi Toma (USP)

Prof. Dr. Elton Fabiano Sitta (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico este trabalho à minha mãe,
minha maior incentivadora de sempre.

“Só num mundo de cegos as coisas
serão como verdadeiramente o são.”

José Saramago

Agradecimentos

À prof. Dra. Caterina G. C. M Netto, pela orientação, confiança e dedicação para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista pelo laboratório compartilhado com nosso grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento do Instituto de Física da USP, pela disponibilidade e colaboração nas medidas de EPR.

À prof. Dra. Daniela Ramos Truzzi (IQ-USP- São Paulo) pela colaboração e por me receber em seu laboratório para a realização das medidas de *stopped-flow*.

Ao prof. Dr. Antoine Simonneau (LCC-CNRS, Université de Toulouse) pela colaboração com as medidas de espectrometria de massas, bem como seu conhecimento compartilhado.

Ao Dr. João Honorato pelas medidas de difração de raios-X.

À minha família pelo carinho e apoio, especialmente à minha mãe por todo o incentivo, por acreditar em mim e nunca me deixar desanimar.

Ao meu companheiro Felipe Guedes que esteve presente nos momentos de tristeza e de felicidade e por sempre me fazer acreditar em mim.

A todos os amigos do grupo LaBMeeB e LERCI que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, pela amizade, ensinamentos, apoio nos momentos difíceis e os momentos de descontração.

À CAPES, pelo financiamento.

A todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho, meu muito obrigada!

Lista de Abreviaturas

CDCl_3 - Clorofórmio deuterado

$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ - Acetona deuterada

COSY- Espectroscopia de correlação homonuclear ^1H - ^1H

CuNiR- Nitrito redutase dependente de Cobre

EPR- Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

ESI-MS - Espectrometria de Massa de Ionização por *Electrospray*

FTIR- Infravermelho por transformada de Fourier

J- Constante de acoplamento

k_{cat} - Constante catalítica

K_{M} - Constante de Michaelis-Menten

$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ - Eficiência catalítica

PCET- Transferência de Elétrons Acoplada ao Próton

PTBA- Perclorato de tetrabutilamônio

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

MLCT- Transferência de carga metal – ligante

LMCT- Transferência de carga ligante – metal

LLCT- Transferência de carga ligante – ligante (intra-ligante)

TOF- Frequência de turnover (*Turnover frequency*)

UV-Vis- Ultravioleta-Visível

$V_{\text{máx}}$ - Velocidade máxima

V_0 - Velocidade inicial

V_{NO} - Velocidade de formação de óxido nítrico

Λm - Condutividade molar

δ - Deslocamento químico

Lista de Tabelas

TABELA 3.1- Valores de rendimento, cor dos sólidos e solubilidades dos complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+}	26
TABELA 4.1- Comprimentos de ligação (Å) e ângulos ($^{\circ}$) selecionados do complexo CuPTPh.....	37
TABELA 4.2- Tentativa de atribuição das bandas dos espectros de infravermelho dos ligantes e dos complexos.	41
TABELA 4.3- Valores de análise elementar e condutividade dos complexos... ..	42
TABELA 4.4– Tentativa de atribuição das bandas do espectro de UV-Vis e valores de absorvidade molar dos complexos e ligantes.	47
TABELA 4.5- Fragmentos de massas para os ligantes e complexos.	60
TABELA 4.6- Parâmetros de EPR dos complexos $[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$,	81
TABELA 4.7- Comparação dos potenciais de meia onda, de redução, dos valores de V_{max} , K_M , k_{cat} e eficiência catalítica dos complexos de Cobre.....	95

Lista de Figuras

FIGURA 1.1- Sítio ativo da Nitrito Redutase, variante AxNiR (A) e sítio T2Cu da variante Br ^{2D} NiR (B).	4
FIGURA 1.2- Mecanismo simplificado da redução do nitrito pela enzima CuNiR.....	5
FIGURA 1.3- Mecanismo de reação proposto para a redução do NO ₂ ⁻ na CuNiR.	6
FIGURA 1.4- Exemplos de complexos miméticos da enzima CuNiR.....	7
FIGURA 1.5- Esquema de reação de redução ou liberação de NO de uma espécie de Cu(I)-NO formada, com base nos potenciais de redução (E _R) dos complexos.....	9
FIGURA 1.6- Sítio ativo da anidrase carbônica. Resíduo hidrofílico em roxo e resíduo hidrofóbico em laranja, conduzindo a entrada do substrato entre os dois resíduos (A). Sítio ativo da Anidrase Carbônica.....	12
FIGURA 1.7-Mecanismo catalítico da enzima anidrase carbônica.....	13
FIGURA 1.8- Exemplos de complexos miméticos da enzima Anidrase Carbônica.....	14
FIGURA 2.1- Representação dos ligantes e complexos miméticos.	18
FIGURA 3.1- Esquema da síntese dos ligantes.	20
FIGURA 3.2- Estrutura dos ligantes PTPh, PTB e PTP.....	23
FIGURA 3.3- Estrutura dos complexos de Cu ²⁺ e Zn ²⁺	25
FIGURA 3.4- Ilustração do sistema de geração e detecção de NO.	30
FIGURA 4.1- Estrutura cristalina e atribuições das numerações para os átomos do ligante PTB.....	35
FIGURA 4.2- Estrutura cristalina do complexo CuPTPh.....	36
FIGURA 4.3- Espectro de Infravermelho dos ligantes em pastilha de KBr.....	38
FIGURA 4.4- Comparação dos espectros de infravermelho do ligante PTPh e dos complexos CuPTPh e ZnPTPh.	39

FIGURA 4.5- Espectros de Infravermelho dos complexos de Zn^{2+} e Cu^{2+} em pastilha de KBr.....	40
FIGURA 4.6- Espectro de UV-Vis do complexo CuPTPh em metanol.....	43
FIGURA 4.7- Espectro de UV-Vis do complexo CuPTB em metanol.	44
FIGURA 4.8- Espectro de UV-Vis do complexo CuPTP em metanol.....	44
FIGURA 4.9- Espectro de UV-Vis do complexo ZnPTPh em metanol.....	46
FIGURA 4.10- Espectro de UV-Vis do complexo ZnPTB em metanol.....	46
FIGURA 4.11- Espectro de UV-Vis do complexo ZnPTP em metanol.....	47
FIGURA 4.12- Espectros de EPR dos complexos de Cu^{2+} em metanol em temperatura ambiente 298 K (esquerda) e em N_2 líquido 77 K (direita).	48
FIGURA 4.13- Espectro de EPR e primeira derivada do complexo CuPTP (preto) em metanol, medidos em temperatura de nitrogênio líquido (77 K). As linhas vermelhas são simulações usando 3 nitrogênios ligados ao íon Cu^{2+}	49
FIGURA 4.14- RMN 1H do ligante PTPh e do complexo ZnPTPh.	51
FIGURA 4.15- RMN ^{13}C e DEPT 135 do complexo ZnPTPh.	52
FIGURA 4.16- RMN 1H do ligante PTB e do complexo ZnPTB.	53
FIGURA 4.17- RMN ^{13}C e DEPT 135 do complexo ZnPTB.....	54
FIGURA 4.18- RMN 1H do ligante PTP e do complexo ZnPTP.	55
FIGURA 4.19- RMN ^{13}C e DEPT 135 do complexo ZnPTP.	56
FIGURA 4.20- Voltametria cíclica da solução 1mmol.L^{-1} dos complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP em metanol contendo PTBA $0,1\text{ mol.L}^{-1}$. Velocidade de varredura= 100mV/s	57
FIGURA 4.21- Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura para o eletrodo de carbono vítreo na presença do íon complexo CuPTPh (esquerda) e gráfico de i_p versus $v^{1/2}$ (direita).	58
FIGURA 4.22- Espectro de massas do ligante PTPh.....	60
FIGURA 4.23- Espectro de massas do ligante PTB.	61
FIGURA 4.24- Espectro de massas do ligante PTP.....	61
FIGURA 4.25- Espectro de massas do complexo CuPTPh.....	63

FIGURA 4.26- Espectro de massas do complexo CuPTB.	63
FIGURA 4.27- Espectro de massas do complexo CuPTP.....	64
FIGURA 4.28- Espectro de massas do complexo ZnPTPh.	65
FIGURA 4.29- Espectro de massas do complexo ZnPTB.....	66
FIGURA 4.30- Foto das soluções do CuPTPh com e sem o nitrito.	67
FIGURA 4.31- Mudanças espectrais durante a titulação do complexo CuPTPh 1,2 mM ($\mu=0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ PTBA) com nitrito em metanol. Gráfico da concentração do nitrito vs absorvância em 373nm.	68
FIGURA 4.32- Modos mais comuns de coordenação do nitrito.	69
FIGURA 4.33- Espectros de infravermelho dos complexos de CuPTB (verde) e CuPTB + NO_2^- (preto), em pastilha de KBr.....	70
FIGURA 4.34- Espectros de infravermelho dos complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP com nitrito coordenado, em pastilha de KBr.....	71
FIGURA 4.35- Espectros de EPR dos complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP com NO_2^- coordenado em metanol em temperatura ambiente 298 K (esquerda) de N_2 líquido 77 K (direita).....	72
FIGURA 4.36- Espectro de EPR e primeira derivada do complexo [Cu(PTP)(NO_2)](ClO_4) (preto) em metanol, medidos em temperatura de nitrogênio líquido (77 K). As linhas vermelhas são simulações usando 3 nitrogênios ligados ao íon Cu^{2+}	73
FIGURA 4.37- Espectro de UV-Vis do complexo CuPTPh e na presença de 100 eq. de ácido benzóico, na região de 400-800nm.	74
FIGURA 4.38- Mudança espectral do complexo CuPTPh, com adição de 1 eq. de nitrito, 1 e 100 eq. de ácido benzóico. O gráfico a direita é uma expansão da região de 400-800 nm.....	75
FIGURA 4.39- Infravermelho do complexo CuPTPh com nitrito, e após adição de ácido benzóico.	76
FIGURA 4.40- Esquema da protonação do nitrito coordenado e o equilíbrio entre as espécies em solução.	77

FIGURA 4.41– Comparação dos espectros de EPR dos complexos de cobre antes (A) e depois da adição de nitrito (B) e ácido benzóico (C).	78
FIGURA 4.42– Espectro de EPR dos complexos de cobre antes (A) e depois da adição de nitrito (B) e ácido benzóico (C).	78
FIGURA 4.43- Primeira derivada dos espectros de EPR do complexo CuPTB sobre temperatura ambiente (296K) antes (a) e depois (b) da adição de nitrito de sódio e com a adição de ácido benzóico (c) comparações com as simulações do meio de coordenação com 3 (linha azul) e 4 (linha vermelha) nitrogênios coordenados. Subtração entre os espectros simulados e experimental para o complexo $[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{NO}_2)]^+$ na presença e ausência do ácido benzóico são mostrados em (b') e (c'), respectivamente.....	80
FIGURA 4.44- Espectros de UV-Vis do complexo CuPTPh (preto) e adição de 1 eq. de ascorbato de sódio (vermelho) e adição de 1eq. de NO_2^- + 2 eq. de ácido benzóico (azul) em metanol (A) Segunda adição de ascorbato de sódio (vermelho) a mesma solução do complexo CuPTPh (pontilhado) e segunda adição de NO_2^- + ácido benzóico (azul) (B).....	82
FIGURA 4.45- Espectros de UV-Vis Stopped-Flow de uma solução 1mM do complexo CuPTB (A) CuPTPh (C) CuPTP e (E) e 50 eq. de ácido benzóico e subsequentes adições de nitrito em metanol a 10°C. A direita o gráfico de velocidade inicial vs a concentração de nitrito dos complexos CuPTB(B) CuPTPh(D) e CuPTP (F).....	84
FIGURA 4.46- Ilustração interação entre os complexos CuPTPh (A), CuPTB (B) e CuPTP (C) com nitrito e hidrônio.....	86
FIGURA 4.47- Espectro de UV-Vis do complexo $\text{Fe}[\text{EDTA}]^{2-}$ antes e após a coordenação com o NO.....	87
FIGURA 4.48- Gráfico da absorvância em 432 nm do complexo $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ de detecção de NO gerado pelos complexos de cobre.	88

FIGURA 4.49- Voltamogramas cíclicos dos complexos CuPTPh (A), CuPTB(B) e CuPTP(C) e adição de 50 eq. de NaNO ₂ em metanol contendo PTBA 0,1 mol.L ⁻¹	89
FIGURA 4.50- Voltametria cíclica dos complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP na presença de 50 eq. de NaNO ₂ e consequentes adições de ácido benzóico. Os experimentos foram realizados em metanol, usando 0,1 M de PTBA como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 50 mV/s.....	90
FIGURA 4.51- Ilustração da reação que ocorre na superfície do eletrodo.....	91
FIGURA 4.52- Espectro de UV-Vis do CoTPP e CoTPPNO em CH ₂ Cl ₂	92
FIGURA 4.53- Espectro de infravermelho do CoTPP e CoTPPNO em pastilha de KBr.	93
FIGURA 4.54- Voltametria cíclica dos complexos CuPTPh (A), CuPTB (B) e CuPTP(C) + 100 eq. de ácido benzóico e subseqüentes adições de NaNO ₂ . Em metanol contendo PTBA 0,1 mol.L ⁻¹	94
FIGURA 4.55- Gráfico da concentração de NO ₂ ⁻ vs V _{NO}	95
FIGURA 4.56- Mecanismo proposto para a redução do nitrito com complexos de cobre deste trabalho.	98
FIGURA 4.57- Ilustração do borbulhamento de gás CO ₂ na solução do complexo CuPTPh e foto da formação do precipitado após 1h.....	99
FIGURA 4.58- Espectro de Infravermelho do complexo ZnPTPh antes e após borbulhar CO ₂ . A direita, a expansão da região de 2000 a 1200 cm ⁻¹	100
FIGURA 4.59- Espectro de Infravermelho do complexo ZnPTB antes e após borbulhar CO ₂ . A direita, a expansão da região de 2000 a 1200 cm ⁻¹	100
FIGURA 4.60- Espectro de Infravermelho do complexo ZnPTP antes e após borbulhar CO ₂ . A direita, a expansão da região de 2000 a 1200 cm ⁻¹	101
FIGURA 4.61- Ilustração do modo de coordenação do bicarbonato nos complexos de Zn ²⁺	102
FIGURA 4.62- Gráfico da absorvância da banda com λ _{máx} em 626 nm do indicador azul de bromotimol vs tempo.....	103

FIGURA 4.63-Ilustração do complexo ZnPTP com o grupo n-propanol atuando na desprotonação da água coordenada.	104
FIGURA 4.64- Gráfico das massas de CaCO ₃ após a reação de hidratação dos complexos de Zn ²⁺	105
FIGURA 4.65- Ilustração dos complexos de zinco na presença de excesso de íons Cl ⁻	106

Resumo

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO CATALÍTICO DE COMPLEXOS MIMÉTICOS DAS ENZIMAS NITRITO REDUTASE E ANIDRASE CARBÔNICA. As metaloenzimas são eficientes catalisadores biológicos e inspiram a criação de compostos de coordenação que mimetizam seu sítio ativo. Neste trabalho, os complexos sintetizados foram inspirados em duas enzimas: a Nitrito Redutase contendo Cobre (Cu-NiRs), que catalisa a redução do nitrito para óxido nítrico, e a Anidrase Carbônica, que contém zinco no seu sítio ativo, e atua nos processos de transporte da hidratação do CO₂. Essas enzimas contêm o sítio ativo com o mesmo ambiente de coordenação “NNN”. Para obter um mimético com característica similar foram sintetizados três novos ligantes tridentados. Os ligantes são baseados em triazol, prolina e piridina, diferindo-se pelos grupos substituintes fenil, *n*-butil e *n*-propanol. Esses ligantes deram origem a três complexos de Cu²⁺ e três complexos de Zn²⁺ miméticos das enzimas Cu-NiRs e Anidrase Carbônica, respectivamente. Todos os complexos foram caracterizados por análise elementar, FTIR, condutividade e espectroscopia UV-Vis. Os complexos de cobre também foram analisados por EPR, enquanto os complexos de zinco foram estudados por espectroscopia de RMN. As análises de caracterização indicam que os ligantes tridentados se coordenam aos metais Cu²⁺ e Zn²⁺, formando estruturas pentacoordenadas sendo que duas moléculas de água completam a esfera de coordenação. Para ambas as classes de miméticos observou-se que as atividades catalíticas foram dependentes dos diferentes grupos substituintes dos ligantes. Nos testes catalíticos com os complexos de cobre, foi observado que o NO₂⁻ coordena-se na forma bidentada. As análises de EPR e UV-Vis indicam que após a adição de ácido benzóico, o modo de coordenação do nitrito muda de κ²-ONO para κ¹-NO₂. Os três complexos foram capazes de reduzir o nitrito a NO. A redução foi realizada usando ascorbato de sódio ou por eletrocatalise. Em ambas as metodologias, o catalisador mais eficiente foi o que continha o grupo *n*-propanol na segunda esfera de coordenação, capaz de

transferir prótons em um mecanismo de transferência de elétrons acoplado a prótons. Os ensaios catalíticos com os complexos de zinco mostram que os três complexos foram eficientes para a fixação do CO_2 e geração do íon bicarbonato. O complexo com o substituinte *n*-propanol apresentou mais rápida formação de bicarbonato, devido seu grupo OH ajudar na etapa de desprotonação da água coordenada. Portanto, os complexos mostraram-se bons catalisadores miméticos das enzimas.

Palavras-Chave: Complexos miméticos, Nitrito Redutase, Geração de NO, Anidrase Carbônica, Complexos de cobre, Hidratação do CO_2 .

Abstract

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CATALYTIC STUDY OF MIMETIC COMPLEXES OF NITRITE REDUCTASE AND CARBONIC ANHYDRASE ENZYMES. Metalloenzymes are efficient biological catalysts that inspire the creation of coordination compounds that mimic their active site. In this work, the synthesized complexes were inspired by two enzymes: Nitrite Reductase containing Copper (Cu-NiRs) and Carbonic Anhydrase. CuNiRs catalyze the nitrite reduction to nitric oxide, whereas the enzyme Carbonic Anhydrase, acts on the hydration of CO₂. Both of these enzymes contain the active site with the same binding environment “NNN”. Therefore, three new tridentate ligands were synthesized, which differ among them by the phenyl, *n*-butyl and *n*-propanol substituent groups. These ligands gave rise to the three Cu²⁺ complexes and three Zn²⁺ complexes mimetic of the Cu-NiRs and carbonic anhydrase enzymes, respectively. All complexes were characterized by microanalysis, FTIR, conductivity and UV-Vis spectroscopy. The copper complexes were also analyzed by EPR, whereas the zinc complexes were studied by NMR spectroscopy. Both classes of complex, Cu²⁺ and Zn²⁺, have the tridentate ligands coordinated to the metals forming pentacoordinate structures with two water molecules completing the coordination sphere. The catalytic activities were dependent on the different substituent groups of the ligands. In the catalytic tests with the copper complexes, it was observed that the NO₂⁻ coordinates in the bidentate form. After the addition of benzoic acid, EPR and UV-Vis spectroscopies indicate that the nitrite changes the coordination mode from κ²-ONO to κ¹-NO₂. Although all three copper complexes were able to reduce nitrite to NO both chemically and electrocatalytically, the most efficient catalyst was the one containing the *n*-propanol group in the second coordination sphere. Our analyses reveal that *n*-propanol is capable of transferring protons in a proton-coupled electron transfer mechanism, aiding the reaction. For the carbonic anhydrase catalysis, all complexes were also able to hydrate CO₂, and the complex

with the *n*-propanol substituents showed a faster bicarbonate formation because its OH group helps in the coordinated water deprotonation step. Therefore, the complexes proved to be good enzyme mimetic catalysts.

Keywords: Mimetic complexes, Nitrite Reductase, NO generation, Carbonic Anhydrase, Copper complexes, CO₂ hydration.

Sumário

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Enzima Nitrito Redutase e seus complexos biomiméticos.....	2
1.2- Enzima Anidrase Carbônica e seus complexos biomiméticos.	11
1.3- Proposta de compostos miméticos inspirados	16
2- OBJETIVOS.....	18
3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	20
3.1- Sínteses Orgânicas	20
3.1.1 Síntese dos compostos prolinato de metila (1) e prolinato (piridin-2-il- metil) de metila (2)	20
3.1.2- Síntese do difenil(1-(piridin-2-il-metil) pirrolidin-2-il) metanol (3) ..	21
3.1.3- Síntese do 2-((2-(azidodifenilmetil)pirrolidin-1-il)metil)piridina(4)..	22
3.1.4- Síntese dos ligantes PTPH, PTB e PTP.	23
3.2 Sínteses Inorgânicas	25
3.2.1- Procedimento geral para a síntese dos complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+}	25
3.3- Caracterizações e Aplicações.....	26
3.3.1- Difração de raios-X	26
3.3.2- Espectroscopia na Região do Infravermelho	26
3.3.3- Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)	27
3.3.4- Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	27
3.3.5- Análise elementar	28
3.3.6- Medidas de Condutividade.....	28

3.3.7- Medidas eletroquímicas	28
3.3.8- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	29
3.3.9- Espectrometria de Massas	29
3.3.10- Redução dos complexos de Cu^{2+} com ascorbato de sódio.....	30
3.3.11- Geração de NO a partir do NO_2^-	30
3.3.12- Síntese do H_2TPP e CoTPP para detecção de NO.	31
3.3.13- Determinação de k_{cat} e K_M a partir de experimentos de eletrorredução.	32
3.3.14- Medidas espectroscópicas: <i>stopped-flow</i>	32
3.3.15- Reação de hidratação do CO_2	32
3.3.16- Reação de formação do CaCO_3	33
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1- Caracterização dos ligantes e dos complexos.	34
4.1.1- Difração de Raios-X.....	34
4.1.2- Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	37
4.1.3- Análise Elementar e Condutividade.....	42
4.1.4- Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis.	43
4.1.5- Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).	48
4.1.6- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	50
4.1.7- Voltametria Cíclica	56
4.1.8- Espectrometria de Massas	59
4.2- Atividade mimética nitrito redutase dos complexos de Cu^{2+}	66
4.2.1- Coordenação do nitrito	67
4.2.2 Influência da adição de ácido benzóico.....	73

4.2.3- Redução dos complexos de Cu^{2+} com ascorbato de sódio.....	81
4.2.4- Reação de redução química do nitrito.....	86
4.2.5- Redução eletroquímica dos complexos de Cu^{2+} para redução do NO_2^-	88
4.2.6- Proposta do mecanismo catalítico dos complexos miméticos.	97
4.3- Atividade mimética anidrase carbônica dos complexos de Zn^{2+}	98
4.3.1 – Estudo de Fixação do CO_2	98
4.3.2 – Reação de hidratação do CO_2	102
4.3.3- Formação de CaCO_3	104
5- CONCLUSÃO.....	107

1- INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas que atuam acelerando a velocidade das reações químicas que ocorrem nos seres vivos. São catalisadores biológicos eficientes, pois possuem alta especificidade e seletividade nas reações que atuam.¹

Quando ocorre a presença de um metal no seu sítio ativo, são conhecidas por metaloenzimas. A alta eficiência enzimática tem inspirado a obtenção de compostos de coordenação. Esses compostos imitam o sítio ativo enzimático para a obtenção de informações sobre seu mecanismo ou também para acelerar reações pela diminuição da barreira de energia de ativação de alguns compostos.^{2,3}

Uma vantagem no estudo de complexos miméticos é a obtenção de catalisadores mais robustos que as enzimas, que possam atuar fora do meio biológico, já que as enzimas desnaturam em condições diferentes de temperatura, pressão ou solventes orgânicos, além de seu alto custo.²

Os complexos miméticos podem ser tanto estruturais quanto miméticos funcionais. Os miméticos estruturais se assemelham ao sítio ativo da enzima (mesmo metal e pontos de coordenação), podendo ter ou não atividade catalítica, os miméticos funcionais podem ser compostos diferentes ao sítio ativo da enzima, mas que necessariamente fazem o mesmo tipo de reação que a enzima.⁴

Além da primeira esfera de coordenação de uma metaloenzima, a segunda esfera de coordenação está associada à eficiência catalítica de um determinado catalisador, visto que as enzimas utilizam as interações secundárias para estabilizar estados de transição e diminuem a diferença de energia entre eles, catalisando uma determinada reação.⁵ Estas interações secundárias são caracterizadas pelos aminoácidos, os quais não estão diretamente envolvidos na coordenação do metal, porém são indispensáveis para a atividade catalítica. Suas funções são cumpridas por meio de interações não covalentes, como ligações de

hidrogênio, interações eletrostáticas, efeitos hidrofóbicos e forças de Van der Waals.⁵

Desta forma, a segunda esfera de coordenação da enzima também deve ser considerada para a obtenção de miméticos. Para que um mimético consiga modelar estas interações de uma enzima, faz-se necessário utilizar de ligantes multi-funcionais.⁶ Este tipo de ligante acopla a função de se coordenar a um sítio metálico e de exercer funções adicionais na estabilização de estados de transição ao mesmo tempo. Espera-se com isto, diminuir a barreira energética de reações catalisadas por modelos miméticos ao levar em consideração as interações secundárias de uma enzima, visto que as interações facilitadas pelas ligações de esfera secundárias auxiliam em reações comumente inacessíveis, como exemplo, pode-se citar a reação de redução do H^+ para H_2 , a qual pode ser auxiliada pelo uso de interações não covalentes.⁷ Portanto, tais ligantes podem ser responsáveis por melhorar a catálise de uma determinada reação.

As metaloenzimas que tem inspirado a obtenção de compostos biomiméticos no presente trabalho é a Nitrito Redutase contendo Cobre (Cu-NiRs), a qual catalisa a redução do nitrito para óxido nítrico, e a enzima Anidrase Carbônica que contém zinco no seu sítio ativo, e atua nos processos de transporte da hidratação do CO_2 . Os tópicos a seguir abordarão essas enzimas e os estudos envolvendo seus complexos miméticos.

1.1- Enzima Nitrito Redutase e seus complexos biomiméticos.

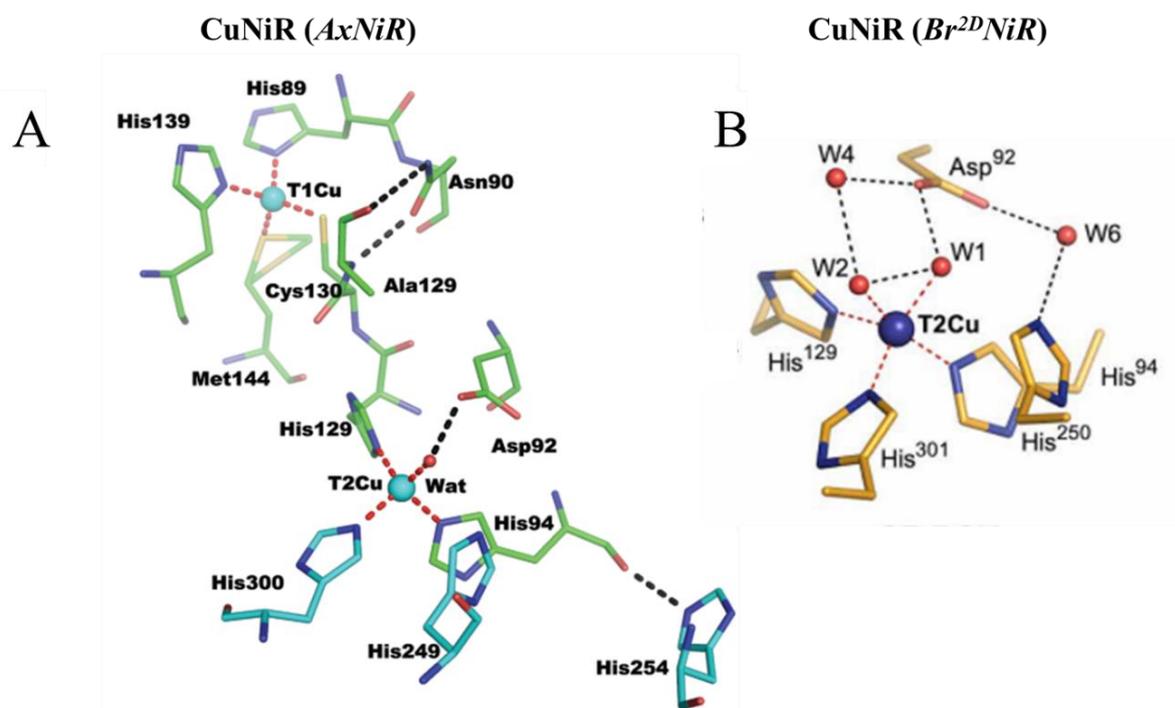
A Nitrito Redutase (NiR) é uma classe de enzima que está presente em bactérias e participa do ciclo do nitrogênio no processo de desnitrificação.⁸ Podem ser classificadas em duas classes, dependendo do seu sítio ativo. As NiR de classe I são enzimas dependentes de Cobre (CuNiRs), enquanto a classe II são enzimas de Ferro que contém o grupo heme no seu sítio ativo (cd1-NiR).⁹ A CuNiR é menos abundante que cd1-NiR, (cerca de três quartos de todos os NiRs são cd1-NiR). É encontrada em uma ampla gama de nichos ecológicos, incluindo

ambientes geotermicamente aquecidos. O mecanismo catalítico da cd1-NiR já é conhecido, enquanto o da CuNiR ainda não foi bem estabelecido e, portanto, essa enzima é o foco de muitas investigações em andamento.¹⁰

A CuNiR catalisa a redução de um elétron do nitrito (NO_2^-), na presença de dois prótons, para formação de óxido nítrico (NO), de acordo com a equação abaixo:



O sítio ativo das CuNiRs apresenta domínios bem conservados,¹¹ contendo Cu tipo 1 (T1Cu) e Cu tipo 2 (T2Cu), como ilustrado na Figura 1.1(A).¹² O sítio T1Cu recebe elétrons de proteínas fisiológicas doadoras de elétrons e transfere esses elétrons para T2Cu.¹³ Geralmente, o sítio T1Cu está coordenado por dois resíduos de histidina (His), uma metionina (Met) e um Cisteína (Cys). O resíduo Cys é ligado a His (coordenada ao T2Cu) para formar uma ponte Cys-His responsável pela rápida transferência de elétrons entre o T1Cu e T2Cu.¹⁴ O sítio T2Cu é responsável pela coordenação e ativação do nitrito. No estado de repouso, o centro catalítico T2Cu é encontrado no estado de oxidação Cu^{2+} e exibe uma geometria tetraédrica distorcida em uma esfera de coordenação primária, composta por três resíduos de histidina e uma molécula de água.¹⁴ Recentemente, foi descoberto que uma das variantes da enzima CuNiR, a $Br^{2D}NiR$ apresenta em seu sítio T2Cu catalítico duas moléculas de água coordenadas com uma geometria pirâmide de base quadrada (Figura 1.1B).¹⁵ Foi verificado uma atividade catalítica mais lenta dessa enzima quando comparado com os dois domínios mais bem estudados das subclasses $AxNiR$ e $AcNiR$.¹⁵ Essa diferença na atividade catalítica está relacionada à molécula de água adicional no sítio ativo da $Br^{2D}NiR$, que torna a coordenação do nitrito menos favorável energeticamente, devido à etapa inicial de substituição mais lenta do substrato por duas moléculas de água, com relação às outras variantes com uma molécula de água.

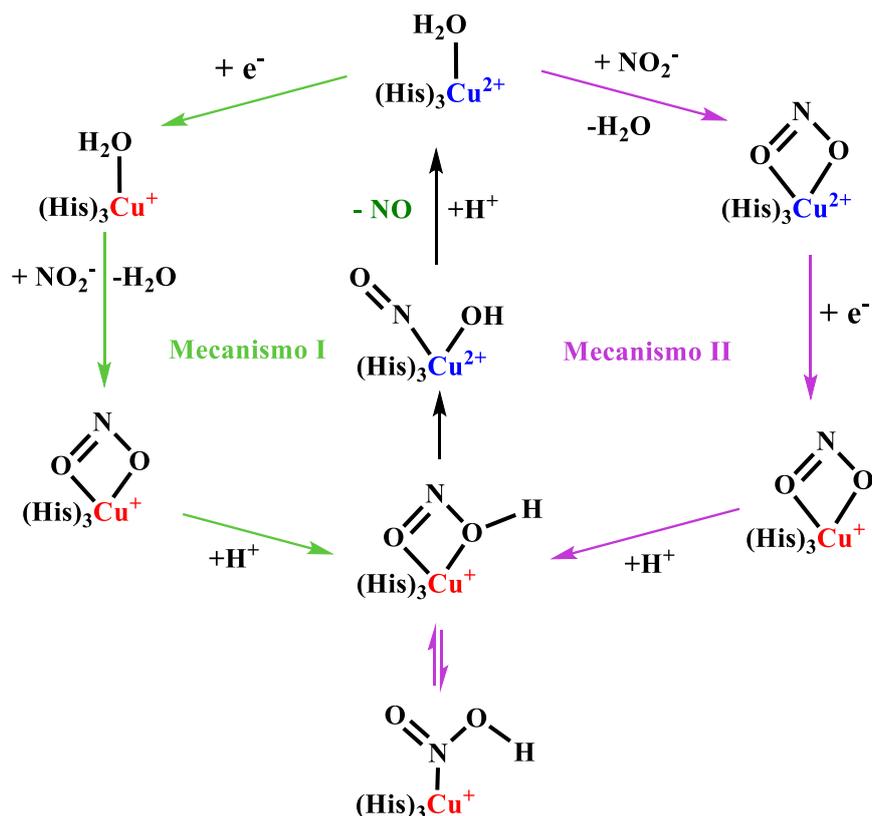


Fonte: Extraído de Leferink, (2011) e Rose, (2021).^{15,16}

FIGURA 1.1- Sítio ativo da Nitrito Redutase, variante *AxNiR* (A) e sítio T2Cu da variante *Br^{2D}NiR* (B).

Durante a catálise, o nitrito se liga ao local T2Cu substituindo a/as molécula(s) de água, e após uma redução acoplada a prótons, o óxido nítrico é liberado.¹⁶ Os intermediários dessa reação ainda são discutidos, sendo duas as principais rotas de mecanismo propostas.^{6,13} Um resumo dos dois mecanismos está ilustrado na Figura 1.2.

O mecanismo I foi proposto por AVERILL et al. (1994),¹⁸ que propõe que Cu^{2+} é primeiro reduzido a Cu^+ , em seguida ocorre a coordenação do NO_2^- formando $\text{Cu}^+\text{-NO}_2$. Esse intermediário foi proposto baseado em complexos de modelo de Cu^+ . Após a coordenação do substrato NO_2^- , ocorrem duas transferências de prótons consecutivas para gerar o intermediário $\text{Cu}^+\text{-NO}^+$, em ressonância com $\text{Cu}^{2+}\text{-NO}^0$, essa última espécie instável acaba liberando o NO (substituído por uma molécula de água), completando o sítio catalítico.



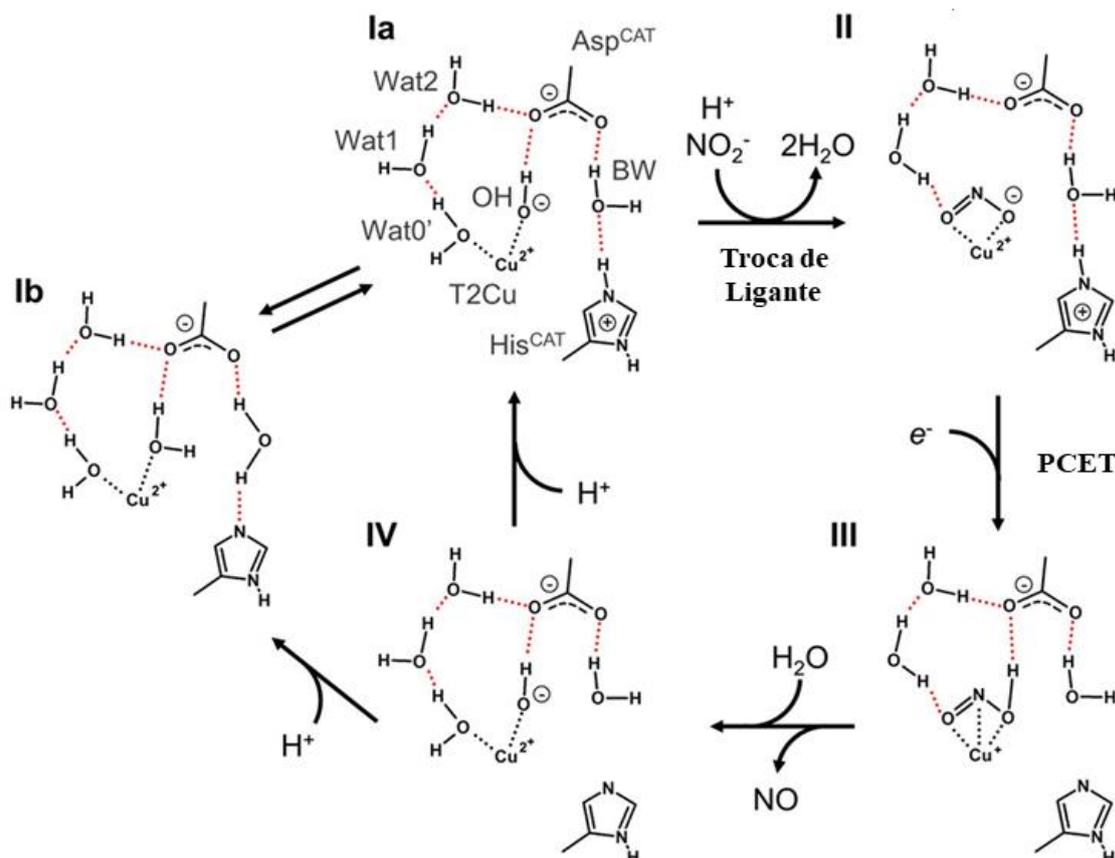
Fonte: Adaptado de Maji, (2013) e Zhang (2022)^{19,20}

FIGURA 1.2- Mecanismo simplificado da redução do nitrito pela enzima CuNiR.

O mecanismo II foi proposto por SUZUKI et al. (2000)²¹ que levaram em consideração a rede de ligação de hidrogênio próximo ao sítio ativo. Eles basearam sua proposta mecanística nas estruturas cristalinas das diferentes enzimas CuNiR ligadas ao NO_2^- ou NO. Nesse mecanismo, o NO_2^- liga-se ao sítio de Cu^{2+} oxidado pelos dois átomos de oxigênio ($\kappa^2\text{-ONO}$). Após a coordenação, o NO_2^- que está ligado ao cobre é reduzido para formar um complexo $\text{Cu}^+\text{-NO}_2$. Em seguida, o intermediário HONO é formado pela rede de ligações de hidrogênio, e rapidamente ocorre o rompimento da ligação OH-NO, liberando NO e formando o intermediário $\text{Cu}^{2+}\text{-OH}$. Este intermediário com a adição de um próton regenera o sítio. Posteriormente, HASNAIN et al. (2005)²² alteraram este mecanismo após a descoberta do modo de ligação do nitrito $\kappa^1\text{-NO}_2$. As duas

rotas são apoiadas por estudos cristalográficos e portanto, ainda não se sabe qual é a certa, então ambas são aceitas.²³

A catálise da CuNiR é um dos exemplos naturais de reações de transferência de elétrons acoplada a prótons (PCET), sendo assim importante considerar o papel da segunda esfera de coordenação.²⁴



Fonte: Adaptado de Fukuda, 2020¹³

FIGURA 1.3- Mecanismo de reação proposto para a redução do NO_2^- na CuNiR.

Existem dois resíduos catalíticos conservados na segunda esfera de coordenação do sítio T2Cu, aspartato (Asp^{CAT}) e Histidina (His^{CAT}), os quais auxiliam na transferência de prótons (PT) para o substrato. A Figura 1.3 ilustra o mecanismo de Haisnan, com os aminoácidos atuando no processo de transferência de prótons. Asp^{CAT} e His^{CAT} são ligados por uma molécula de água que é designada como água de transição (BW) e considerada como estando envolvida no transporte de prótons.¹³ O aspartato está próximo ao nitrito coordenado e funciona como uma barreira, controlando a passagem do substrato e guiando a

etapa de transferência de prótons para um dos oxigênios do nitrito.²⁵ Enzimas CuNiR com mutações no Asp98 e His255 mostram uma diminuição na velocidade de reação, constatando que esses resíduos são importantes para o funcionamento da enzima.²³

Complexos biomiméticos têm sido desenvolvidos para ajudar na compreensão do mecanismo da CuNiR, como também para a geração de óxido nítrico pela redução de nitrito.²⁶ A geração e liberação de óxido nítrico tem sido estudada devido ao grande interesse biológico desta molécula, por atuar em diversos processos biológicos importantes como neurotransmissão e vasodilatação.²⁷ O NO_2^- serve como uma estável reserva de óxido nítrico,²⁸ além disso sua remoção também é de grande interesse por ser um dos poluentes de águas.²⁹ Alguns exemplos de complexos que imitam o sítio catalítico T2Cu da CuNiR estão ilustrados na Figura 1.4.

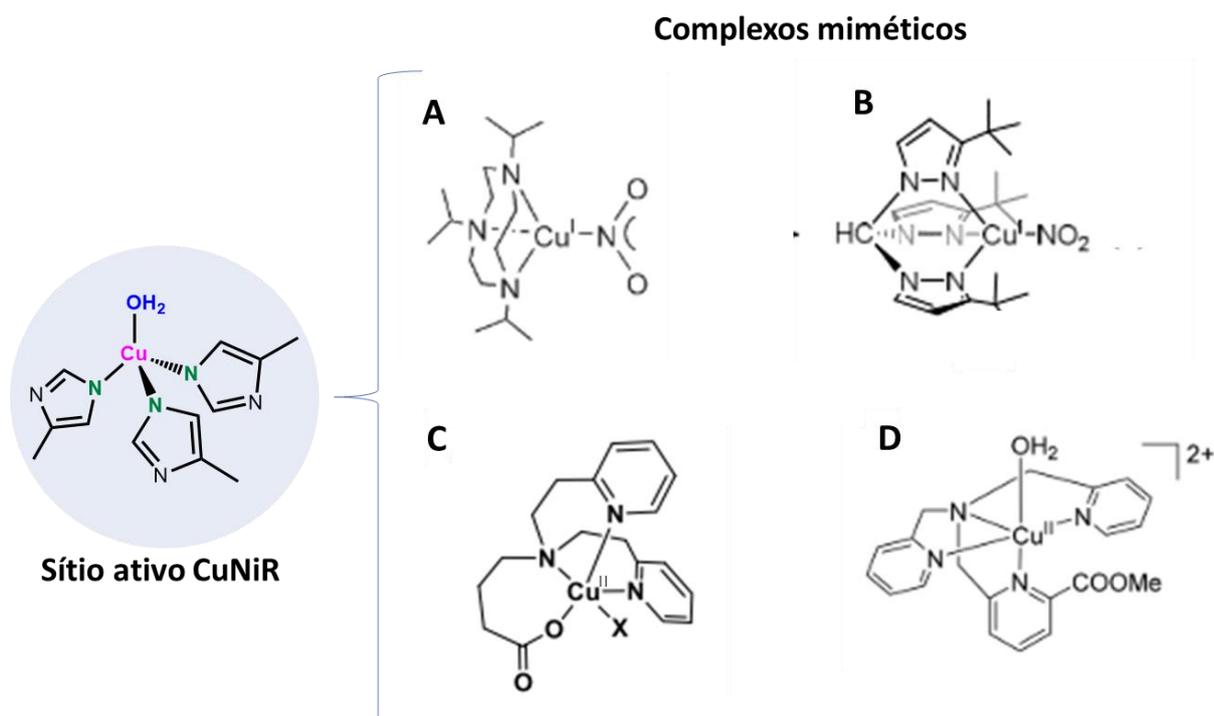


FIGURA 1.4- Exemplos de complexos miméticos da enzima CuNiR.

Os complexos miméticos da Figura 1.4A e B são compostos de Cu^+ coordenados por ligantes tridentados, formando um ambiente de ligação “NNN” semelhante à enzima. Os estudos envolvendo esses complexos, geralmente

mostram a reação estequiométrica do nitrito complexo ($\text{Cu}^+\text{-NO}_2$) para geração e liberação do NO pela adição de um ácido, formando o complexo de Cu^{2+} ao final da reação. São utilizados para identificar intermediários de reação.³⁰ O complexo da Figura 1.4A é um exemplo do primeiro complexo de Cu^+ mimético da CuNiR relatado por HALFEN et al. (1994).^{31,32}

Também foi estudado o efeito dos grupos substituintes dos ligantes na liberação de NO (Figura 1.4B).³³ Foi verificado que entre os complexos com ligantes contendo um grupo substituinte mais volumoso (*tert*-butila) apresentou menor atividade em relação aos substituintes menos volumosos (metil), devido aos efeitos estéricos que dificultam a coordenação do substrato. Compostos com ligantes que causam maiores efeitos estéricos podem proporcionar uma maior repulsão com o nitrito coordenado, levando à quebra da ligação $\text{Cu}^+\text{-NO}_2$.^{33,34} No entanto, complexos com ausência desses ligantes mais volumosos podem acarretar a formação de dímeros.³²

Uma desvantagem na utilização desses complexos de Cu^+ para os processos catalíticos é a sua instabilidade, pois mesmo sob atmosfera inerte pode ocorrer a reação de desproporção.¹⁹



Os complexos de Cu^{2+} , no entanto, são mais estáveis na presença de ar e podem ser reduzidos química³⁵ ou eletroquimicamente.³⁶

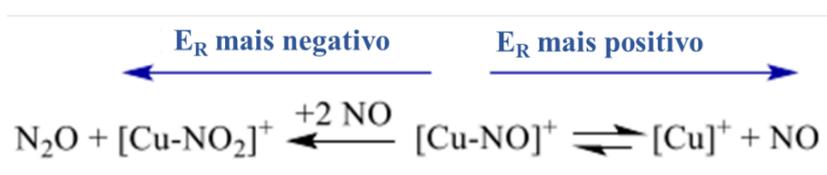


A redução eletrocatalítica de nitrito por complexos de Cu^{2+} foi descrita por HUNT et al. (2019)³⁷ (Figura 1.4C) onde a atividade eletrocatalítica de seis compostos diferentes foi avaliada. Neste trabalho foi observado que os compostos que apresentaram potenciais de redução na região mais negativa apresentaram maiores valores de TOF (*turnover frequency*). Entretanto, estes complexos foram menos eficientes para a geração de NO, pois reagiram também com o produto da catálise e formavam o gás N_2O (além de NO), como indicado

na Equação 4. A formação de N_2O é derivada da reação do NO produzido em uma segunda reação de oxidação.³⁸



Os composto de Cu^{2+} reduzidos na região mais negativa são espécies que reagem mais rapidamente com o NO, levando a uma formação de N_2O em comparação com complexos reduzidos na região mais positiva.³⁷ Desta forma verifica-se que os complexos com potencial de redução na região mais positiva (próximo a 0,1V vs Ag/AgCl) foram os catalisadores mais seletivos para a geração eletrocatalítica de NO (Figura 1.5).



Fonte: Adaptado de Andrew (2019)³⁷

FIGURA 1.5- Esquema de reação de redução ou liberação de NO de uma espécie de Cu(I)-NO formada, com base nos potenciais de redução (E_R) dos complexos.

De fato, o sítio T2Cu das enzimas CuNiR apresenta potenciais de redução na região positiva do voltamograma entre 230 e 305 mV.^{39,40}

No estudo realizado por CIONCOLONI et al. (2018),⁴¹ foi destacado o efeito da segunda esfera de coordenação na catálise. Dois complexos de Cu^{2+} foram sintetizados, um deles contendo ligante tetradentado, com um grupo carboxilato posicionado próximo ao nitrito coordenado (Figura 1.4 D), e outro complexo sem esse grupo. Eles demonstraram que o grupo carboxilato causou um aumento considerável na velocidade eletrocatalítica de redução de nitrito e contribuiu para reações de PCET na esfera de coordenação secundária do centro metálico. O complexo contendo o grupo carboxilato apresentou uma alta eficiência catalítica com valores de $k_{cat}/K_M = 1200 M^{-1} s^{-1}$ com relação ao

complexo sem esse grupo ($k_{\text{cat}}/K_M = 600 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), bem como de compostos já reportados.^{42,43} Comparativamente, estes valores ainda são baixos devido ao fato da enzima CuNiR de *Alcaligenes faecalis* alcançar um valor de $k_{\text{cat}}/K_M \approx 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁴⁴

Com base nos estudos mencionados, percebe-se a grande importância na escolha dos ligantes para a atividade catalítica dos compostos miméticos. Os ligantes polidentados são geralmente sintetizados para a obtenção de complexos miméticos, pois fornecem uma maior estabilidade ao centro metálico com relação a ligantes monodentados. Ligantes tridentados com pontos de coordenação “NNN” além de mimetizar as histidinas coordenadas ao Cu^{2+} no sítio CuT2 apresentam algumas vantagens comparados aos ligantes tetradentados. Esses ligantes tendem a formar complexos com o potencial de redução na região mais positiva, favorecendo a seletividade na redução do nitrito (como dito anteriormente). Também apresentam voltamogramas mais reversíveis, devido a uma maior flexibilidade do ligante no processo oxidação do Cu^{2+} , que após reduzido para Cu^+ pode existir preferencialmente com um meio de coordenação tetraédrico.⁴⁵ Compostos com ligantes tetradentados ao serem reduzidos para Cu^+ podem ter sua estrutura modificada, como a quebra de ligação de um dos pontos de coordenação com o metal e sofrer algum rearranjo, tornando a estrutura diferente da inicial e processos redox mais irreversíveis.⁴⁵ A coordenação do nitrito também é mais favorável para complexos com ligantes tridentados, enquanto os ligantes tetradentados ocupam mais um sítio de coordenação, o que poderia diminuir a afinidade pelo ligante nitrito.⁴⁶

Os estudos descritos acima fornecem informações valiosas para a construção de compostos miméticos da enzima CuNiR, visando uma melhor atividade catalítica para a redução do nitrito e geração de óxido nítrico.

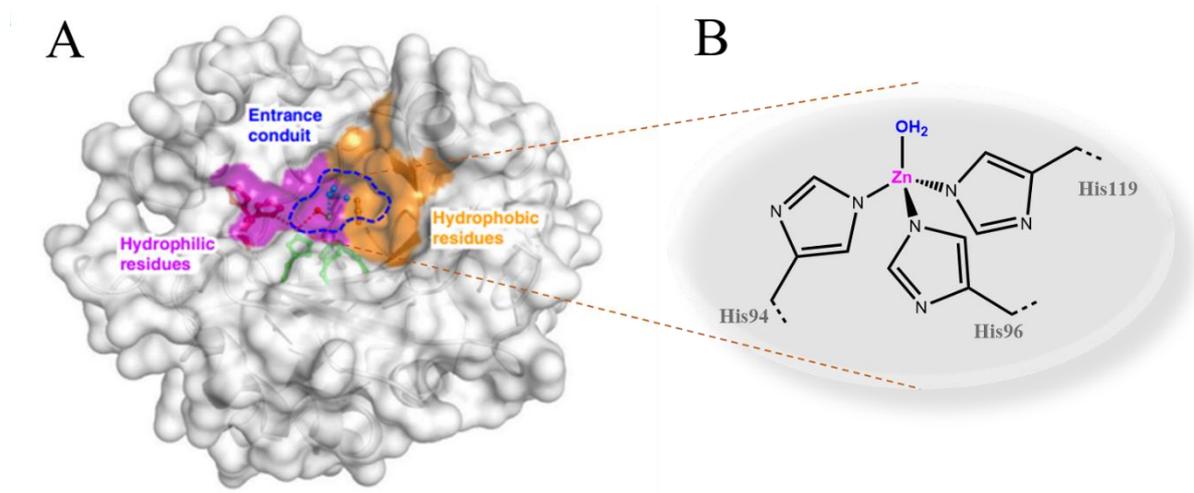
1.2- Enzima Anidrase Carbônica e seus complexos biomiméticos.

A anidrase carbônica é uma enzima pertencente à uma família de metaloenzimas que pode ser encontrada em animais, plantas, algumas bactérias e vírus.^{47,48} Essa enzima apresenta uma ampla faixa de estabilidade de pH (3-10).^{49,50} Sua principal função é catalisar reversivelmente a reação de hidratação do CO₂ e desidratação do bicarbonato, dependendo do pH do meio (Equação 5). A hidratação do CO₂ é dominante acima do pH 7, abaixo desse valor, ocorre a desidratação do bicarbonato.⁵¹



É uma das enzimas mais eficientes que existem, considerada uma das mais rápidas encontradas na natureza, que alcançam uma velocidade de reação da ordem de 10⁶ s⁻¹ para a hidratação do CO₂.⁵²

A atividade catalítica da anidrase carbônica acontece no sítio ativo dessa enzima, que fica em uma região envolta por um bolso em torno do sítio ativo (Figura 1.6). Essa região é composta por uma parte hidrofóbica que promove a entrada do substrato (ligação do CO₂) facilitando sua chegada ao sítio ativo, bem como a saída do bicarbonato pela fraca interação com o bolso hidrofóbico.⁵³ A outra região é a região hidrofílica, responsável pela transferência de prótons. Entre essas duas regiões fica o sítio catalítico (Figura 1.6A).⁵³ O sítio catalítico é composto por um átomo de Zn²⁺ coordenado a três resíduos de histidinas (His 94, His 96 e His 119) e uma molécula de água, determinando uma geometria tetraédrica distorcida em torno do metal (Figura 1.6B).⁵⁴



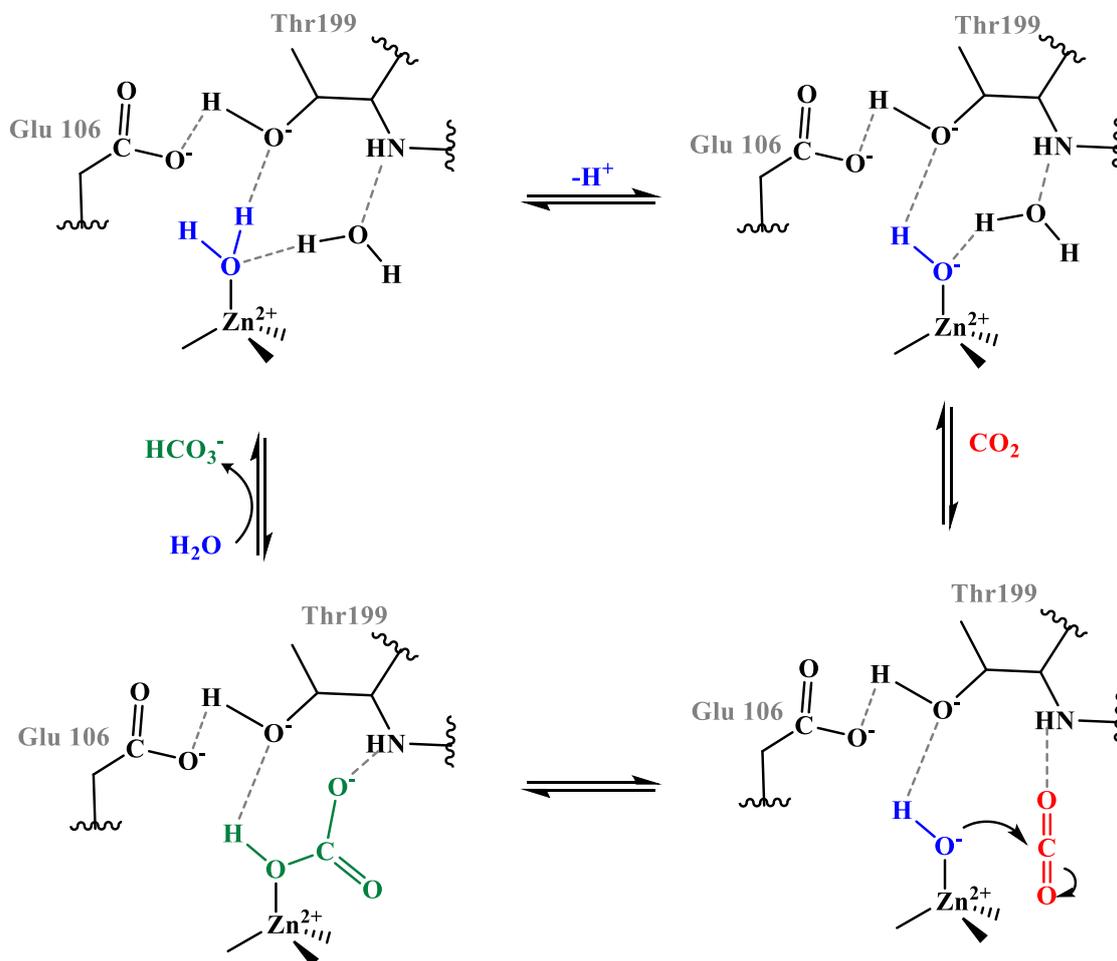
Fonte: Adaptado de Song, (2012) ⁵³

FIGURA 1.6- Sítio ativo da anidrase carbônica. Resíduo hidrofílico em roxo e resíduo hidrofóbico em laranja, conduzindo a entrada do substrato entre os dois resíduos (A). Sítio ativo da Anidrase Carbônica.

O mecanismo de hidratação do CO_2 pela Anidrase Carbônica já é bem estabelecido (Figura 1.7).⁵⁰ Sabe-se que ocorre em três etapas: na primeira etapa, a molécula de água coordenada ao Zn^{+2} que tem um $\text{pK}_a \sim 7$, é desprotonada, formando o hidróxido (essa etapa é considerada a etapa determinante da reação). Na segunda etapa ocorre um ataque nucleofílico do oxigênio do hidróxido ao carbono do CO_2 , formando o intermediário bicarbonato $[(\text{His})_3\text{Zn-OCO}_2\text{H}]$. Na terceira etapa, o HCO_3^- é então substituído por uma molécula de H_2O para liberar bicarbonato. Então o sítio ativo retorna a sua forma inicial, completando o ciclo catalítico.⁵⁵

O íon Zn^{2+} tem papel fundamental na atividade catalítica, pois confere uma maior acidez a água coordenada, diminuindo o pK_a em comparação com a água livre, promovendo a formação do hidróxido em pH fisiológico.⁵⁶ Nesta etapa, a segunda esfera de coordenação tem elevada importância, visto que o aminoácido treonina (Thr-199) interage por ligações fracas com a molécula de água coordenada. Quando a Glutamina (Glu106) é ionizada, atua como um

acceptor de prótons na ligação de hidrogênio com a Thr-199. Consequentemente, o grupo hidroxil da Thr-199 pode aceitar um átomo de hidrogênio da molécula de água coordenada, formando o hidróxido (primeira etapa da catálise).⁵⁰



Fonte: Adaptado de Kim, (2020)⁵³

FIGURA 1.7-Mecanismo catalítico da enzima anidrase carbônica.

A inspiração na Anidrase carbônica para a síntese de novos compostos miméticos, proporciona a obtenção de compostos que possam atuar no processo de reciclagem do CO_2 . Esse processo visa a utilização do CO_2 , que é um poluente atmosférico e um dos principais gases do efeito estufa, para a obtenção e síntese de novos produtos químicos.⁵⁷ Após a formação de bicarbonato por catalisadores miméticos da anidrase carbônica, este pode ser facilmente precipitado como $CaCO_3$ que é utilizado na indústria na produção de vidros, sabões.⁵⁸⁻⁶⁰

Para o desenvolvimento dos compostos miméticos geralmente o foco é a obtenção de complexos com o sítio catalítico semelhante à enzima preservando suas características como (1) geometria tetraédrica em torno de um átomo de Zn^{2+} coordenado por três átomos de nitrogênio, e uma molécula de água com $pK_a \sim 7$ e (2) atividade catalítica de hidratação do CO_2 e desidratação do HCO_3^- . Na Figura 1.8 estão ilustrados alguns compostos de coordenação de zinco miméticos da anidrase carbônica relatados na literatura e suas contribuições para o conhecimento e desenvolvimento dos catalisadores.

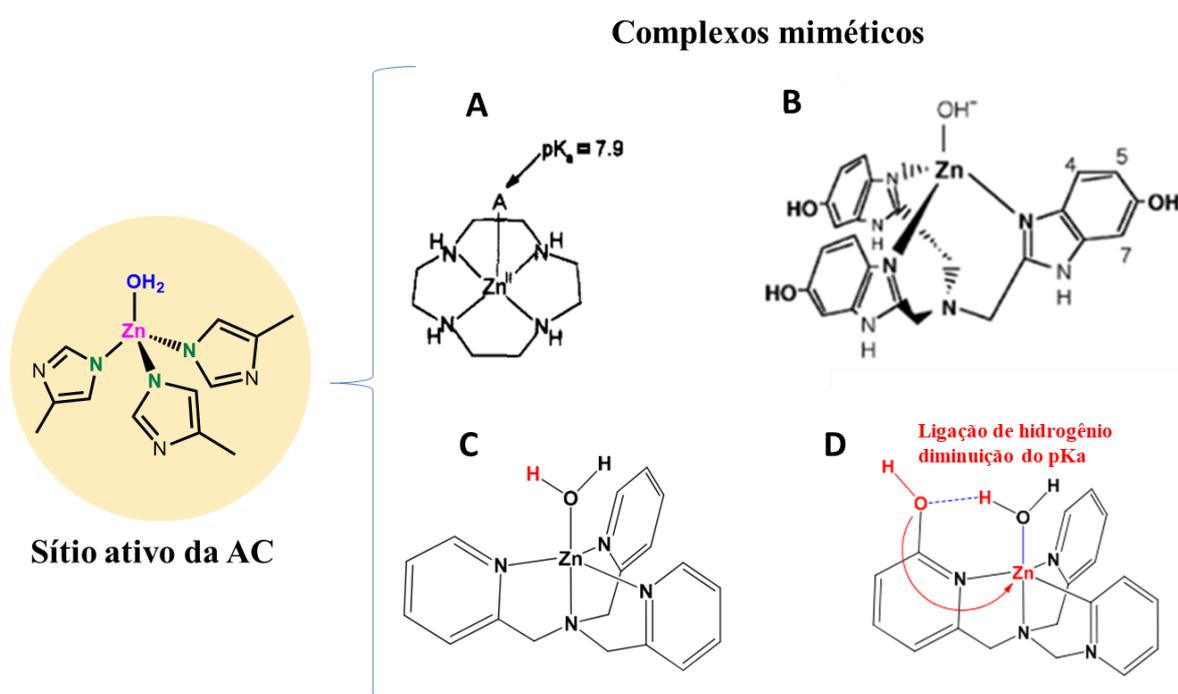


FIGURA 1.8- Exemplos de complexos miméticos da enzima Anidrase Carbônica.

O complexo da Figura 1.8A⁶¹ tem uma estrutura simples, com o ligante tetra-coordenado ao Zn^{2+} e uma molécula de água ocupando a 5ª posição com um $pK_a = 7,9$. Apesar de sua estrutura bastante simples e diferente do sítio ativo da enzima, esse complexo apresenta uma alta habilidade catalítica tanto para reação de hidratação ($3300 \pm 100 M^{-1} s^{-1}$), quanto para a desidratação ($51 \pm 8 M^{-1} s^{-1}$), sendo que sua atividade alcançou um valor de até um terço da enzima nativa.⁶² Esse fato foi relacionado a alta constante de estabilidade do ligante

tertracoordenado, tornando a molécula de água coordenada mais lábil, que resulta em uma maior nucleofilicidade do ligante hidroxil coordenado. Outro fator importante para a atividade catalítica deste composto é o modo de coordenação do bicarbonato, que em complexos semelhantes,⁵¹ porém com geometria tetraédrica (ligante tridentado), o bicarbonato pode se coordenar na forma bidentada, tornando mais lenta sua saída da esfera de coordenação, ou inibir⁶³ o catalisador. No complexo da Figura 1.8A foi sugerido que o bicarbonato se coordena monodentado, o que torna a sua saída mais rápida. Esse complexo, no entanto, tem ainda seu sítio ativo diferente da enzima, e na estrutura do ligante não contém uma região hidrofóbica, que é uma importante característica da enzima. Essa região hidrofóbica permite uma pré-associação eficaz de CO₂, próximo ao local da reação e uma liberação mais rápida do HCO₃⁻ formado no sítio ativo, devido à interação significativamente mais fraca com a região hidrofóbica.⁵¹

No trabalho publicado por ECHIZEN et al. (2004)⁶⁴ foi sintetizado o complexo da Figura 1.8B, com o ligante tridentado contendo os grupos imidazol condensados ao anel aromático formando o bolso hidrofóbico em torno do metal. Foi observado por RMN ¹³C os sinais do bicarbonato ligado ao complexo, e do bicarbonato livre em DMSO-D₆. Nesse estudo, foi observado que os grupos substituintes OH na região mais externa do complexo poderiam interagir com as moléculas de água do meio, permitindo uma maior proximidade destas ao íon Zn²⁺ do complexo.⁶⁴

O complexo da Figura 1.8C foi sintetizado por LEE et al. (2019)⁶⁵ e posteriormente, eles sintetizaram o complexo da Figura 1.8D, onde demonstraram a importância da segunda esfera de coordenação.⁶⁶ Os ligantes desses compostos que contém as piridinas, conferem uma melhor solubilidade em meio aquoso. A diferença entre os complexos C e D é a presença do substituinte hidróxido (Figura 1.8D). Foi observado que o complexo sem o substituinte apresentou um valor de pK_a=8, enquanto na presença do grupo hidróxido o valor de pK_a diminuiu para

6,8. O grupo hidróxido interage com a molécula de água, facilitado a sua desprotonação, ou seja, confere uma maior acidez a molécula de água coordenada. Este substituinte, no entanto, mimetiza o aminoácido treonina no sitio catalítico da enzima. Como foi observado anteriormente, só a diminuição do pK_a da água coordenada, não é o único fator que pode fornecer uma melhor atividade ao complexo.⁶⁵ Eles observaram também que a habilidade doadora de densidade eletrônica do substituinte hidróxido, diminuiu a acidez de Zn^{2+} , resultando na formação de ligações fracas com o bicarbonato, proporcionando um aumento na taxa de substituição das moléculas de água.⁶⁶

Com base nesses dados, observa-se que a escolha do ligante é muito importante para a formação e atividade do complexo mimético. Um ligante mais volumoso pode fornecer um ambiente mais hidrofóbico, formando um “bolso” em torno do metal favorecendo um ambiente com efeitos estéricos que permitem uma maior acidez da água, uma mais rápida troca do bicarbonato e conseqüentemente impede a formação de compostos bi e tri nucleares durante a formação do bicarbonato, o que poderia inibir o processo catalítico.⁶⁷ Também deve-se levar em conta que uma parte da molécula deve ser mais solúvel em meio aquoso, o que pode ser preferível para um ligante mais assimétrico, para que não impeça a entrada da água, e também para que tenha a solubilidade necessária em meio aquoso possibilitando os estudos catalíticos em meio aquoso.⁶³

A obtenção de um composto de coordenação que imite as características complexas da enzima é um grande desafio que se alcançado pode ser e grande contribuição científica para a obtenção de moléculas catalíticas eficientes e mais simples que a enzima nativa.

1.3- Proposta de compostos miméticos inspirados

Com base nos estudos já publicados, desenhou-se novos ligantes e compostos de coordenação biomiméticos das enzimas CuNiR e Anidrase Carbônica, que apesar de serem enzimas com atividades completamente distintas,

são enzimas com o sítio catalítico parecidos. A enzima Anidrase Carbônica por exemplo, substituindo o Zn^{2+} por Cu^{2+} , consegue realizar a redução do nitrito.⁶⁸ Portanto, devido a necessidade de complexos miméticos com ligantes tridentados para a obtenção de catalisadores mais eficientes, novos ligantes tridentados que possuem em sua estrutura os grupos piridina, pirrolidina e triazol, foram sintetizados. Esses ligantes tridentados, imitam o ambiente de ligação “NNN” das enzimas, e favorecem uma maior estabilidade ao centro metálico. Os diferentes grupos substituintes no ligante permitem avaliar a influência da segunda esfera de coordenação na catálise. Os ligantes foram necessários para a obtenção dos novos complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+} miméticos das enzimas CuNiR e Anidrase Carbônica, respectivamente.

2- OBJETIVOS

Esse projeto tem como principal objetivo a síntese de complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+} miméticos das enzimas Nitrito Redutase e Anidrase Carbônica, respectivamente e o estudo da atividade catalítica desses complexos (Figura 2.1).

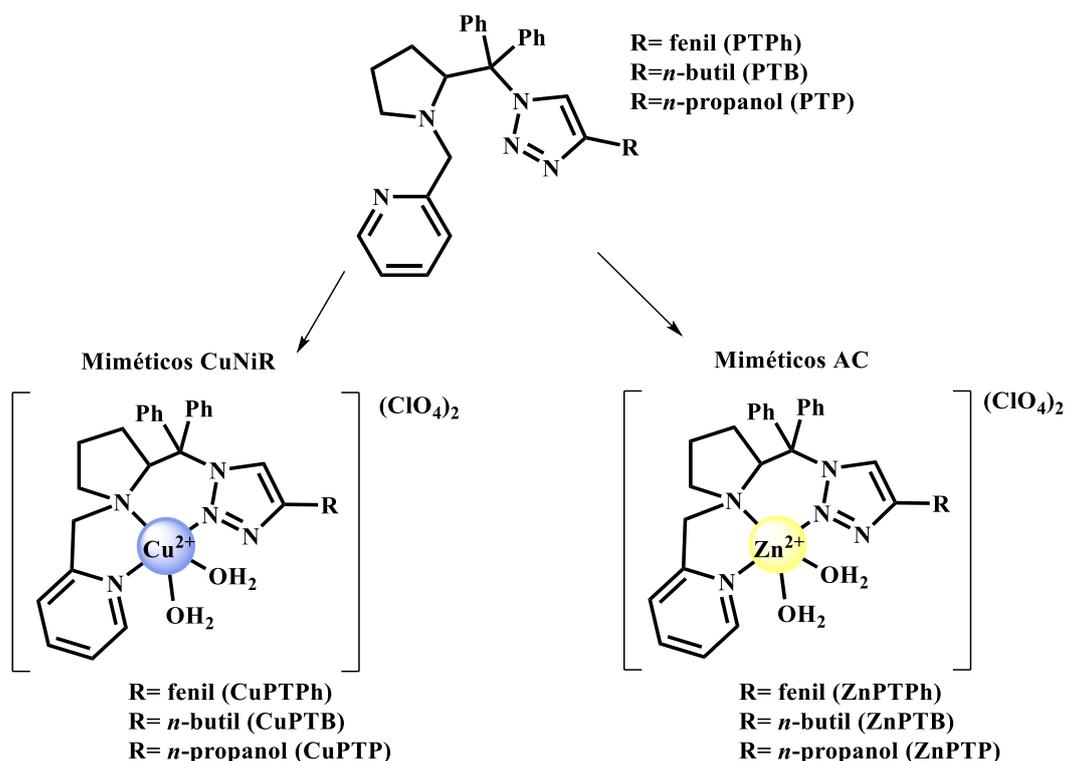


FIGURA 2.1- Representação dos ligantes e complexos miméticos.

Têm-se como objetivos específicos:

- A síntese de três novos ligantes tridentados (Figura 2.1) com diferentes grupos R (fenil, *n*-butil e *n*-propanol) e caracterização pelas técnicas de: UV-Vis, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, COSY, HMBC, HSQC, Infravermelho, Espectrometria de Massas e DRX.
- A síntese de três novos complexos Cu^{2+} para a obtenção dos miméticos da enzima CuNiR (Figura 2.1) e caracterização pelas técnicas: UV-Vis, Infravermelho, Espectrometria de Massas, Condutividade, Análise Elementar, Voltametria cíclica e EPR e DRX.

- A síntese de três novos complexos Zn^{2+} miméticos da Anidrase Carbônica (Figura 2.1) e caracterização pelas técnicas: RMN 1H e ^{13}C , DEPT 135, COSY, HMBC, HSQC, UV-Vis, Infravermelho, Espectrometria de Massas, Condutividade, Análise Elementar.
- Estudo catalítico da reação de redução do nitrito com os complexos de Cu^{2+} , avaliando o efeito da segunda esfera de coordenação (grupos R) e estudo mecanístico.
- Estudo catalítico da reação de hidratação do CO_2 com os complexos de Zn^{2+} , fixação e hidratação do CO_2 , além de formação de $CaCO_3$, avaliando o efeito da segunda esfera de coordenação (grupos R).

3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1- Sínteses Orgânicas

As sínteses dos ligantes foram realizadas em uma série de etapas partindo-se do aminoácido L-prolina, como ilustrado na Figura 3.1. As sínteses dos compostos (1), (2) e (3) foram realizadas de acordo com procedimentos da literatura⁶⁹ com algumas modificações. A síntese do composto (4) inédito, foi desenvolvida pela primeira vez no LaBMeeb de acordo com procedimentos semelhantes.⁷⁰ As sínteses dos ligantes inéditos PTPh, PTB e PTP foram realizadas com base nos procedimentos de reação Click para formação de 1,2,3-triazol.⁷¹

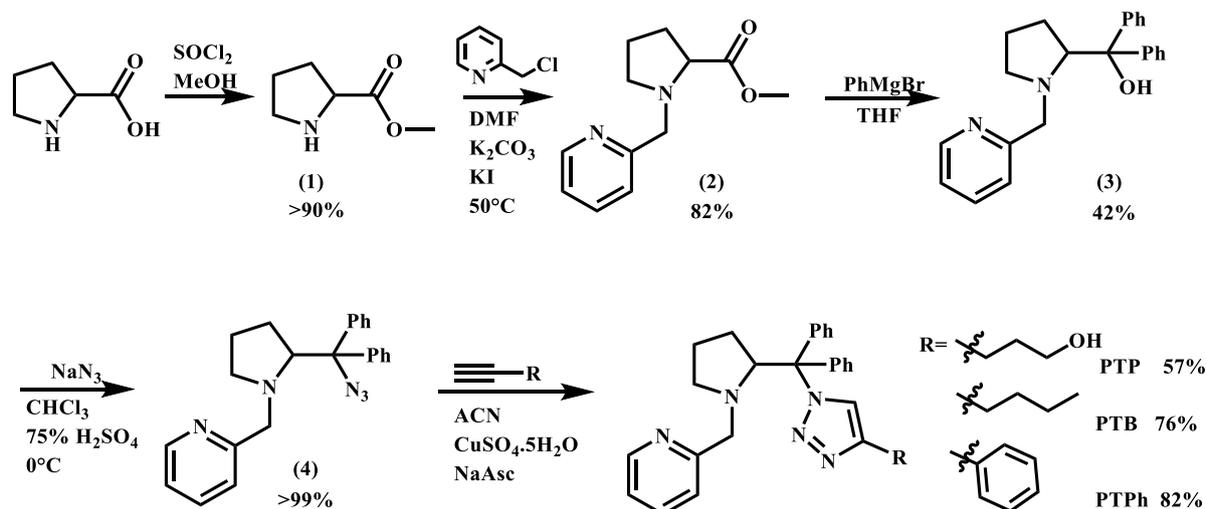


FIGURA 3.1- Esquema da síntese dos ligantes.

3.1.1 Síntese dos compostos prolinato de metila (1) e prolinato (piridin-2-il-metil) de metila (2)

Em um balão Schlenk de 250 mL foi adicionado 40 mL de metanol seco sob atmosfera de argônio. O balão foi colocado sob um banho de gelo e deixado resfriar para temperatura de 0°C. Em seguida foi gotejado 8,4 mL (0,115 mol) de SOCl₂. Então, 12 g (0,104 mol) de L-prolina foi adicionada a reação e a solução foi deixada em agitação por 24h em temperatura ambiente. O solvente foi

evaporado e obteve-se 17,2 g de (1) como um óleo amarelo claro. O composto (1) obtido (17,2 g; 0,104 mol) foi dissolvido em 70 mL de DMF e foi adicionado 33g de K_2CO_3 (0,311 mol), 18,8g (0,114 mol) de 2-(clorometil) piridina hidrocloreto e 7,91g (0,047 mol) de KI. A mistura foi deixada em agitação a 50°C por 16h. Após esse tempo, 50 mL de água foi adicionado e o produto da reação foi extraído com diclorometano (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$ e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto (2) foi obtido como um óleo vermelho escuro. Rendimento: 82%.

RMN 1H : (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,53 (d, 1H); 7,66 (t, 1H); 7,46 (d, 2H); 7,19 (q, 1H); 4,04 (d, 1H); 3,82 (d, 1H); 3,67 (s, 3H); 3,44 (m, 1H); 3,14 (m, 1H); 2,54 (m, 1H) 2,19 (m, 1H); 1,95 (m, 1H); 1,84 ppm (m, 1H).

RMN ^{13}C : δ 174,49; 158,67; 148,95; 136,47; 122,99; 122,08; 66,37; 60,30; 55,53; 51,33; 29,33; 23,20 ppm.

3.1.2- Síntese do difenil(1-(piridin-2-il-metil) pirrolidin-2-il) metanol (3)

Em um balão Schlenk de 250 mL foi adicionado 0,653 g (0,026 mol) de magnésio metálico. Este balão foi flambado e então resfriado a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 30 mL de THF seco sob atmosfera de argônio e 20 mg de I_2 . Após a dissolução do I_2 , 2,86 mL (0,026 mol) de brometo de benzila foi adicionado gota a gota. A reação foi agitada em temperatura ambiente até o Mg^0 ser totalmente consumido. Então, a reação foi resfriada em banho de gelo e foi adicionado 2,96 g (0,013 mol) do composto (2) gota a gota e deixado em agitação por 1h, em temperatura ambiente. Após esse tempo, 10 mL de HCl 10% foram adicionados e a mistura foi deixada em agitação por mais 1h. A mistura foi neutralizada com uma solução de NaOH (0,1M) e extraída com diclorometano (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$ e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado em coluna de

cromatografia de sílica gel (50% EtOAc/Hexano) e obteve-se um sólido amarelo claro. Rendimento: 42%.

RMN ^1H : (400 MHz, CDCl_3): δ 8,45 (d, 1H); 7,70 (d, 2H); 7,60 (m, 3H); 7,19 (q, 1H); 7,32 (m, 4H); 7,27 (m, 1H); 7,10 (m, 3H); 5,05 (br, 1H) 4,10 (s 1H); 3,41 (m, 2H); 3,02 (m, 1H); 2,58 (m, 1H); 1,99 (m, 1H) 1,81 (m, 1H); 1,69 ppm (m, 1H).

RMN ^{13}C : δ 148,69; 146,34; 136,50; 128,20; 128,10; 126,54; 126,36; 125,70; 125,63; 122,74; 122,04; 78,14; 77,24; 70,36; 63,34; 54,05; 29,56; 24,38 ppm.

3.1.3- Síntese do 2-((2-(azidodifenilmetil)pirrolidin-1-il)metil)piridina(4)

Em 40 mL de clorofórmio foi adicionado 1g (0,270 mmol) do composto (3) e 1g (1,538 mmol) de azida de sódio. A reação foi colocada sobre um banho de gelo e foi adicionado 10 mL de H_2SO_4 75% gota a gota. A reação foi deixada em agitação a 12° C por 24h. Após este tempo a reação foi neutralizada com a adição de uma solução concentrada de bicarbonato de sódio, e posteriormente extraída com diclorometano (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida para se obter 1,07 g do composto (4) como um óleo castanho. Rendimento ~ 100%.

FTIR (pastilha de KBr, cm^{-1}): 2108 cm^{-1} , s [v (N=N=N)]

RMN ^1H : (400 MHz, CDCl_3): δ 8,45 (d, 1H); 7,62 (t, 1H); 7,53 (d, 2H); 7,47 (d, 2H); 7,38-7,20 (m, 8H); 7,11 (t, 1H); 4,20 (dd, 1H); 3,9 (d, 1H); 3,65 (d, 1H); 2,89 (m, 1H); 2,44 (m, 1H); 2,12 (m, 1H); 1,89 (m, 1H) 1,63 (m, 1H) 1,39 ppm (m, 1H).

RMN ^{13}C : 160,30; 148,30; 142,19; 141,4; 136,08; 128,01; 127,90; 127,42; 127,37; 122,81; 121,70; 77,25; 76,47; 72,71; 64,27; 57,71; 31,69; 23,32 ppm.

3.1.4- Síntese dos ligantes PTPh, PTB e PTP.

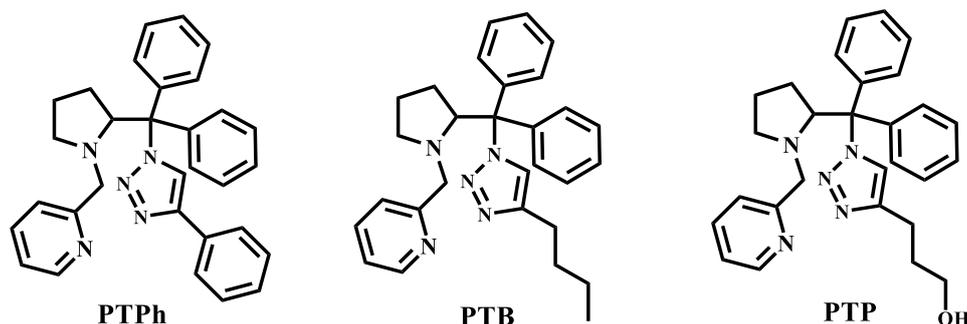


FIGURA 3.2- Estrutura dos ligantes PTPh, PTB e PTP.

O mesmo procedimento foi utilizado para a síntese dos ligantes PTPh, PTB e PTP (Figura 3.2). Em um balão de 50 mL foi adicionado 1g (0,270 mmol) do composto (4) e 4 mL de acetonitrila, sob atmosfera de argônio. Em seguida 0,270 mmol do alcino (etnilbenzeno, 4-pentin-1-ol ou 1-hexino) foi adicionado à solução, seguido de 33 mg (5 mol%) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 53 mg (10 mol%) de ascorbato de sódio, e 1 mL de água. A solução foi deixada em agitação sob argônio, em temperatura ambiente por 24 h. Então, 15 mL de água foi adicionado à reação e um extração com diclorometano (3x 30 mL) foi realizada. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna de cromatografia de sílica gel (50% EtOAc/Hexano), e obteve-se um sólido amarelo claro (os três ligantes apresentaram a mesma cor).

Ligante PTPh: Rendimento= 82%

FTIR (pastilha de KBr, cm^{-1}): 3058 v (C-H) sp^2 ; 2964, 2875, 2813 v (C-H) sp^3 ; 1590, 1568 v(C=N); 1491, 1481, 1448, 1432 v (C=C); 1072 v(C-N); 695, 763 δ fora do plano(=C-H).

^1H NMR: (400 MHz, acetona- d_6): δ 8,54 (s, 1H); 8,44 (d, 1H); 7,90 (d, 2H); 7,60 (m, 5H); 7,41-7,26 (m, 9H); 7,13 (m, 1H); 7,0 (d, 1H); 5,28 (dd, 1H); 4,22 (d, 1H); 3,73 (d, 1H); 2,52 (m, 1H); 2,44 (m, 2H); 1,86 (m, 1H) 1,37 (m, 1H) 0,25 ppm (m, 1H).

^{13}C NMR: δ 160,29; 148,38; 145,36; 141,06; 140,21; 135,71; 131,19; 130,09; 128,37; 127,60; 127,44; 127,30; 127,20; 127,16; 125,08; 122,75; 122,15; 121,28; 77,56; 69,04; 62,77; 54,64; 30,34; 23,09 ppm.

HRMS: $[\text{MH}]^+$: 472.2520 (Experimental); 472.2501 (calc. for $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_5$)

Ligante PTB: Rendimento=76%

FTIR (pastilha de KBr, cm^{-1}): 3059 $\nu(\text{C-H}) \text{ sp}^2$; 2953, 2958, 2870, 2808 $\nu(\text{C-H})\text{sp}^3$; 1590, 1568 $\nu(\text{C=N})$; 1493, 1474, 1447, 1433 $\nu(\text{C=C})$; 1042 $\nu(\text{C-N})$; 703, 754 δ fora do plano($=\text{C-H}$).

^1H NMR: (400 MHz, acetona- d_6): δ 7,71 (s, 1H); 7,61 (t, 1H); 7,54 (m, 2H); 7,41 (m, 2H); 7,37-7,27 (m, 6H); 7,14 (m, 1H); 6,93 (d, 1H); 5,16 (dd, 1H); 4,17 (d, 1H); 3,66 (d, 1H); 2,63 (t, 2H); 2,51 (m, 1H) 2,404 (m, 2H); 1,80 (m, 1H); 1,57 (quin, 2H); 1,36 (m, 1H); 1,31 (m, 2H); 0,86 (t, 3H); 0,24 ppm (m, 1H).

^{13}C NMR: δ 160,69; 148,54; 146,14; 141,93; 140,48; 135,97; 130,47; 128,64; 127,77; 127,69; 127,40; 127,31; 123,43; 122,48; 121,54; 77,28; 69,64; 63,35; 55,00; 31,60; 30,73; 25,03; 23,45; 21,90; 13,22 ppm.

HRMS: $[\text{MH}]^+$: 452.2809 (Experimental); 452.2814 (calc. for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_5$)

Ligante PTP: Rendimento= 57%

FTIR (pastilha de KBr, cm^{-1}): 3380 $\nu(\text{O-H})$; 3063 $\nu(\text{C-H}) \text{ sp}^2$; 2952, 2875, 2834 $\nu(\text{C-H})\text{sp}^3$; 1600, 1577 $\nu(\text{C=N})$; 1500, 1483, 1455, 1441 $\nu(\text{C=C})$; 1054 $\nu(\text{C-N})$; 703, 754 δ fora do plano($=\text{C-H}$).

^1H NMR: (400 MHz, acetona- d_6): δ 8,42 (d, 1H); 7,73 (s, 1H); 7,62 (t, 1H); 7,53 (m, 2H); 7,42 (m, 2H); 7,37-7,27 (m, 6H); 7,14 (m, 1H); 6,92 (d, 1H); 5,18 (dd, 1H); 4,18 (d, 1H); 3,67 (d, 1H); 3,54 (quin, 2H); 2,90 (m, 1H) 2,72 (t, 2H); 2,52 (m, 1H); 2,40 (m, 2H); 1,80 (m, 3H); 1,35 (m, 1H); 0,24 ppm (m, 1H).

^{13}C NMR: δ 160,69; 148,54; 146,14; 141,93; 140,48; 135,97; 130,47; 128,64; 127,77; 127,69; 127,40; 127,31; 123,43; 122,48; 121,54 ppm.

HRMS: $[\text{MH}]^+$: 454.2607 (Experimental); 454.2606 (calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}$)

3.2 Sínteses Inorgânicas

3.2.1- Procedimento geral para a síntese dos complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+} .

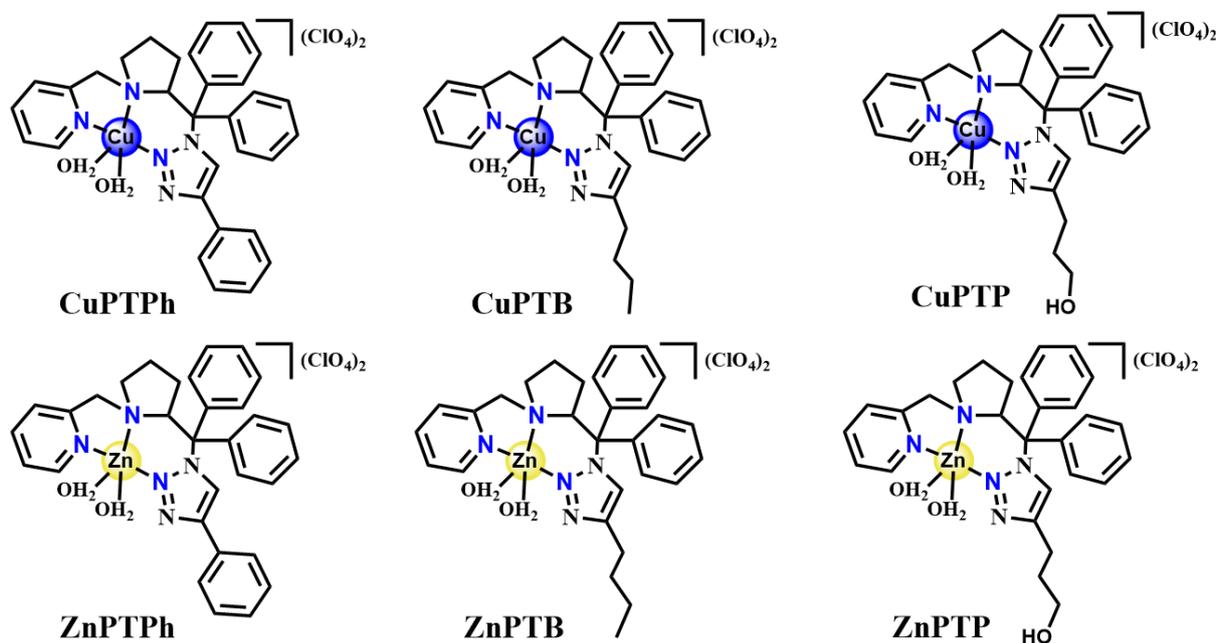


FIGURA 3.3- Estrutura dos complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+} .

A síntese dos complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+} (Figura 3.3) foram realizadas com procedimentos semelhantes. Em 6 mL de metanol foi adicionado 0,148 mmol do sal do metal ($\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e em seguida foi adicionado 0,148 mmol do ligante (PTPh, PTB ou PTP). A reação foi deixada em agitação e temperatura de 50°C por 4h. Após esse tempo, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O sólido obtido foi lavado com éter e mantido no dessecador. Na Tabela 3.1 encontram-se os valores de rendimentos, cor dos sólidos e solubilidade dos complexos.

TABELA 3.1- Valores de rendimento, cor dos sólidos e solubilidades dos complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+} .

	Rendimento	Cor	MeOH	CH_2Cl_2	Acetona	H_2O
CuPTPh	95%	Azul	XXX	XX	XXX	—
CuPTB	90%	Azul	XXX	X	XXX	—
CuPTP	90%	Azul	XXX	X	XXX	—
ZnPTPh	96%	Amarelo	XXX	XX	XXX	—
ZnPTB	94%	Amarelo	XXX	X	XXX	—
ZnPTP	90%	Amarelo	XXX	X	XXX	—

—: insolúvel; X:pouco solúvel, XX: solúvel, XXX: muito solúvel

3.3- Caracterizações e Aplicações

3.3.1- Difração de raios-X

O ligante PTB (código CCDC 2113820) e o complexo CuPTPh (código CCDC 2113821) foram cristalizados em metanol, por evaporação lenta do solvente. As coletas de dados dos monocristais, por difração de raios-X, foram realizadas em minidifratômetro Rigaku XtaLAB com radiação $\text{MoK}\alpha$ monocromada de grafite ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Refinamentos celulares, redução de dados e integração foram realizados utilizando o software CrysAlisPro e a solução e refinamento de estruturas foram obtidos utilizando o pacote SHELX, hospedado no programa OLEX2. O método multi-scan foi usado para as correções de absorção. As representações de tabela e estrutura foram geradas por OLEX2 e MERCURY, respectivamente.

3.3.2- Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho (FTIR – *Fourier Transform Infrared*) foram obtidos para as amostras dispersas em pastilhas de brometo de potássio (KBr), utilizando-se um espectrofotômetro

Bomen-Michelson FT modelo MB-102. As medidas foram obtidas no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.3.3- Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos na região do UV-Vis do complexo foram obtidos em um espectrofotômetro HP – Hewlett Packard 8452 A. As amostras foram analisadas em soluções utilizando uma célula de quartzo retangular com capacidade para volume de 1mL, e caminho óptico de 1,0 cm. Os valores das absorvidades molares, ϵ , foram calculados a partir da lei de Lambert-Beer ($\epsilon = A/bC$), sendo que A = absorvância, b = caminho óptico da célula e C = concentração da espécie em mol.L^{-1} , utilizando os valores de absorvância máximo das bandas nos espectros obtidos em diferentes concentrações.

3.3.4- Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Os resultados de EPR foram obtidos em colaboração com o Prof. Otaciro Rangel Nascimento do Instituto de Física da USP campus II. As medidas foram realizadas metanol a temperatura ambiente (296 K) e congeladas em N_2 líquido (77K). As medidas foram realizadas utilizando o equipamento de EPR Modelo Varian E109, banda X, utilizando a cavidade retangular e modulação de campo a 100 kHz. Os parâmetros de ajuste das medidas foram: potência de micro-ondas de 20 mW, amplitude de modulação de 0,4 mT pico a pico, ganho ajustável para cada amostra, varredura de campo de 160 mT, constante de tempo de 0,064 s, tempo de varredura de 3 minutos. Para as medidas sob N_2 líquido foi utilizado o *Dewar* de imersão. Utilizou-se um padrão de EPR para calibração do campo magnético (cristal de MgO:Cr(III) $g = 1,9797$) e a frequência de ressonância foi medida com um frequencímetro de micro-ondas.

3.3.5- Análise elementar

As medidas de análise elementar foram realizadas na central analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos para determinação da porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes nas amostras. O equipamento utilizado foi o EAGER 200 CE *Instruments*.

3.3.6- Medidas de Condutividade

Os valores de condutividade molar foram obtidos em soluções 1,0 mmol L⁻¹ dos complexos solubilizados em metanol. O equipamento utilizado foi o condutivímetro Meter Lab modelo CDM230. Os valores de condutividade obtidos das soluções foram comparados com os valores de condutividade de cada solvente (branco) e as faixas de proporção eletrolítica de acordo com relatos da literatura.

3.3.7- Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato EG&G Princeton Applied Research Model 273^a, utilizando uma célula convencional de vidro com entrada para os três eletrodos. Os eletrodos utilizados foram: carbono vítreo (0,071 cm⁻²), platina e Ag_(s)/AgCl_(s)|KCl (3,5M) como eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência, respectivamente. As medidas foram realizadas em metanol contendo perclorato de tetrabutylamônio (PTBA) 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito de suporte. Para remoção de O₂ dissolvido nos eletrólitos, argônio foi borbulhado durante 10 minutos antes de cada varredura. O eletrodo de trabalho, antes das varreduras de potencial, foi submetido a processo de polimento com alumina 0,05 μm. Em seguida, este foi lavado com água, os eletrodos auxiliar e de referência, foram lavados com metanol e, só então, foram colocados na célula eletroquímica.

Os parâmetros eletroquímicos foram obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos dos processos reversíveis, ou quase-reversíveis, em que

apresentam linhas de base anódica e catódica bem definidas. Os potenciais de pico anódico (E_a) e catódico (E_c) foram determinados pelas projeções verticais dos máximos das correntes sobre os eixos, onde a média aritmética destes potenciais de pico resulta no potencial formal de meia onda ($E_{1/2}$) do composto.

$$E_{1/2} = (E_a + E_c)/2 \quad \text{Equação (6)}$$

As correntes de pico anódico (i_{pa}) e catódico (i_{pc}) foram determinadas pelas extrapolações das respectivas linhas de base até os interceptos das alturas máximas das correntes. As reversibilidades dos sistemas foram avaliadas pela separação dos potenciais de pico catódico e anódico (ΔE_p), bem como pela dependência de i_{pc} com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial.

3.3.8- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros foram obtidos no espectrômetro BRUKER ARX 9,4 T do Departamento de Química (DQ) da UFSCar. Foram realizadas as técnicas convencionais unidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C e as atribuições dos sinais foram realizadas a partir de correlações com os espectros DEPT 135 e bidimensionais COSY, HSQC e HMBC. Os experimentos foram realizados nos solventes deuterados CDCl_3 ou $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

3.3.9- Espectrometria de Massas

Os espectros de massas dos complexos de Cu^{2+} e dos ligantes foram realizados em colaboração com o professor Antoine Simonneau no Instituto de Química de Toulouse- França. Para os ligantes, a ionização foi realizada pelo método de ionização química por metano e para os complexos foi utilizado a ionização por *electrospray* (ESI). Os espectros de Massas dos complexos de zinco foram realizados no Departamento de Química, Emory University- EUA. Todas as medidas foram realizadas com os compostos diluídos em metanol.

3.3.10- Redução dos complexos de Cu^{2+} com ascorbato de sódio.

A redução foi realizada em uma cubeta de quartzo fechada. À cubeta, foram adicionados 3 mL de uma solução 1 mM dos complexos de cobre em metanol. Esta solução foi desaerada borbulhando argônio por 15 minutos. Após este período, 150 μl de uma solução metanólica (20 mM) de ascorbato de sódio foram adicionados à solução do complexo de cobre.

3.3.11- Geração de NO a partir do NO_2^- .

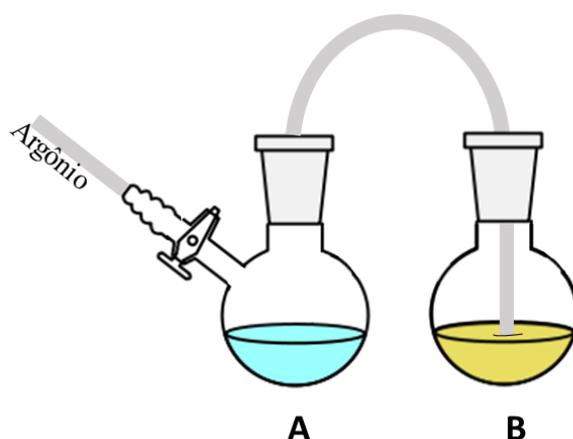


FIGURA 3.4- Ilustração do sistema de geração e detecção de NO.

O sistema utilizado para a geração de NO está ilustrado na Figura 3.4.^{35,39} No balão Schlenk A contendo 1 mL de uma solução metanólica do complexo de cobre (0,5 mM, 0,5 μmol), sob atmosfera de argônio, foi adicionado nitrito de sódio (5 μmol), ácido benzóico (10 μmol) e ascorbato de sódio (5 μmol) com auxílio de uma seringa. Este foi conectado, por um fio *Tygon*, ao balão B contendo uma solução do complexo $\text{Fe}[\text{EDTA}]^{2-}$. A solução de $\text{Fe}[\text{EDTA}]^{2-}$ foi preparada previamente adicionando 3 mL de solução tampão de citrato (0,1 M, pH = 5), desaerada durante 15 minutos com argônio, e foram adicionados 30 μmol de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 30 μmol de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). O sistema foi mantido sob argônio e agitado durante 5 minutos. A reação iniciou-se após a adição de ascorbato de sódio ao balão A. Um leve fluxo de argônio aplicado no

balão A foi mantido durante a reação para conduzir a passagem do NO formado para o balão B. Após 10 min a solução B muda de incolor para amarelo e foi retirado uma alíquota dessa solução e levado ao UV-Vis para verificar o surgimento da banda em 432 nm (Figura 4.47) que é característico do complexo de coloração amarela [Fe(EDTA)(NO)].

Os valores de porcentagem de NO obtidos foram com relação a reação de formação de NO (controle positivo), onde foi realizado a adição da mesma quantidade de NaNO₂ usado no processo catalítico, em 1mL de ácido acético. Na reação com a ausência do complexo (branco) não houve o surgimento da banda em 432 nm, o que indica que NO não é gerado nessas condições. As medidas foram realizadas em triplicatas.

3.3.12- Síntese do H₂TPP e CoTPP para detecção de NO.

O ligante porfirínico H₂TPP e o complexo CoTPP foram sintetizados de acordo com procedimentos semelhantes da literatura.⁷²⁻⁷⁴

Em um balão de 250 mL foi adicionado 78 mL de ácido propiônico, 1,68 mL (0,024 mol) de pirrol, previamente destilado e 2,48 mL (0,024 mol) de benzaldeído. Em seguida foi adicionado 42 mL de nitrobenzeno. A solução foi deixada em agitação a 120°C por 2h. Após esse tempo foi adicionado metanol e a solução foi deixada na geladeira por 16h para a obtenção do precipitado de cor lilás. O sólido obtido foi filtrado, lavado com metanol e deixado no dessecador (Rendimento 40%). Para a síntese do CoTPP, 300 mg (0,48 mmol) de H₂TPP foram adicionados em 3 mL de DMF. Essa solução foi deixada em agitação e sob nitrogênio por 15 min, em seguida foi adicionado 607 mg (2,43 mmol) de Co(CH₃COO)₂.4H₂O e a reação foi deixada a 100 °C por 1h. Após o resfriamento da solução foi adicionado água para a obtenção de um precipitado marrom. O sólido foi lavado com água e deixado no dessecador. Rendimento 79%.

3.3.13- Determinação de k_{cat} e K_M a partir de experimentos de eletrorredução.

Os valores de V_{NO} foram obtidos dividindo a densidade de corrente pela constante de Faraday, resultando em uma formação de NO por unidade de área do eletrodo (V_{NO} , $\text{nmol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). O valor de k_{cat} foi obtido dividindo-se o V_{max} pela concentração do catalisador.

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{máx}} / [\text{Cat.}] \quad \text{Equação (7)}$$

Como o meio não é agitado, a concentração do catalisador corresponde ao número de moléculas que participam da reação eletroquímica e pode ser determinada integrando a carga que se forma no processo redox $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ na ausência de substrato. Esses cálculos foram realizados de acordo com a literatura.^{41,75}

3.3.14- Medidas espectroscópicas: *stopped-flow*

As análises por espectroscopia de *stopped-flow* foram realizadas no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química de São Paulo. As medidas foram realizadas na temperatura de 10 °C e todas as soluções foram desaeradas antes de cada medição. Duas soluções foram preparadas, uma com ascorbato de sódio (1 mM) em metanol e a outra contendo 1 mM do complexo de cobre, 50 eq. de ácido benzóico. A concentração de NaNO_2 foi variada em cada medida (1mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM). As medições começaram a partir da injeção das duas soluções no equipamento simultaneamente.

3.3.15- Reação de hidratação do CO_2

Em 1 mL de tampão HEPES 2,5 mM pH=8 foi adicionado 0,5 mL de uma solução do complexo de zinco em acetona (1mg/mL) e 0,01 mL do indicador de pH azul de bromotimol. O CO_2 foi borbulhado na solução e a reação foi monitorada por UV-vis, para acompanhar a banda do indicador em 626 nm. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

3.3.16- Reação de formação do CaCO₃.

Em uma solução de 5mL de tampão HEPES 2,5 mM pH=8 contendo 400 mM de CaCl₂, foi adicionado 2,5 mL do complexo de zinco dissolvido em acetona (1mg/mL). O CO₂ foi borbulhado nesta mistura por 40 minutos. O precipitado foi centrifugado e lavado com acetona e éter. Posteriormente, o sólido foi seco e pesado. Na reação controle não havia complexo. As medidas foram realizadas em triplicatas.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

No tópico a seguir serão apresentados os resultados de caracterização dos ligantes juntamente com os complexos. Os ligantes contêm em sua estrutura os grupos piridina, prolina e triazol, com os átomos de nitrogênio como pontos de coordenação para criar um ambiente de coordenação “NNN”. Eles diferem pelos grupos substituintes fenil, *n*-butil e *n*-propanol e são referidos no texto como PTPPh, PTB e PTP, respectivamente. Os complexos $[M(L)_2(H_2O)_2](ClO_4)_2$ (onde $M=Cu^{2+}$ ou Zn^{2+} e $L=PTPh, PTB$ ou PTP) também são referidos como CuPTPh, CuPTB, CuPTP, ZnPTPh, ZnPTB e ZnPTP.

Posteriormente serão discutidos os resultados catalíticos para os complexos de Cu^{2+} miméticos da CuNiR e em seguida os de Zn^{2+} miméticos da Anidrase Carbônica.

4.1- Caracterização dos ligantes e dos complexos.

4.1.1- Difração de Raios-X

A difração de raio-X de monocristal é uma das principais técnicas de caracterização que permite a elucidação estrutural dos compostos. Foi possível a obtenção dos monocristais do ligante PTB e do complexo CuPTPh, a partir da evaporação lenta da solução em metanol desses compostos em temperatura ambiente. As estruturas cristalinas do ligante PTB e do complexo CuPTPh estão ilustradas nas Figuras 4.1 e 4.2, respectivamente.

O ligante tridentado PTB apresenta em sua estrutura um anel piridínico, um triazol e uma pirrolidina, os quais possuem os átomos de nitrogênio doadores como pontos de coordenação, de forma que possam oferecer um modo de coordenação tridentado “NNN” para o metal.

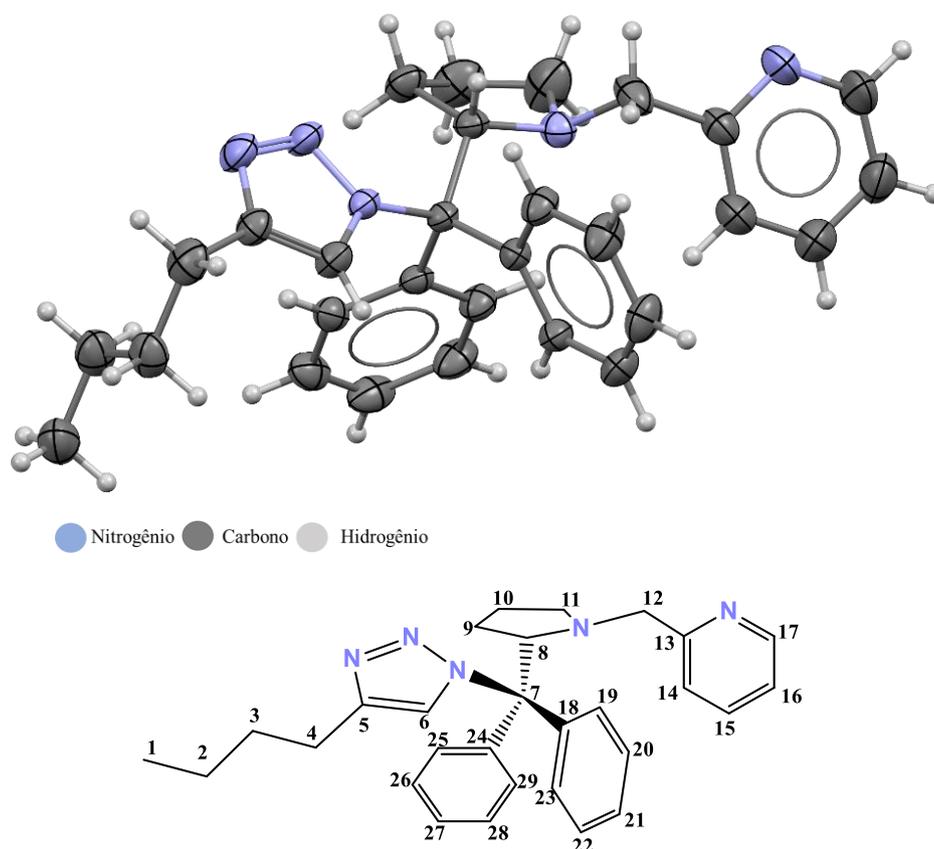


FIGURA 4.1- Estrutura cristalina e atribuições das numerações para os átomos do ligante PTB.

A estrutura cristalina do complexo CuPTPh indica uma geometria pirâmide de base quadrada distorcida em torno do metal. A coordenação do ligante PTPH ao Cu^{2+} (Cu1) ocorre por três átomos de nitrogênio do ligante, um do triazol (N2), outro da pirrolidina (N4) e o terceiro da piridina (N5), duas moléculas de água coordenadas completam a esfera de coordenação. Para uma melhor visualização da estrutura foram omitidos na ilustração as moléculas de água de cristalização, os dois contra-íons percloratos e os prótons (exceto aqueles da água coordenada). A figura completa está ilustrada na Fig. Apêndice 1.

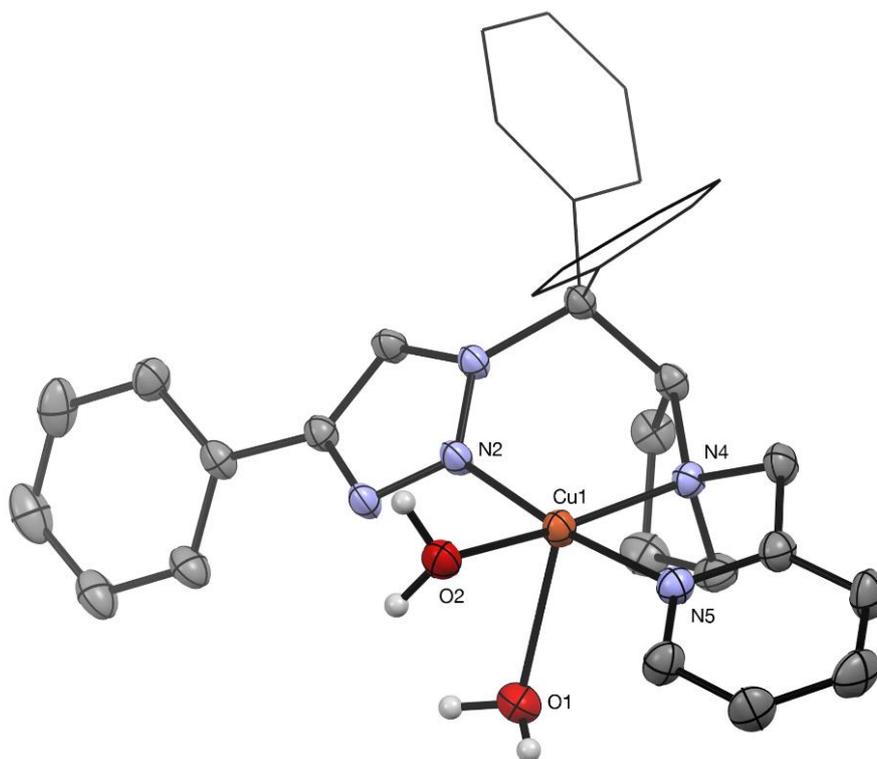


FIGURA 4.2- Estrutura cristalina do complexo CuPTPh.

Os principais ângulos e comprimentos de ligação dos átomos em torno do metal estão descritos na Tabela 4.1.

O trabalho publicado por ROSE et al. (2021),¹⁵ relata a presença de duas moléculas de água coordenadas ao Cu^{2+} no sítio catalítico da enzima CuNiR (*Br^{2D}NiR*), uma interagindo mais fortemente que a outra, com comprimentos de ligação 1,940 e 2,162 Å. Semelhante a esta enzima, as duas moléculas de água coordenadas no complexo CuPTPh seguem a mesma tendência, sendo a ligação Cu-O(2) mais forte que a ligação Cu-O(1) com distâncias de 2,013(3) e 2,360(3) Å, respectivamente. Das três ligações Cu-N, a que apresenta um maior comprimento de ligação é a Cu-N(4) (2,068 Å), que pode estar relacionada a efeitos estéricos do ligante. O comprimento das ligações Cu-N(2) e Cu-N(5) são parecidos e mais curtos (1,952 e 1,957 Å). Essas distâncias de ligação podem ser comparadas com as ligações Cu-N_(His129), Cu-N_(His94) e Cu-N_(His301) na enzima, com os comprimentos de ligação 2,083, 2,009 e 2,010 Å. A semelhança estrutural do complexo mimético com a enzima é uma característica importante pois espera-se

que os compostos de coordenação possam alcançar a atividade catalítica enzimática.

TABELA 4.1- Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados do complexo CuPTPh.

Átomos	Comprimento de Ligação (Å)
Cu-O(1)	2,360 (3)
Cu-O(2)	2,013 (3)
Cu-N(2)	1,952 (4)
Cu-N(4)	2,068 (4)
Cu-N(5)	1,957 (4)
Átomos	Ângulo (°)
O(2)-Cu-O(1)	85,26 (12)
N(2)-Cu-O(1)	93,01(12)
N(2)-Cu-O(2)	92,51(12)
N(4)-Cu-O(1)	102,68(12)
N(4)-Cu-O(2)	171,45 (12)
N(5)-Cu-N(2)	90,26 (12)
N(5)-Cu-O(1)	91,81 (12)
N(5)-Cu-O(2)	93,10 (13)
N(5)-Cu-N(2)	172,88 (12)

4.1.2- Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho dos ligantes PTPH, PTB e PTP são apresentados na Figura 4.3. As tentativas de atribuições foram realizadas para as principais vibrações e estão descritas na Tabela 4.2.

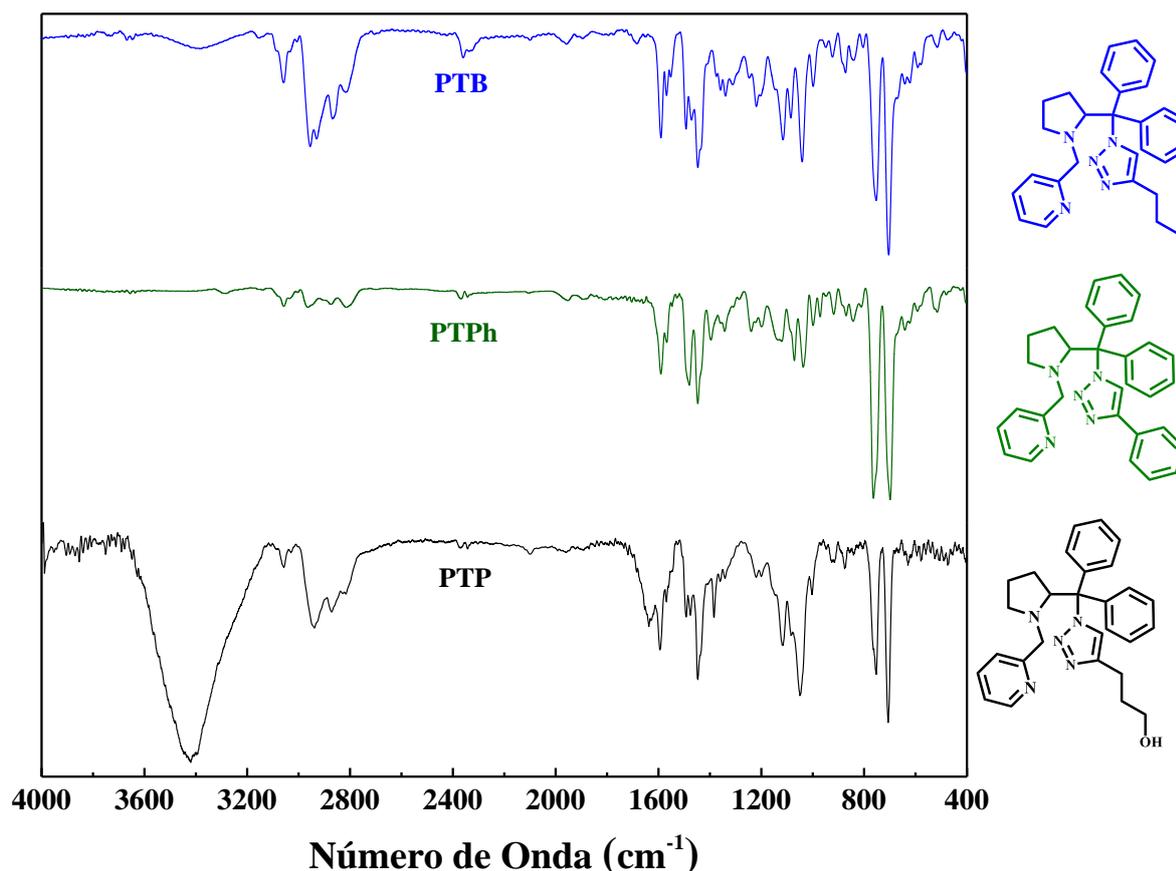


FIGURA 4.3- Espectro de Infravermelho dos ligantes em pastilha de KBr.

O composto precursor dos ligantes PTPh, PTB e PTP que contém o grupo azida apresenta uma banda intensa em 2108 cm^{-1} (Fig. Apêndice 6) referente a $\nu(\text{N}_3)$. Após a formação do triazol ocorre o desaparecimento dessa banda.⁷⁶ Este é um indicativo da formação do triazol nos ligantes.

Os espectros dos ligantes são semelhantes. As bandas na região de 1593 a 1493 cm^{-1} são atribuídas aos modos de vibração de estiramento das ligações $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{N}$ ⁷⁷ nos três espectros, bem como são observadas as bandas na região de 703 e 754 cm^{-1} que são características dos modos de dobramento fora do plano da ligação $\text{C}-\text{H}$ dos anéis aromáticos monossustituídos.⁷⁸ O ligante PTP apresenta uma banda larga em 3380 cm^{-1} característico de $\nu(\text{O}-\text{H})$. A banda intensa na região de 1047 cm^{-1} foi atribuída ao modo de vibração $\nu(\text{C}-\text{O})$, sobreposta a $\nu(\text{C}-\text{N})$. Nos ligantes PTB e PTPh as bandas em 1072 e 1035 cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais da ligação $\nu(\text{C}-\text{N})$.⁷⁸

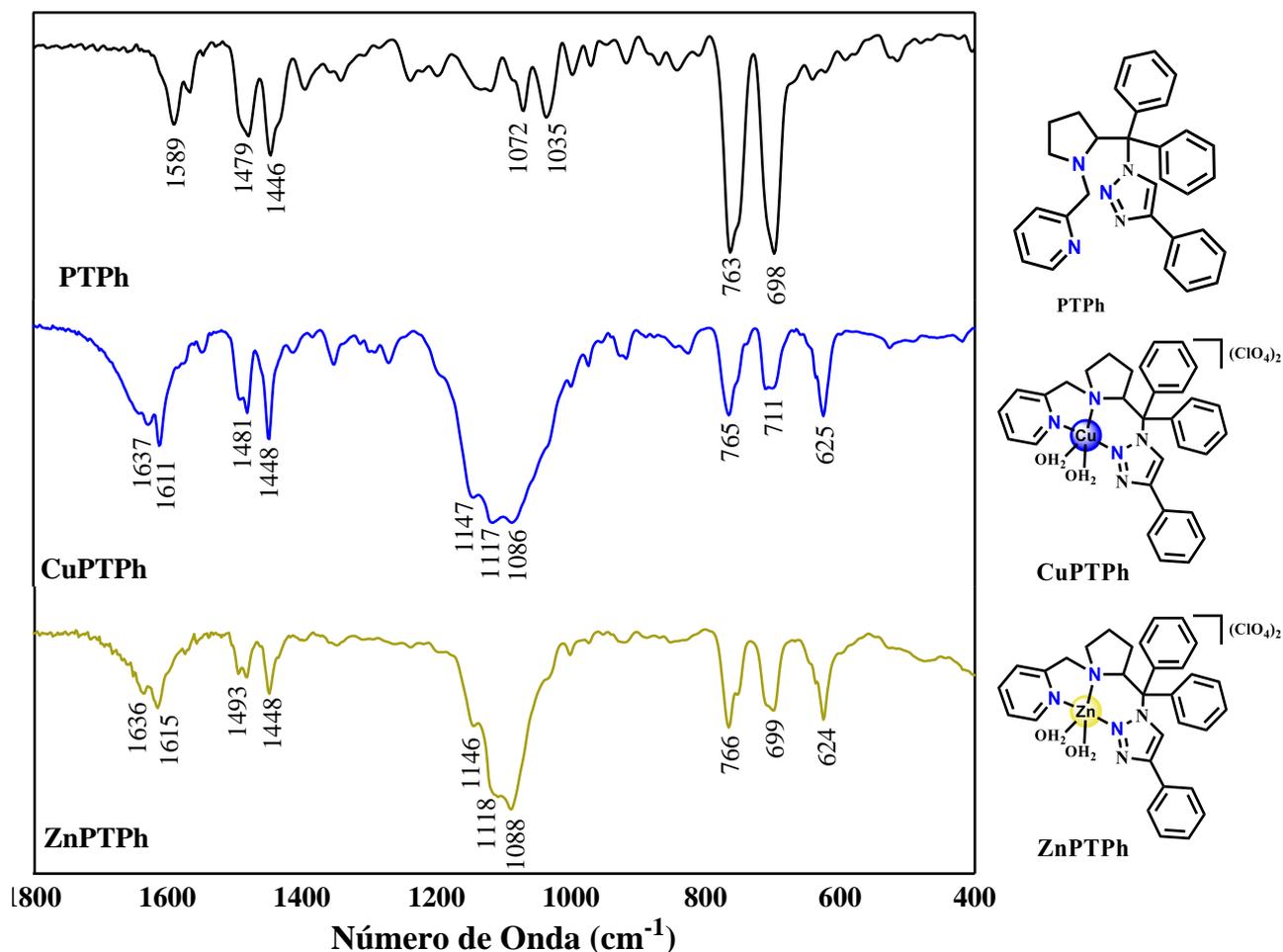


FIGURA 4.4- Comparação dos espectros de infravermelho do ligante PTPh e dos complexos CuPTPh e ZnPTPh.

Comparando-se os espectros do ligante PTPh com os complexos CuPTPh e ZnPTPh na região de 1800 a 400 cm^{-1} (Figura 4.4) observa-se que as bandas $\nu(\text{C}=\text{N})$ e $\nu(\text{C}=\text{C})$ são deslocadas para regiões de maior energia. A banda em 1589 cm^{-1} do ligante PTPh deslocou para 1611 e 1615 cm^{-1} nos complexos CuPTPh e ZnPTPh. As bandas de $\nu(\text{C}-\text{N})$ e $\nu(\text{C}-\text{O})$ presente nos ligantes não foram identificadas, pois devem estar encobertas pela banda larga do perclorato. Os outros complexos também seguem a mesma tendência (Tabela 4.2). Esses deslocamentos indicam que houve a coordenação desses ligantes ao centro metálico.

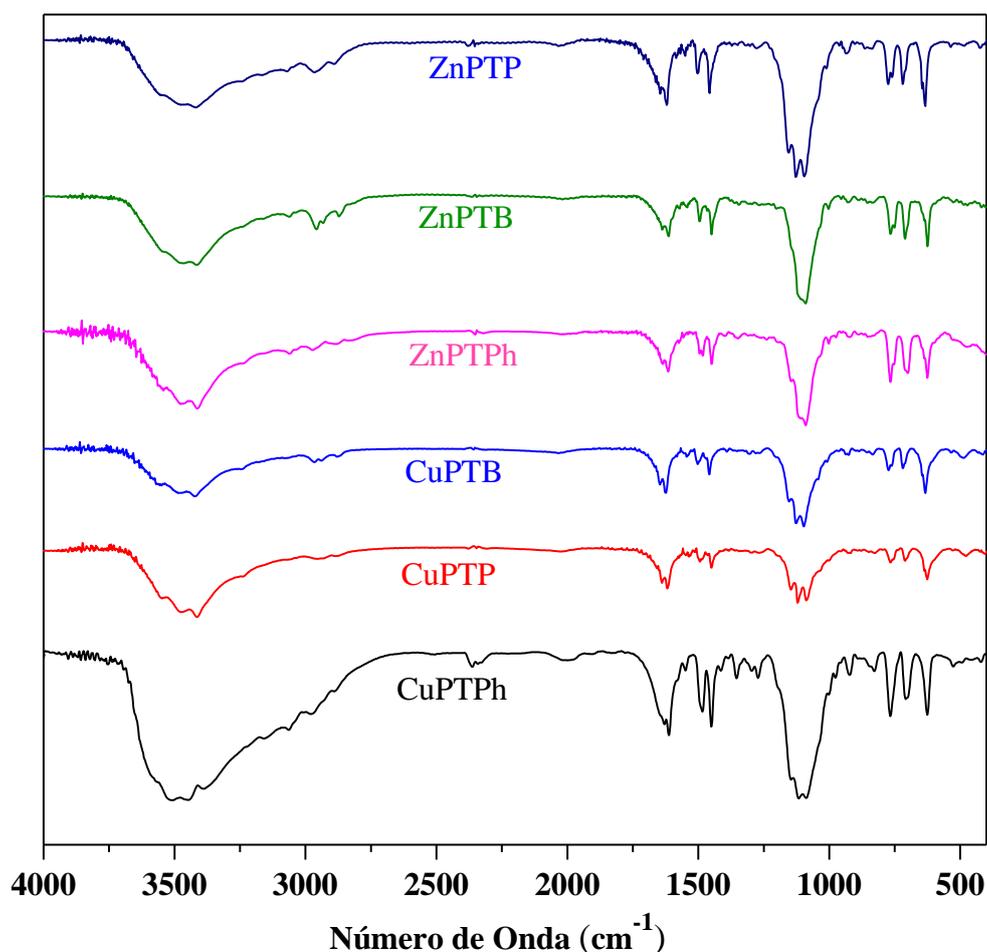


FIGURA 4.5- Espectros de Infravermelho dos complexos de Zn^{2+} e Cu^{2+} em pastilha de KBr.

Os espectros de infravermelhos dos complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+} são semelhantes (Figura 4.5). É observado em comum nos espectros a banda larga em torno de 3500 cm^{-1} característica de $\nu(\text{O-H})$ das moléculas de água coordenadas e livres, como foram observados também na estrutura de Raio-X do CuPTPh. Pode-se observar também que as bandas $\nu(\text{C=N})$ e $\nu(\text{C=C})$ aparecem na mesma região. Todos os complexos apresentam as bandas intensas na região de 1110 e 633 cm^{-1} que são características dos modos $\nu(\text{Cl-O})$ e $\delta(\text{Cl-O})$ do contra íon perclorato.⁷⁹ Esses dados indicam que as estruturas no estado sólido dos complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+} são similares.

TABELA 4.2- Tentativa de atribuição das bandas dos espectros de infravermelho dos ligantes e dos complexos.

	ν (O-H)	ν (C-H) sp^3	ν (C=N)	ν (C=C)	ν (C-N)	ν (C-O)	ν (Cl-O)/ δ (Cl-O)	δ fora do plano (=C-H)
PTPh	—	2964; 2797	1589	1479 ;1446	1072;1035	—	—	763; 689
ZnPTPh	3551; 3475; 3410	2970; 2877	1636; 1615	1493; 1448	—	—	1146; 1118; 1088/ 624	766; 699
CuPTPh	3521; 3447; 3386	2971; 2885	1637; 1611	1481; 1448	—	—	1114; 1117; 1086/ 625	765; 711
PTB	—	2954; 2808	1589	1492; 1446	1115; 1041	—	—	750; 704
ZnPTB	3540; 3474; 3416	2956; 2931; 2870	1636; 1614	1493; 1448	—	—	1143; 1119; 1088/ 624	764; 710
CuPTB	3556; 3484; 3423	2965; 2937; 2977	1646; 1624	1501; 1457	—	—	1153; 1127; 1097/ 633	772; 719
PTP	3380	2949; 2818	1593	1492; 1446	1116; 1037	1049	—	752; 705
ZnPTP	3415; 3484; 3556	2969; 2886	1636; 1613	1502; 1456	—	—	1153; 1126; 1094/ 624	766; 712
CuPTP	3408; 3483; 3548	2965; 2937; 2977	1638; 1617	1493; 1449	—	—	1146; 1119; 1087/ 624	766; 711

ν = estiramento; δ =dobramento. Valores da Tabela em cm^{-1} .

4.1.3- Análise Elementar e Condutividade

A análise elementar dos compostos foi realizada para a obtenção da porcentagem de carbono, nitrogênio e hidrogênio das amostras. As quais foram comparadas com seus valores teóricos. Os resultados obtidos estão correlacionados na Tabela 4.3. A partir da tabela observa-se que os valores obtidos experimentalmente aproximam-se de seus valores teóricos. Como previsto anteriormente pelas técnicas de difração de raio-X e infravermelho, os compostos apresentam em sua estrutura moléculas de água coordenadas e livres. Os complexos CuPTB e ZnPTB apresentaram em sua estrutura duas moléculas de MeOH, proveniente de suas sínteses.

TABELA 4.3- Valores de análise elementar e condutividade dos complexos.

	%C (Teórico)	%H (Teórico)	%N (Teórico)	Λ_m , $\mu\text{S cm}^{-1}$
[Cu(PTPh)(H ₂ O) ₂](ClO ₄) ₂ . 1/2H ₂ O	47,95 (47,79)	4,24 (4,40)	8,69 (8,99)	140,7 ± 0,7
[Cu(PTB)(H ₂ O) ₂](ClO ₄) ₂ . MeOH	46,09 (46,07)	4,82 (5,28)	8,63 (8,95)	146,7 ± 0,2
[Cu(PTP)(H ₂ O) ₂](ClO ₄) ₂	45,26 (44,72)	4,37 (4,69)	8,64 (9,31)	152,3 ± 0,1
[Zn(PTPh)(H ₂ O) ₂](ClO ₄) ₂ . 2H ₂ O.1/2H ₂ O	45,57 (45,58)	4,45 (4,69)	8,25 (8,57)	149,2 ± 0,4
[Zn(PTB)(H ₂ O) ₂](ClO ₄) ₂ . MeOH.1/2H ₂ O	45,29 (45,44)	5,07 (5,34)	8,78 (8,83)	151,4 ± 0,6
[Zn(PTP)(H ₂ O) ₂](ClO ₄) ₂ . 2H ₂ O	42,77 (42,57)	4,75 (4,98)	8,79 (8,87)	173,5 ± 0,4

Condutividade realizada em metanol

A condutividade iônica das soluções 1 mmol.L⁻¹ dos complexos em metanol resultaram em valores dentro da faixa de eletrólito 2:1, de acordo com a literatura.^{80,81} Esses resultados corroboram com a estrutura de raio-X do complexo CuPTPh, que contém dois contra-íons percloratos e duas moléculas de água coordenadas.

4.1.4- Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis.

Os espectros de UV-Vis dos ligantes e dos complexos de Cu²⁺ em metanol são apresentados nas Figuras 4.6-4.8. Os ligantes PTPPh, PTB e PTP apresentam bandas intensas na região de maior energia do espectro $\lambda_{\text{máx}}=245$ ($\epsilon=16741 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 264 ($\epsilon=4189 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 262 ($\epsilon=4297 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm que são característica de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos.⁷⁸

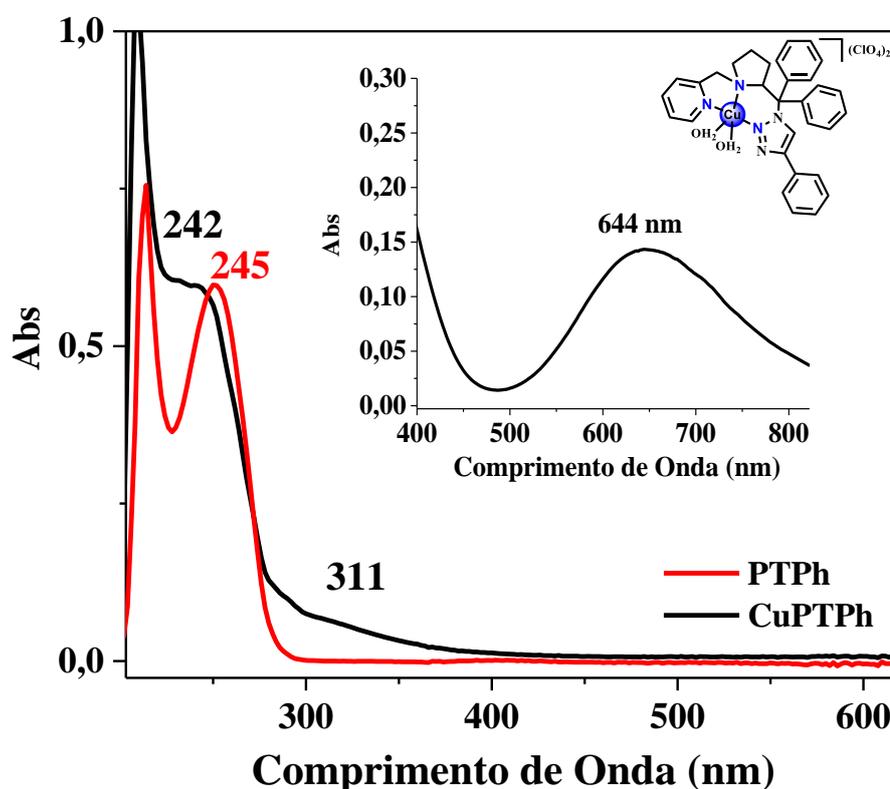


FIGURA 4.6- Espectro de UV-Vis do complexo CuPTPh em metanol.

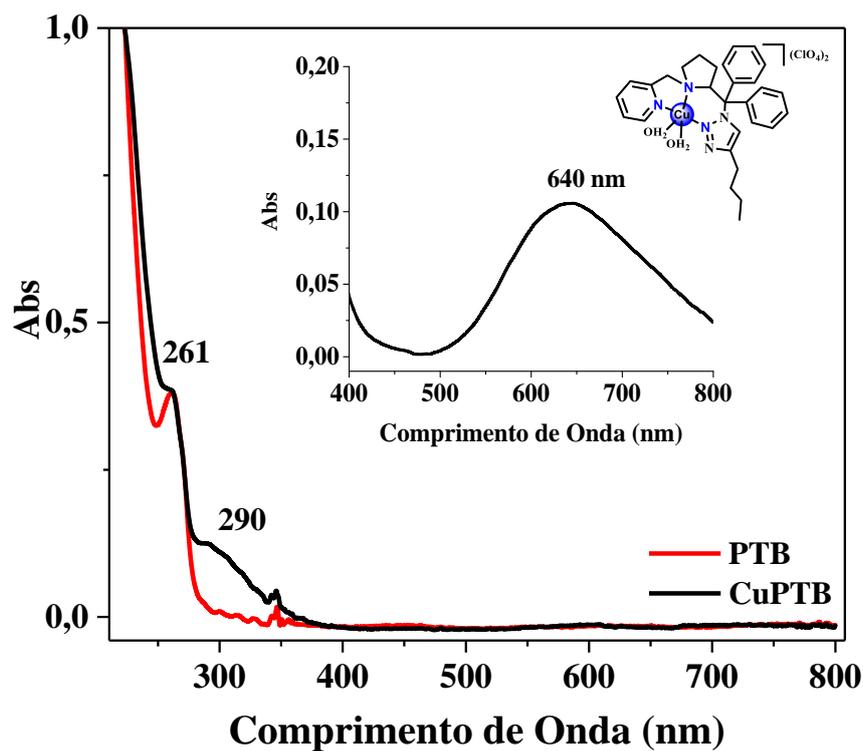


FIGURA 4.7- Espectro de UV-Vis do complexo CuPTB em metanol.

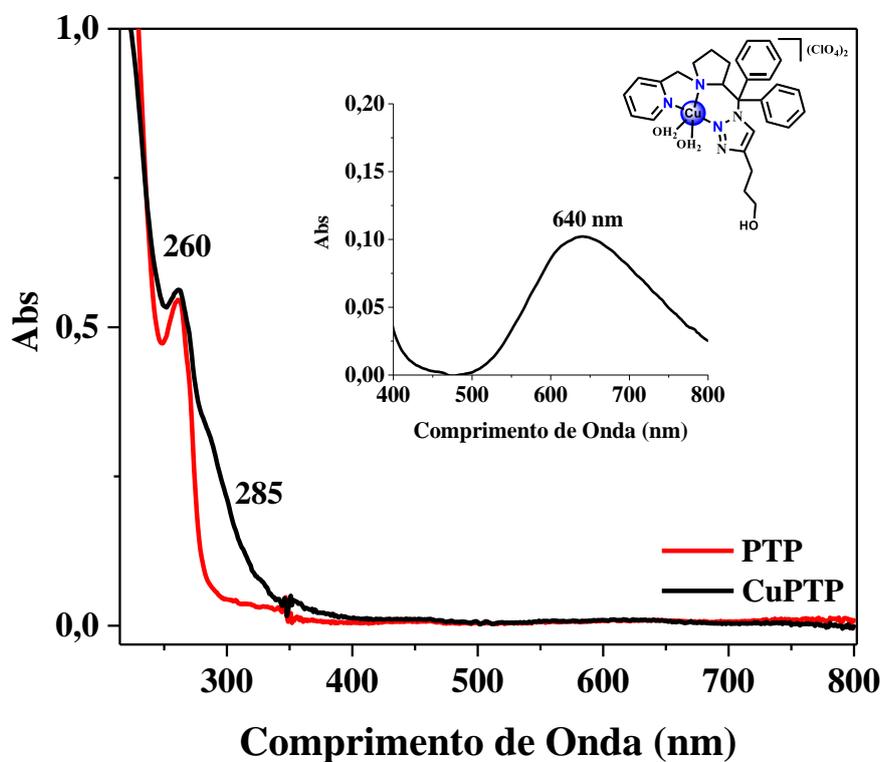


FIGURA 4.8- Espectro de UV-Vis do complexo CuPTP em metanol.

Nos espectros dos complexos de Cu^{2+} , comparando-se com os dos ligantes, observa-se o surgimento de um ombro nas regiões de 311, 290 e 285 nm para os complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP respectivamente, que podem ser atribuídos a transições de transferência de carga do ligante para o metal (LMCT).^{35,82} Na região de menor energia dos espectros dos complexos, é observado as bandas com baixo coeficiente de extinção molar atribuído as transições d-d proibidas. A banda d-d do complexo CuPTPh foi observada em $\lambda_{\text{máx}} = 644 \text{ nm}$ ($\epsilon = 174 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), enquanto os outros dois complexos CuPTB e CuPTP apresentaram as bandas em $\lambda_{\text{máx}} = 640$ ($\epsilon = 96 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 640 ($\epsilon = 90 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O maior valor de absorvidade molar para o CuPTPh, é possivelmente devido aos efeitos eletrônicos do grupo fenil, comparados com os substituintes *n*-butil e *n*-propanol.

Os espectros de UV-Vis dos complexos de Zn^{2+} (Figura 4.9-4.11) não apresentam transições na região visível do espectro, visto sua configuração d^{10} com orbitais completamente preenchidos. Seus espectros são semelhantes aos respectivos ligantes, porém os valores de absorvidade molar das bandas de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ diminuíram após a coordenação. A Tabela 4.4 apresenta os valores dos máximos das bandas de absorção e os valores de absorvidade molar dos complexos e ligantes.

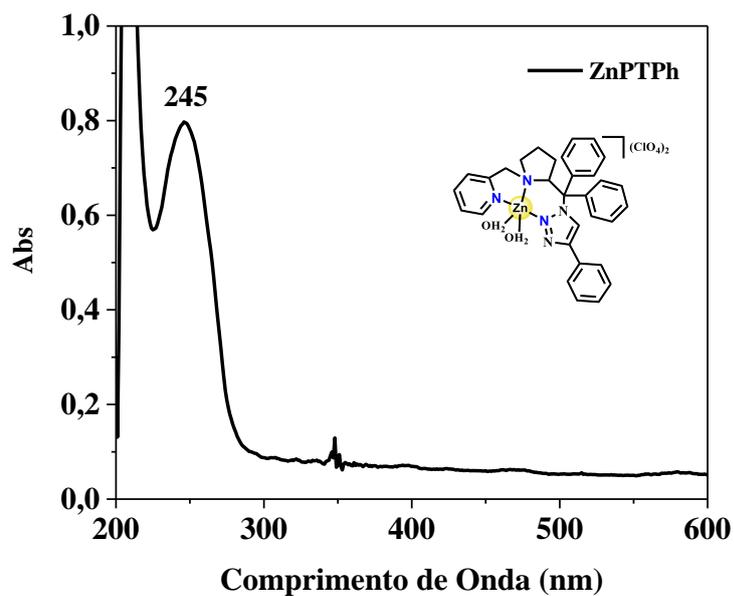


FIGURA 4.9- Espectro de UV-Vis do complexo ZnPTPh em metanol.

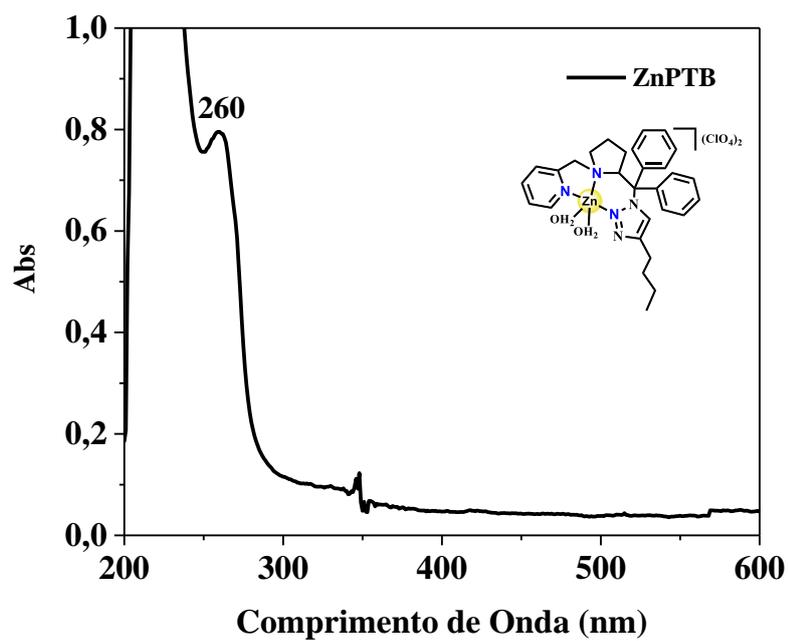


FIGURA 4.10- Espectro de UV-Vis do complexo ZnPTB em metanol.

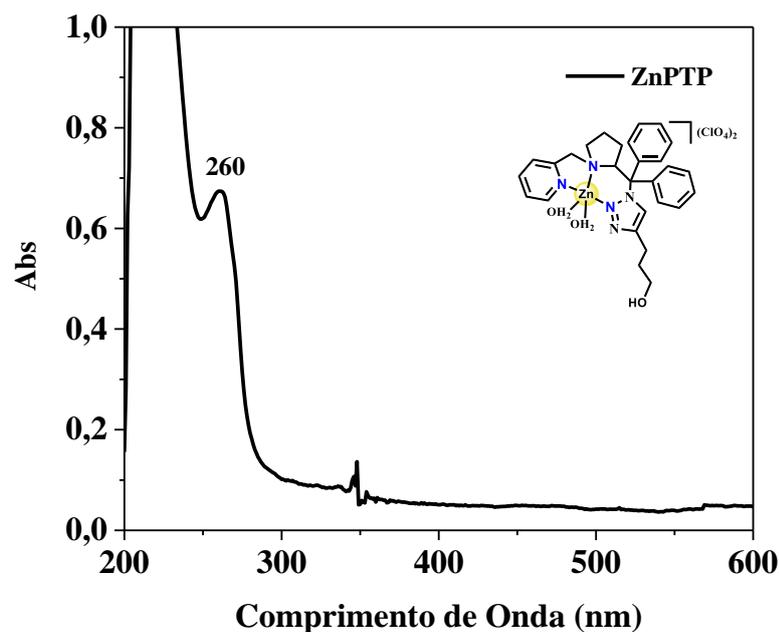


FIGURA 4.11- Espectro de UV-Vis do complexo ZnPTP em metanol.

TABELA 4.4– Tentativa de atribuição das bandas do espectro de UV-Vis e valores de absorvidade molar dos complexos e ligantes.

	LLCT- $\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$ ($\epsilon_{\text{max}} / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	LMCT- $\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$ ($\epsilon_{\text{max}} / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	d-d- $\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$ ($\epsilon_{\text{max}} / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
CuPTPh	242 (20757)	311 (ombro)	644 (174,0)
CuPTB	261 (6083,02)	290 (ombro)	640 (96,84)
CuPTP	260 (3427,7)	285 (ombro)	640 (90,14)
ZnPTPh	245 (14374)	-	-
ZnPTB	260 (2785,8)	-	-
ZnPTP	260 (3427)	-	-
PTPh	245 (16741)	-	-
PTB	264 (4189,1)	-	-
PTP	262 (4297)	-	-

Todas as medidas foram realizadas em MeOH

4.1.5- Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).

As medidas de espectroscopia EPR dos complexos de Cu^{2+} foram realizadas para obter informações sobre a geometria em torno do centro metálico dos três complexos e o comportamento em solução. As análises de EPR foram realizados em solução de metanol em temperatura ambiente (293K) e congelado (77K) sobre nitrogênio líquido (Figura 4.12).

Observa-se que os espectros dos complexos são semelhantes tanto em solução quanto congelados, indicando que os três complexos assumem mesma geometria nessas condições. Os espectros de EPR exibem o padrão de quatro linhas características de complexos de Cu^{2+} o qual é resultante do acoplamento hiperfino do spin do elétron de Cu^{2+} com o spin nuclear $I=3/2$ dos isótopos $\text{Cu}^{63/65}$ (100% abundância natural).

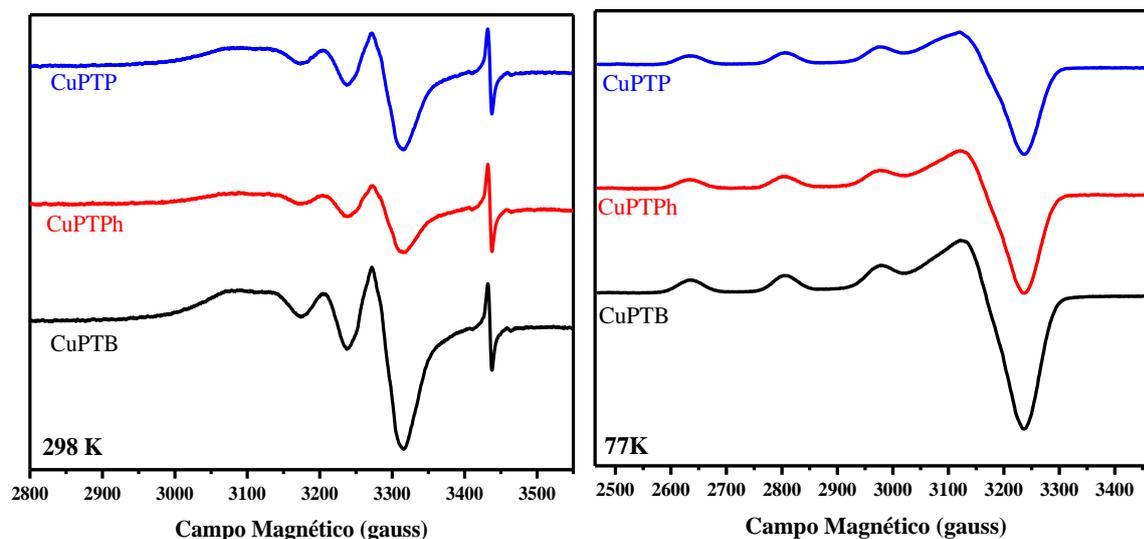


FIGURA 4.12- Espectros de EPR dos complexos de Cu^{2+} em metanol em temperatura ambiente 298 K (esquerda) e em N_2 líquido 77 K (direita).

Os espectros simulados do complexo CuPTP e da primeira derivada foram obtidos usando o programa *Qpow* (Figura 4.13). A primeira derivada do espectro permite uma melhor visualização das linhas super-hiperfinas, as quais

originam-se a partir do elétron não emparelhado do Cu^{2+} com os átomos de nitrogênio ligados.

As simulações fornecem os parâmetros espectrais que são $g_z = 2,2505$; $g_x = 2,0420$ e $g_y = 2,0780$. Observa-se maiores valores de g_z que g_x e g_y , indicando que os complexos são pentacoordenados, com a geometria pirâmide de base quadrada em torno do metal.^{82,83} Os valores médios de g da solução congelada são $g = 2,1235$ que corresponde ao parâmetro g em solução ($g = 2,1248$), portanto, confirmam que os complexos são monômeros tanto a 77 K quanto à temperatura ambiente em solução de metanol.

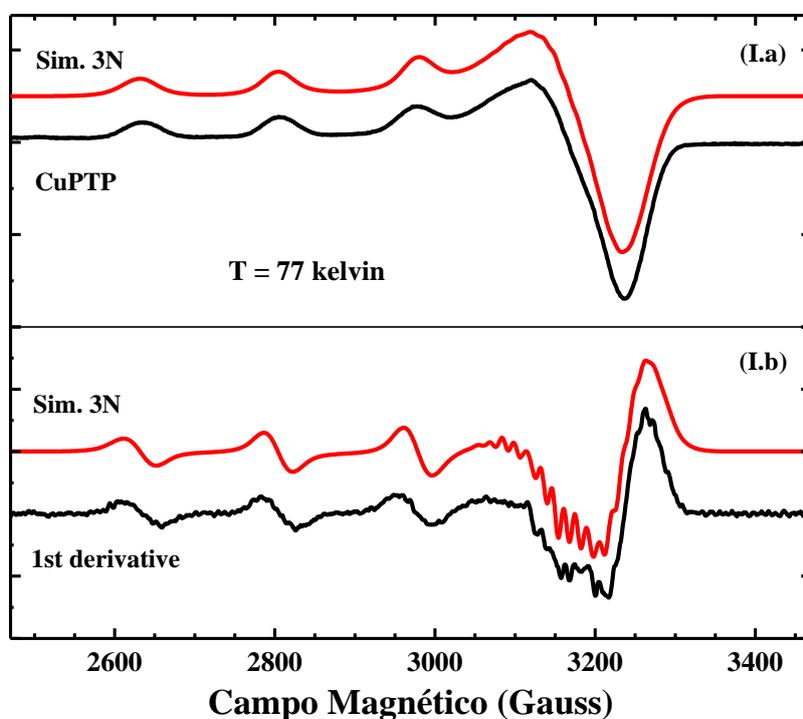


FIGURA 4.13- Espectro de EPR e primeira derivada do complexo CuPTP (preto) em metanol, medidos em temperatura de nitrogênio líquido (77 K). As linhas vermelhas são simulações usando 3 nitrogênios ligados ao íon Cu^{2+} .

Complexos de Cu^{2+} têm configuração d^9 causando a degenerescência dos orbitais moleculares de fronteira dominados pelos orbitais d do metal. Essa degeneração promove uma distorção estrutural Jahn Teller nas simetrias, assim, complexos de Cu^{2+} são frequentemente pentacoordenados.⁸⁴ Além disso, como

observado na estrutura cristalina do CuPTPh (Figura 4.2), os grupos volumosos fenil do ligante (ligado ao triazol e a pirrolidina) impedem a formação de uma estrutura com geometria octaédrica.

4.1.6- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A técnica de RMN fornece informações valiosas acerca da coordenação de ligantes a metais diamagnéticos, como no caso dos complexos de Zn^{2+} . Os espectros dos ligantes e complexos foram registrados em acetona- d_6 e as atribuições dos sinais dos prótons e carbonos foram realizadas com base nos espectros DEPT 135 e nos bidimensionais COSY, HMBC e HSQC. Neste tópico, serão apresentados os espectros de RMN 1H dos complexos comparados com seus respectivos ligantes e RMN ^{13}C (com o DEPT 135) dos complexos, todos com as atribuições dos sinais. Os espectros de RMN ^{13}C dos ligantes e bidimensionais podem ser consultados no Apêndice (Fig. Apêndice 10-31).

Um sinal característico nos espectros de RMN 1H dos ligantes é correspondente ao próton do carbono quiral da pirrolidina que aparece como um duplo dubleto em $\delta = 4,20$ ppm no espectro do composto precursor (4) (Fig. Apêndice 7) e aparecem nos espectros dos três ligantes e complexos. Partindo-se deste iniciou-se as atribuições dos demais sinais.

No espectro de RMN 1H do complexo ZnPTPh (Figura 4.14) o sinal com maior deslocamento químico é atribuído ao próton 6 ($\delta = 8,54$ ppm, s) do anel triazol que desloca para 9,0 ppm após a coordenação. Os sinais 8,9, 10 e 11 da pirrolidina também deslocam para regiões mais desblindadas do espectro. Todos os prótons da pirrolidina apresentam valores de deslocamento químico diferentes, como pode ser observado nos espectros. No anel piridínico, os prótons 14 e 15 são os que sofrem maior influência pela coordenação ao metal, e deslocam para região mais desblindadas.

Os sinais que sofrem um menor deslocamento (ou não deslocam) após a coordenação são sinais dos aromáticos que estão mais distantes do centro

metálico. Na região de $\delta = 4,5$ ppm observa-se um sinal largo com integral para 9 prótons (que encobre o sinal 12), o qual é atribuído a duas moléculas de água coordenadas (como na estrutura cristalina do complexo CuPTPh) e duas moléculas ligadas por pontes de hidrogênio.

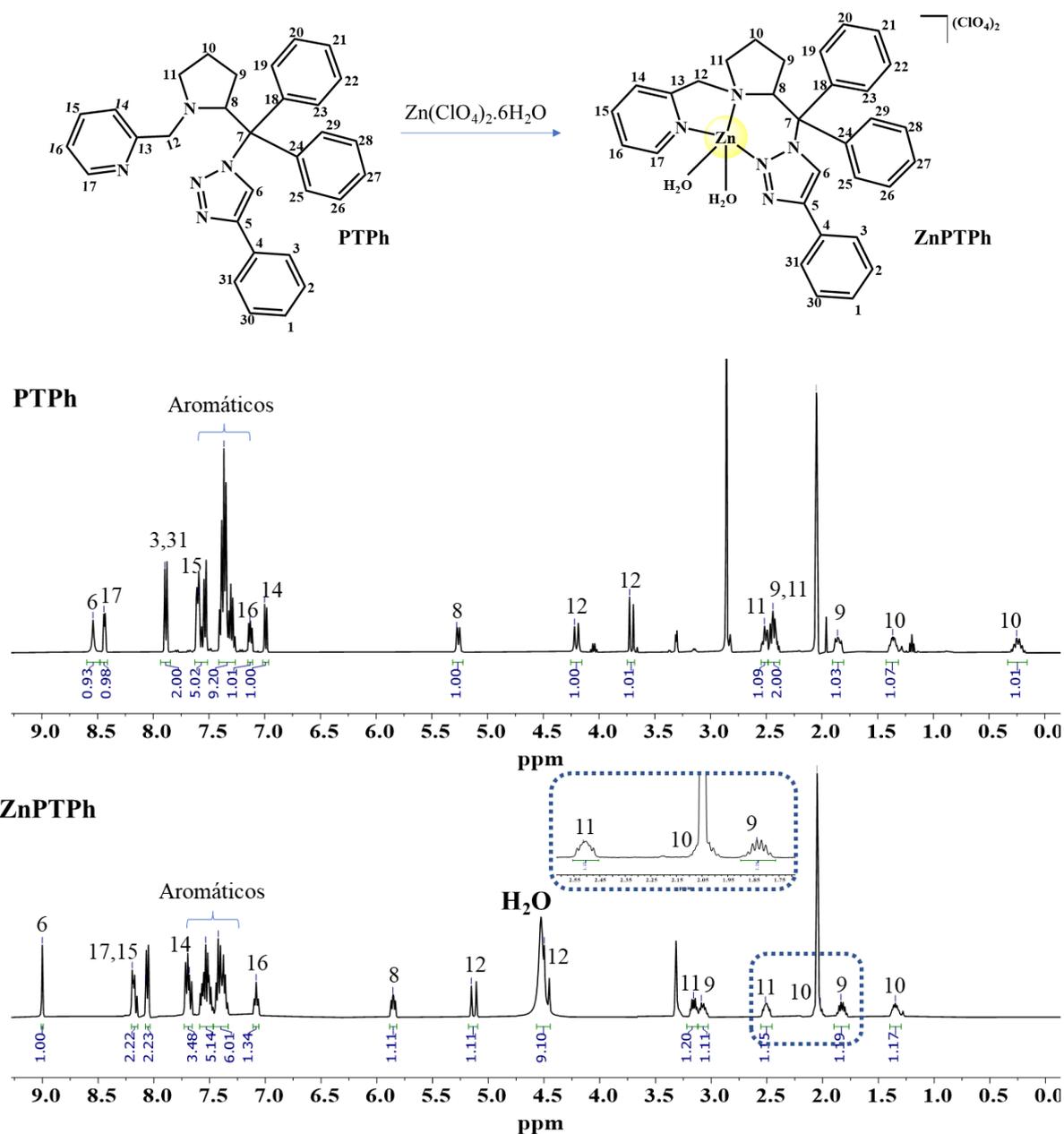


FIGURA 4.14- RMN ^1H do ligante PTPH e do complexo ZnPTPh.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 (Figura 4.15) confirmam a estrutura proposta do complexo ZnPTPh. O espectro DEPT 135 evidencia os sinais dos carbonos CH, CH_2 e CH_3 . Pode-se observar os 4 sinais

para baixo, referente aos quatro carbonos CH₂ do complexo ZnPTPh. O sinal em $\delta=30$ ppm do CH₂ está bem próximo ao sinal do solvente (Acetona). O sinal do carbono mais desblindado do espectro não apresenta correlação com nenhum sinal de hidrogênio, como pode ser observado pelo HMBC (Fig. Apêndice 27) e o DEPT 135, indicando que este é um carbono quaternário. No HMBC, há uma correlação entre os prótons 12 e o carbono 13, confirmando que este sinal é referente ao carbono 13 da piridina. Na região dos aromáticos, os sinais mais desblindados são referentes aos carbonos 13,17 e 15 da piridina, seguido dos carbonos 5 triazol e 4 do substituinte fenil.

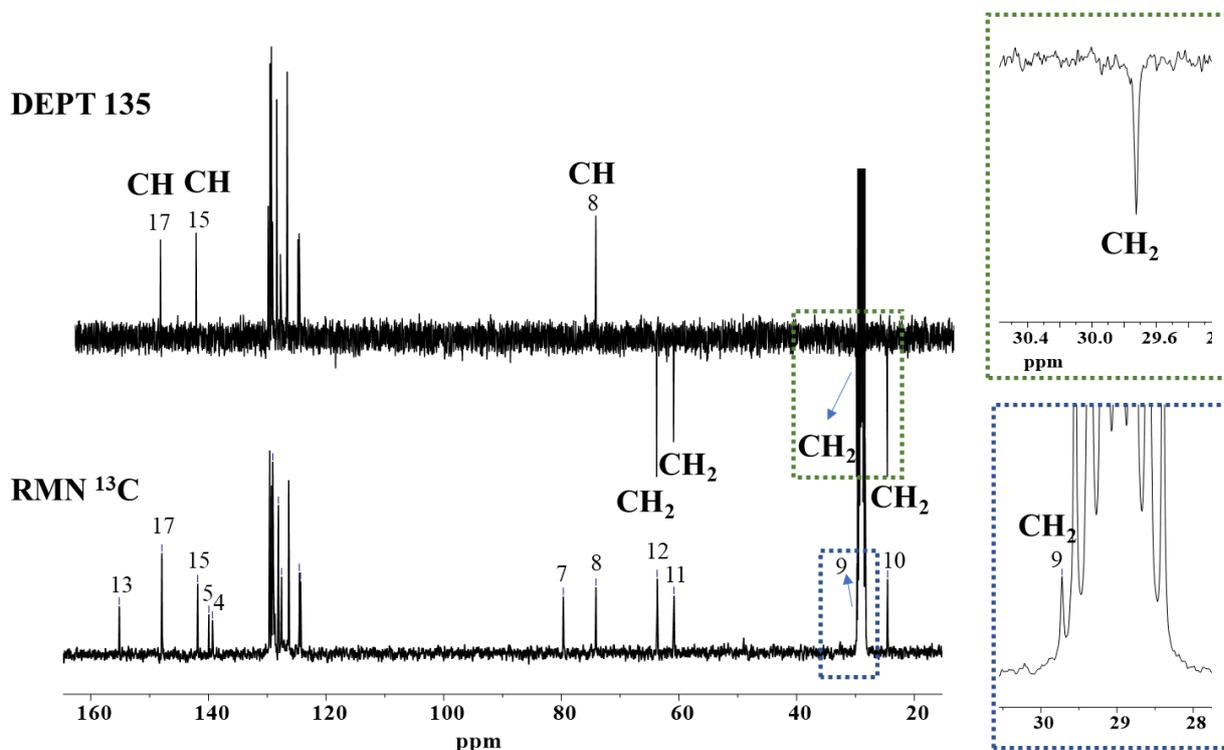


FIGURA 4.15- RMN ¹³C e DEPT 135 do complexo ZnPTPh.

No espectro do ligante PTB (Figura 4.16) observa-se que o singlete em $\delta =7,71$ referente ao próton 6 do anel triazol (s, 1H), desloca para $\delta =8,30$ ppm no espectro do complexo ZnPTB. Observa-se que no ligante o sinal mais desblindado é referente ao próton 17 do anel piridínico, após a coordenação esse sinal desloca para uma região mais blindada no espectro do ZnPTB. Os sinais 14 e 15 ficam mais blindados. Os sinais do grupo *n*-butil foram observados em δ

=0,86 (3H, t), 1,31 (2H, m), 1,57 (2H, m) e 2,63 (2H, t) ppm. Estes sinais sofrem um menor deslocamento após a coordenação devido à distância destes ao sítio metálico.

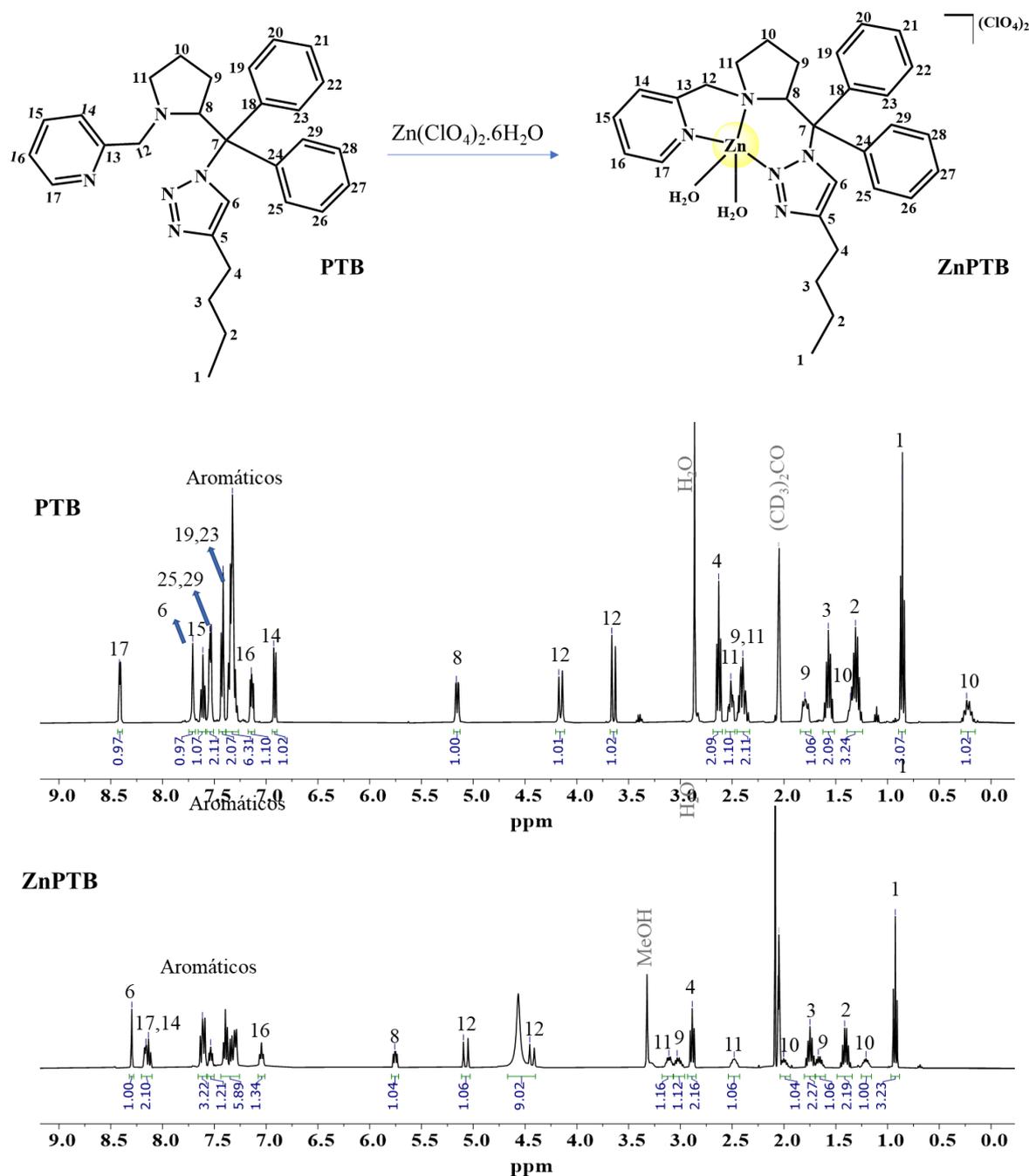


FIGURA 4.16- RMN ^1H do ligante PTB e do complexo ZnPTB.

No espectro RMN ^{13}C e DEPT 135 do complexo ZnPTB (Figura 4.17) observa-se que o sinal referente ao CH_3 do substituinte *n*-butil aparece na região dos sinais alifáticos, sendo o mais blindado do espectro. Três sinais

adicionais CH₂ foram observados, comparado com o espectro RMN ¹³C do ZnPTPh, que são referentes ao grupo *n*-butil.

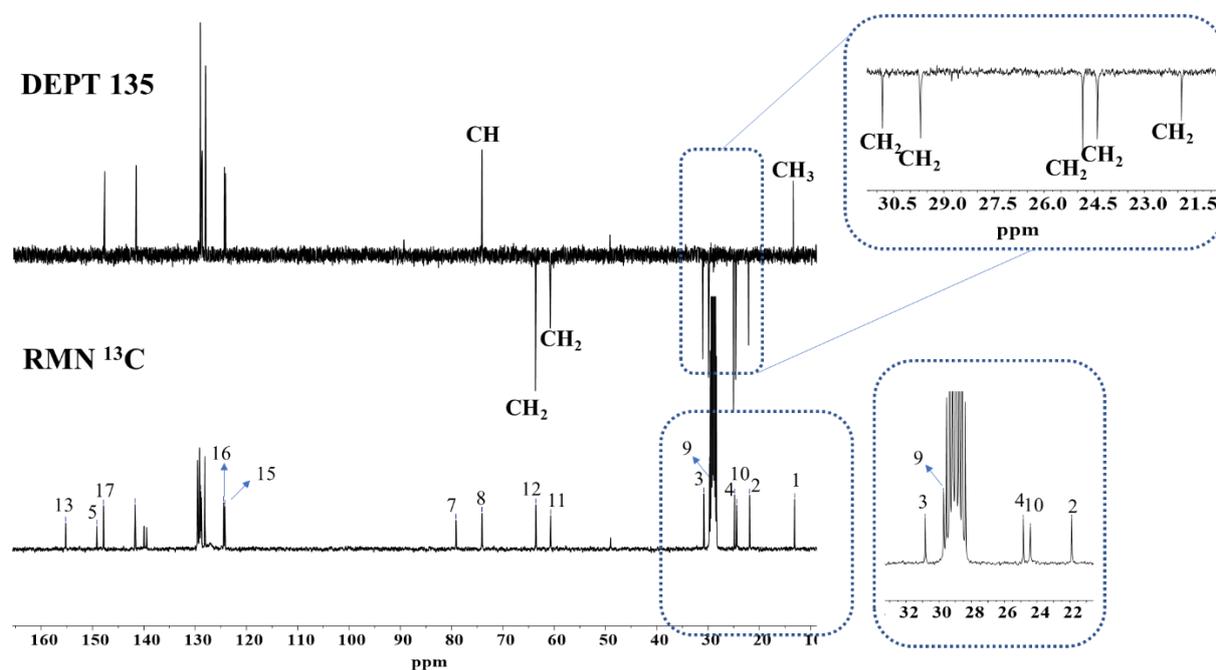


FIGURA 4.17- RMN ¹³C e DEPT 135 do complexo ZnPTB.

A estrutura do ligante PTP é evidenciada pelos sinais do grupo *n*-propanol no espectro de RMN ¹H (Figura 4.18) que aparecem em $\delta = 3.54$ (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.80 (m, 3H) e 2.72 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H) ppm para os prótons 1,2 e 3. O sinal largo em $\delta = 3,7$ ppm é atribuído ao próton do grupo OH, como pode ser observado no espectro HSQC (Fig. Apêndice 30), esse sinal não tem correlação com carbono. Seguindo a tendência dos outros complexos, os sinais da piridina, triazol e pirrolidina também deslocam para regiões mais desblindadas, porém os sinais 1,2 e 3 mais distantes do metal sofrem um menor deslocamento após a coordenação. No entanto, o próton do grupo OH desloca de $\delta = 2,90$ (s, 1H) para $\delta = 3,78$ (s, 1H), que pode ser devido à interação com as moléculas de água coordenadas.

No espectro de RMN ¹³C (Figura 4.19) observa-se os sete sinais dos grupos CH₂ da molécula. Os sinais 1 e 10 apresentam-se sobrepostos em $\delta = 60,0$ ppm, como indica o HSQC (Fig. Apêndice 30). Assim como no complexo ZnPTB,

nos espectros de RMN ¹³C do complexo ZnPTP os sinais mais desblindados são referentes aos carbonos 12 e 4 da piridina e do triazol, respectivamente.

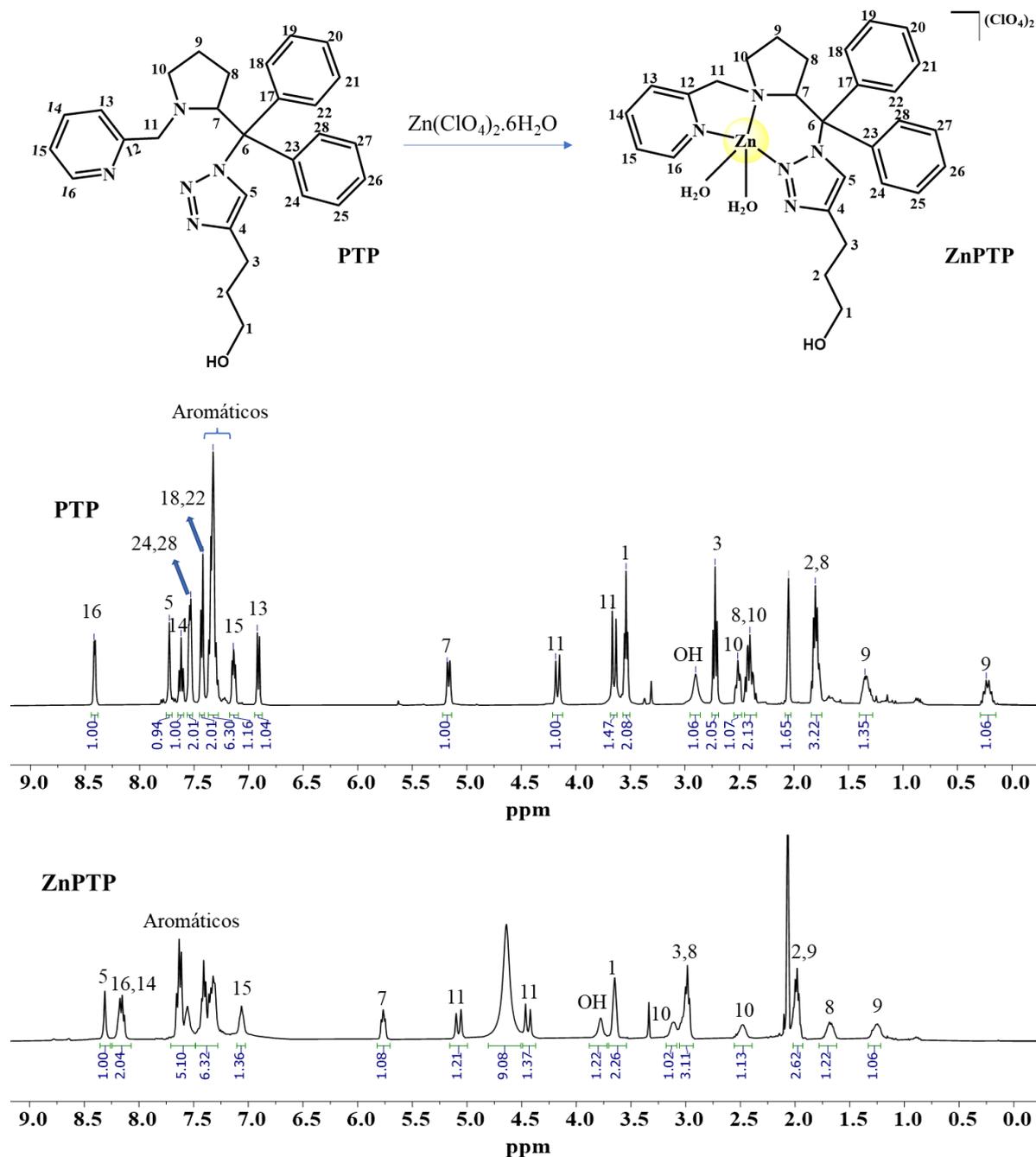


FIGURA 4.18- RMN ¹H do ligante PTP e do complexo ZnPTP.

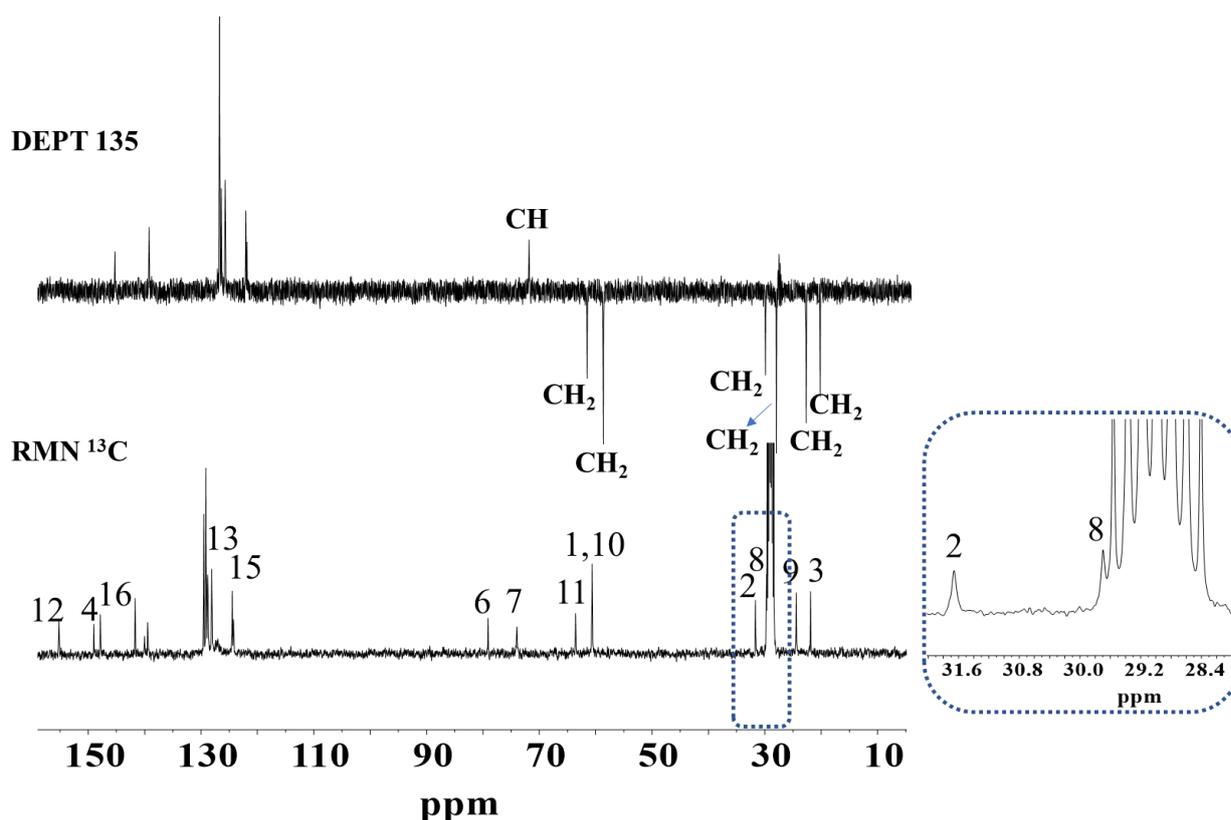


FIGURA 4.19- RMN ¹³C e DEPT 135 do complexo ZnPTP.

Nos espectros dos três complexos é observado o sinal do metanol proveniente das sínteses. As moléculas de água coordenadas aparecem na mesma região nos espectros dos complexos, indicando que os compostos têm a mesma influência sobre a molécula de água coordenada.

Desta forma, o deslocamento dos sinais dos três complexos com relação aos ligantes evidencia que ocorreu a coordenação dos ligantes tridentados ao Zn²⁺. A esfera de coordenação é completada com duas moléculas de água para a obtenção dos complexos pentacoordenados. Esses dados corroboram com as análises de infravermelho (que indicam uma semelhança dos complexos de Zn²⁺ aos de Cu²⁺ pentacoordenados) e os resultados de análise elementar.

4.1.7- Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica das soluções 1mmol.L⁻¹ dos complexos de Cu²⁺ contendo PTBA 0,1 mol.L⁻¹ foram realizadas em metanol e sob atmosfera de

argônio para se obter os voltamogramas que estão ilustrados na Figura 4.20. Os complexos apresentam o processo do par redox $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ com $E_{1/2} = 0,16; 0,14$ e $0,12$ V vs Ag/AgCl (3,5M) para os complexos CuPTP, CuPTB e CuPTPh, respectivamente.

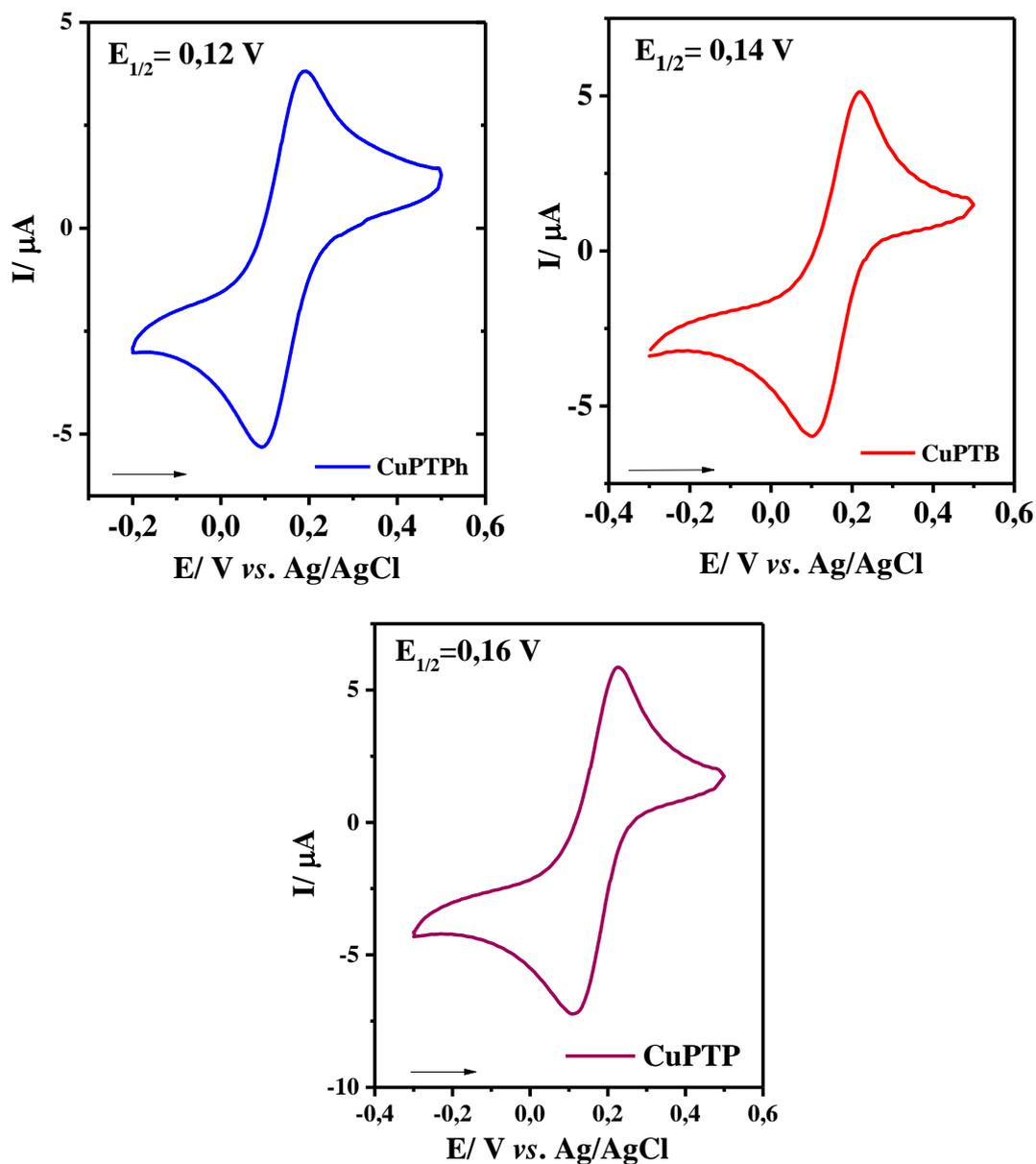


FIGURA 4.20- Voltametria cíclica da solução 1mmol.L^{-1} dos complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP em metanol contendo PTBA $0,1\text{ mol.L}^{-1}$. Velocidade de varredura= 100mV/s .

Variando-se a velocidade de varredura da solução do complexo CuPTPh, foram obtidos os voltamogramas da Figura 4.21. Com esses valores foi plotado o gráfico das correntes de pico (I_p) *versus* $v^{1/2}$, onde foi observado um comportamento linear para as correntes anódicas e catódicas. O aumento das correntes de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura é indicado pela equação de Randles-Sevcik que a reação eletroquímica ocorre por difusão, e indica também um comportamento reversível.^{85,86} Essa tendência foi observada nos três complexos (Fig. Apêndice 2 e 3).

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Equação (7)}$$

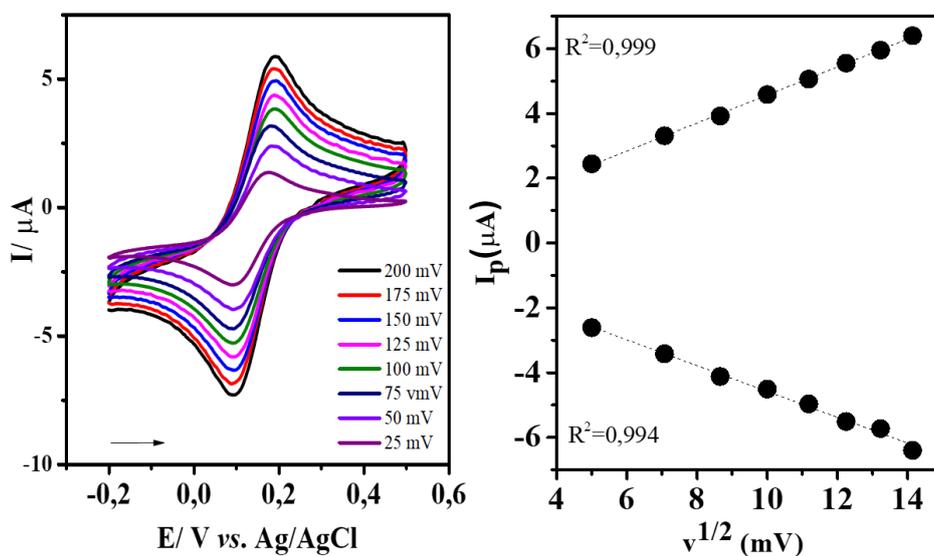


FIGURA 4.21- Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura para o eletrodo de carbono vítreo na presença do íon complexo CuPTPh (esquerda) e gráfico de i_p versus $v^{1/2}$ (direita).

O comportamento reversível desses complexos ocorre devido ao ambiente de ligação “NNN” tridentado, que promove mais estabilidade ao centro metálico e mobilidade da molécula em mudar de geometria quando reduzido para Cu^+ .⁴⁵ Esse comportamento é importante para aplicação dos complexos em

catálises envolvendo transferências de elétrons, visto que sistemas irreversíveis podem levar à formação de diferentes compostos.⁸⁷

Os valores de $E_{1/2}$ dos complexos na região positiva, sugerem que estes compostos quando reduzidos para Cu^+ são relativamente estáveis na presença de O_2 e mais seletivos para a redução do nitrito, comparados aos complexos com potencial de redução na região negativa.^{88,37}

Os complexos de Zn^{2+} não apresentaram processos redox do centro metálico na faixa eletroquímica estudada, portanto, seus voltamogramas apresentam somente os mesmos processos que ocorrem nos ligantes livres, com pequenas alterações (Fig. Apêndice 32).

4.1.8- Espectrometria de Massas

Os três ligantes e os complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+} foram caracterizados por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). Os valores obtidos das fragmentações apresentaram erros abaixo de 4,02 ppm. A Tabela 4.5 descreve os valores calculados e encontrados com a devida atribuição.

Os ligantes neutros foram ionizados pelo método de ionização química com metano. Os espectros estão ilustrados nas Figuras 4.22 – 4.24. A massa dos ligantes PTPH, PTB e PTP foram encontradas para $[\text{MH}]^+$ e observa-se nos espectros os picos em m/z 472,2520; 452,2809 e 454,2607 atribuídos ao íon molecular de cada composto, respectivamente.

TABELA 4.5- Fragmentos de massas para os ligantes e complexos.

Composto	Calculado, <i>m/z</i>	Experimental, <i>m/z</i>	Erro, ppm	Atribuição
PTPh	472.2501	472.2520	4,02	[PTPh+H] ⁺
PTB	452.2814	452.2809	1,11	[PTB+H] ⁺
PTP	454.2606	454.2607	0,22	[PTP+H] ⁺
CuPTPh	534.1718	534.1719	0,18	[CuPTPh] ⁺
CuPTB	613.1517	613.1519	0,32	[PTBCu] ⁺
CuPTP	516.1824	516.1824	0	[PTPCu] ⁺
ZnPTPh	634,1200	634,1193	1,10	[ZnPTPhClO ₄] ⁺
ZnPTB	614,1513	614,1517	0,65	[ZnPTBClO ₄] ⁺
ZnPTP	—	—	—	—

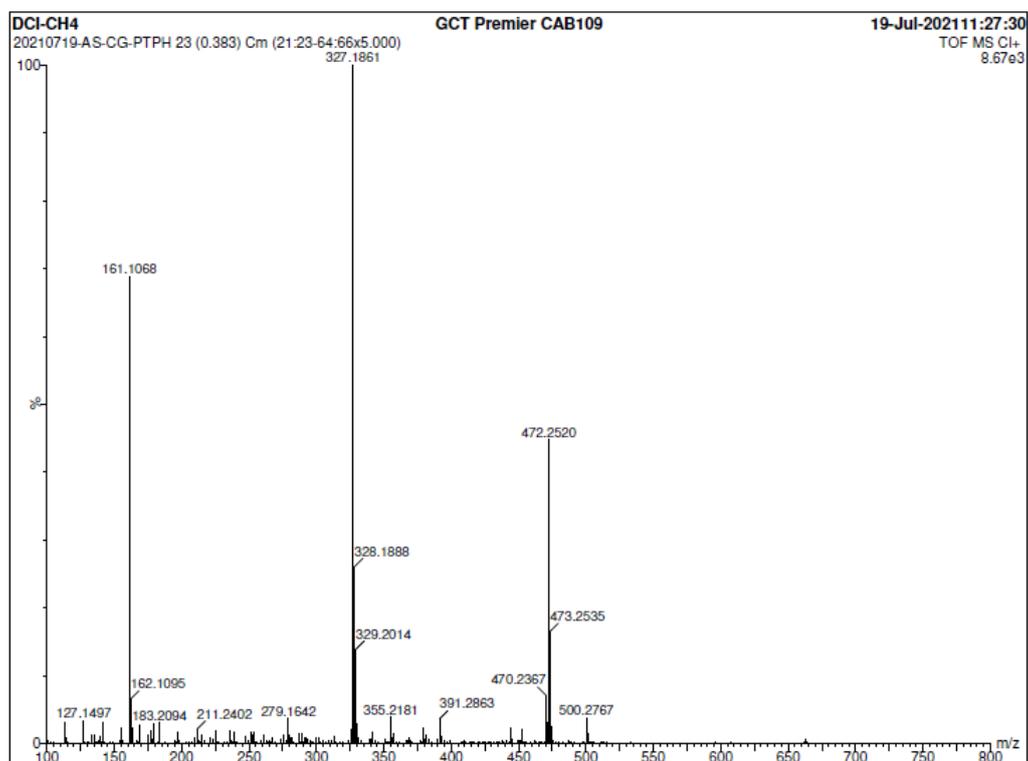


FIGURA 4.22- Espectro de massas do ligante PTPH.

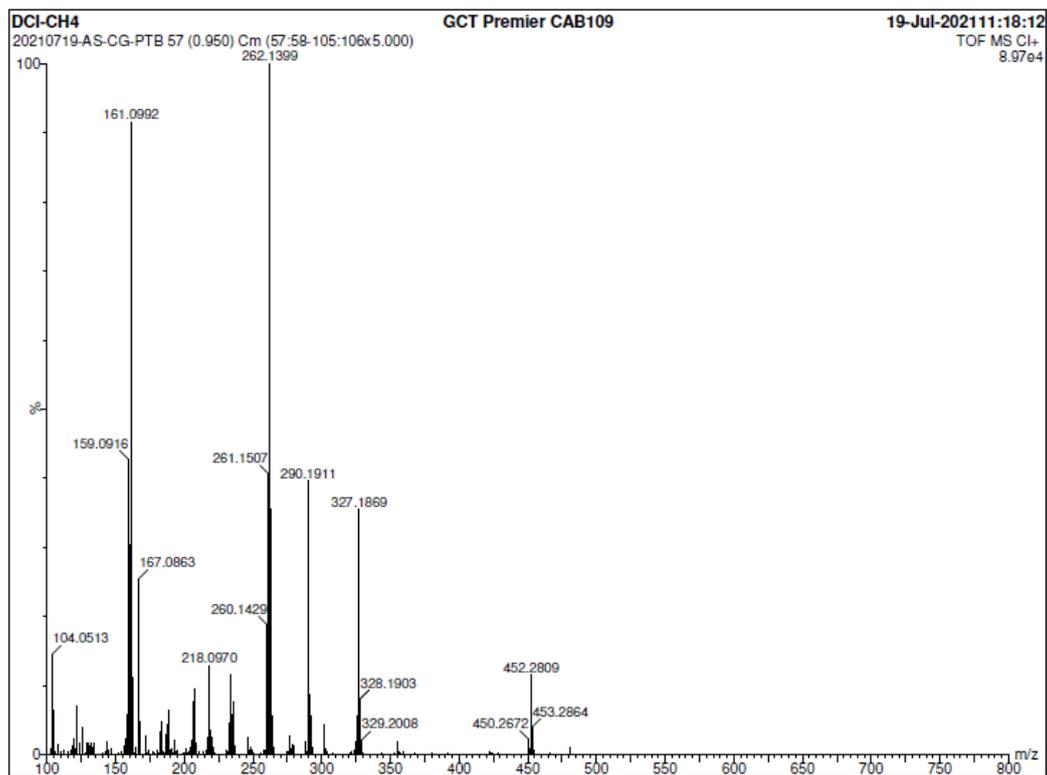


FIGURA 4.23- Espectro de massas do ligante PTB.

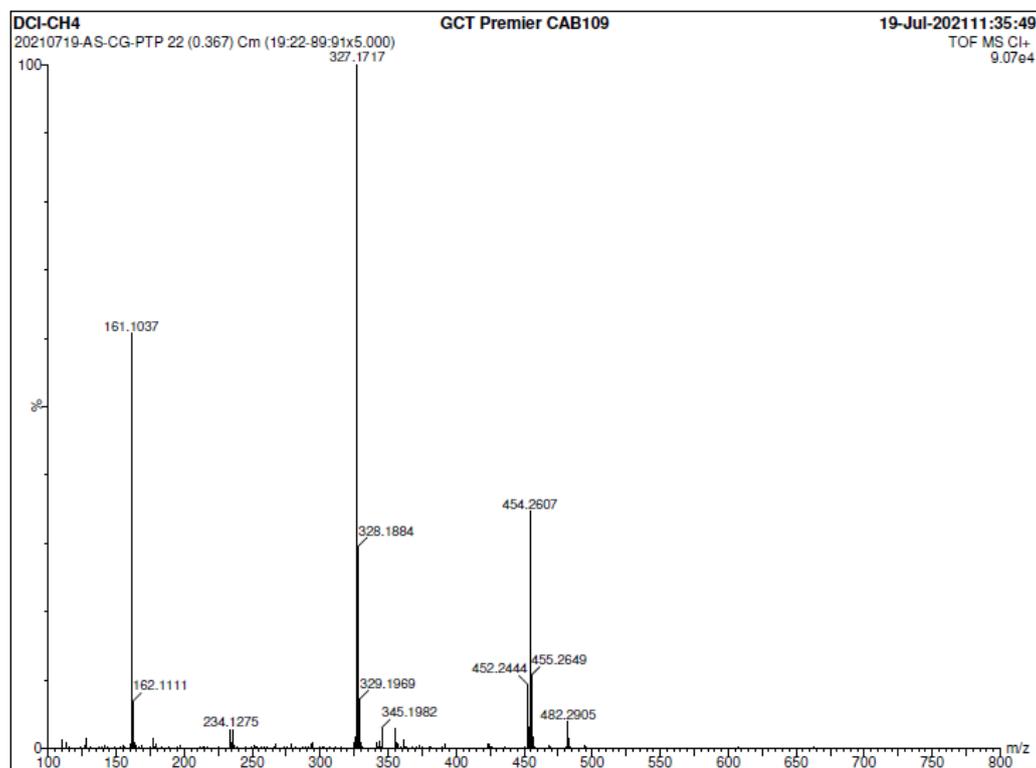
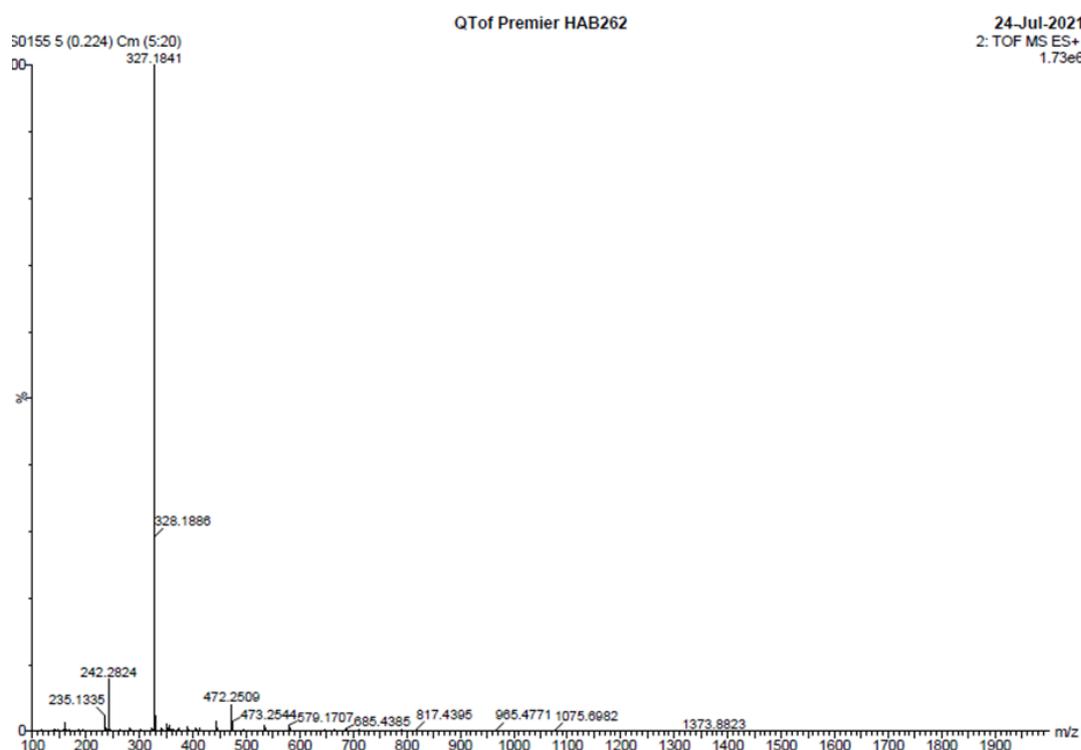


FIGURA 4.24- Espectro de massas do ligante PTP.

Para os complexos utilizou-se a técnica de ionização eletrospray (ESI). Os picos relativos à razão m/z dos complexos de cobre foram encontrados com baixa intensidade. Os espectros (e a expansão da região relativa à razão m/z dos complexos) são ilustrados nas Figuras 4.25-4.27. Foi observado que os complexos de cobre duplamente carregados, foram reduzidos para as espécies unicamente carregadas $[\text{Cu}(\text{PTPh})]^+$, $[\text{Cu}(\text{PTB})]^+$ e $[\text{Cu}(\text{PTP})]^+$. Esse processo de redução de carga é comum para cátions metálicos gasosos carregados sob as condições do ESI.⁸⁹

A Figura 4.28 e 4.29. apresentam os espectros de massas dos complexos ZnPTPh e ZnPTB. Estes também foram encontrados como espécies unicamente carregadas, devido a coordenação com um ânion perclorato $[\text{ZnPTPhClO}_4]^+$ e $[\text{ZnPTBClO}_4]^+$ que contribui com uma carga negativa, tornando a carga total do complexos +1. Assim como nos complexos de cobre, nos compostos de zinco também foram observados que na fase gasosa ocorre a perda das duas moléculas de água na esfera de coordenação.



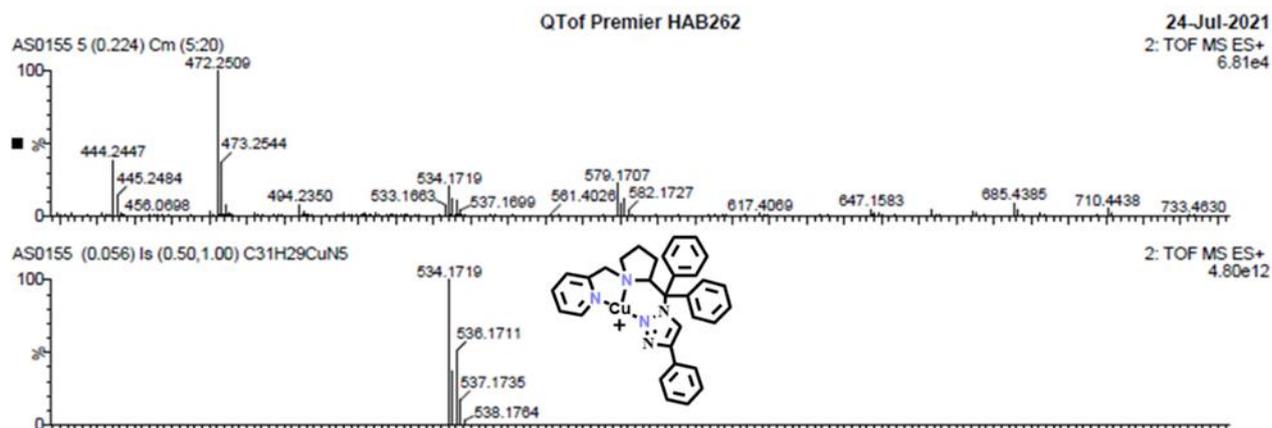


FIGURA 4.25-Espectro de massas do complexo CuPTPh.

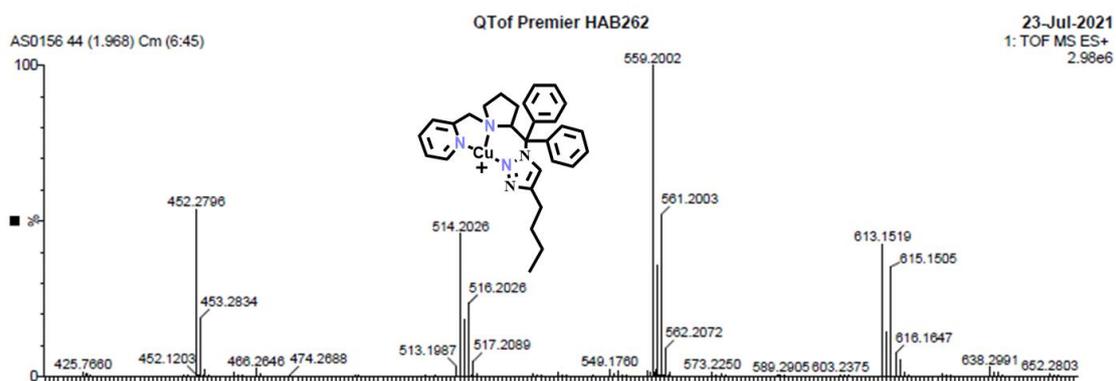
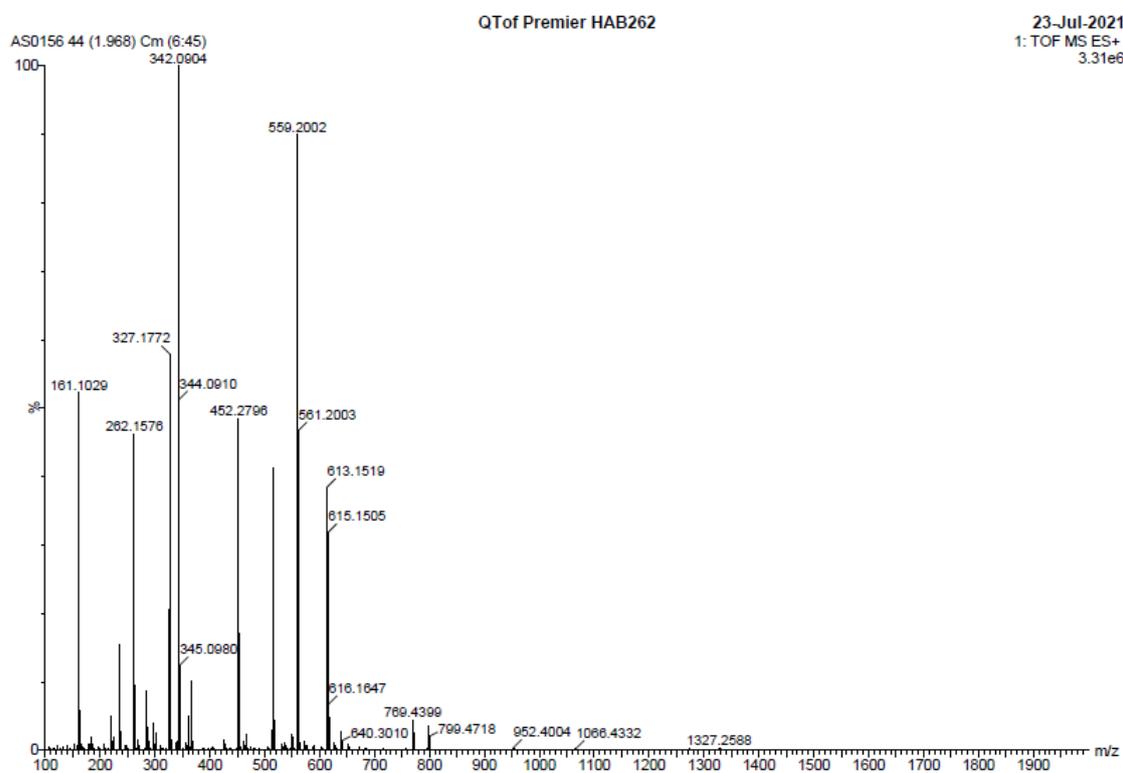


FIGURA 4.26- Espectro de massas do complexo CuPTB.

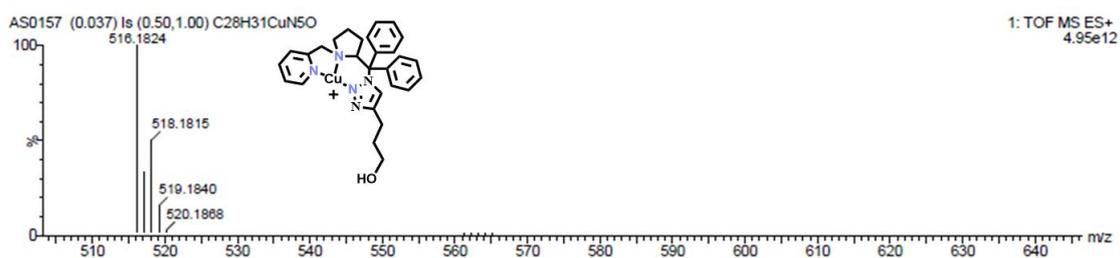
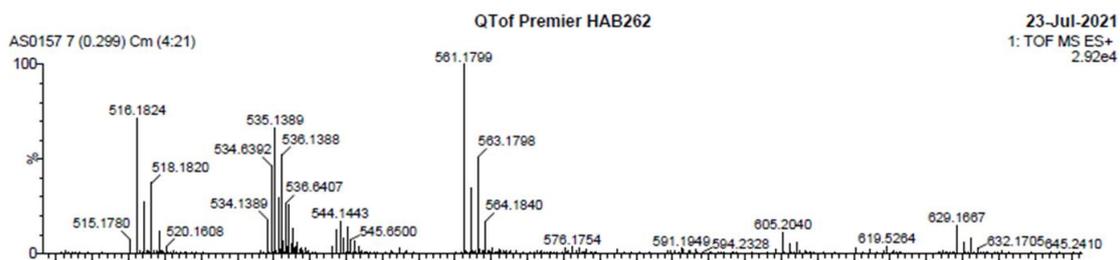
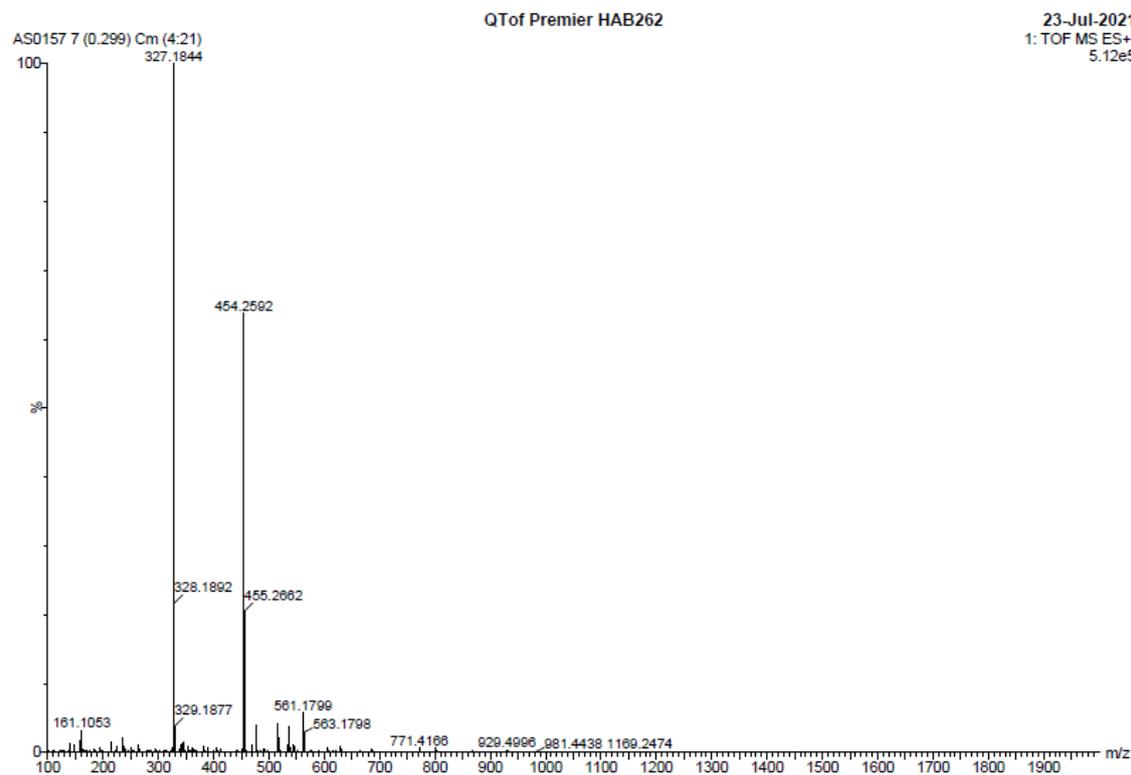
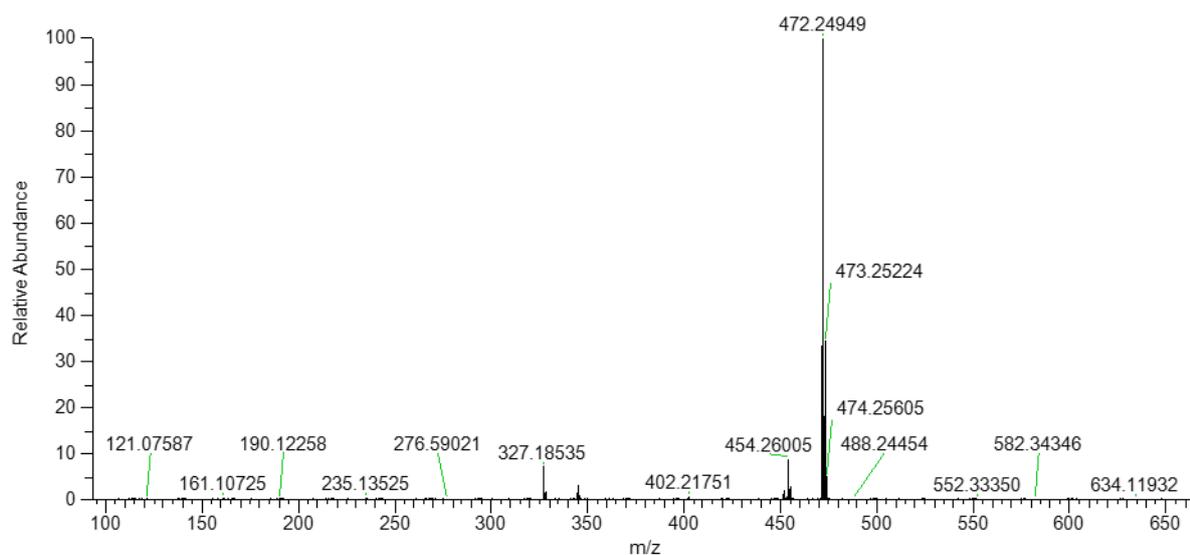


FIGURA 4.27- Espectro de massas do complexo CuPTP.

EX3387 #6-170 RT: 0.05-1.48 AV: 165 NL: 1.75E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-650.0000]



EX3387 #6-170 RT: 0.05-1.48 AV: 165 NL: 8.39E+003
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-650.0000]

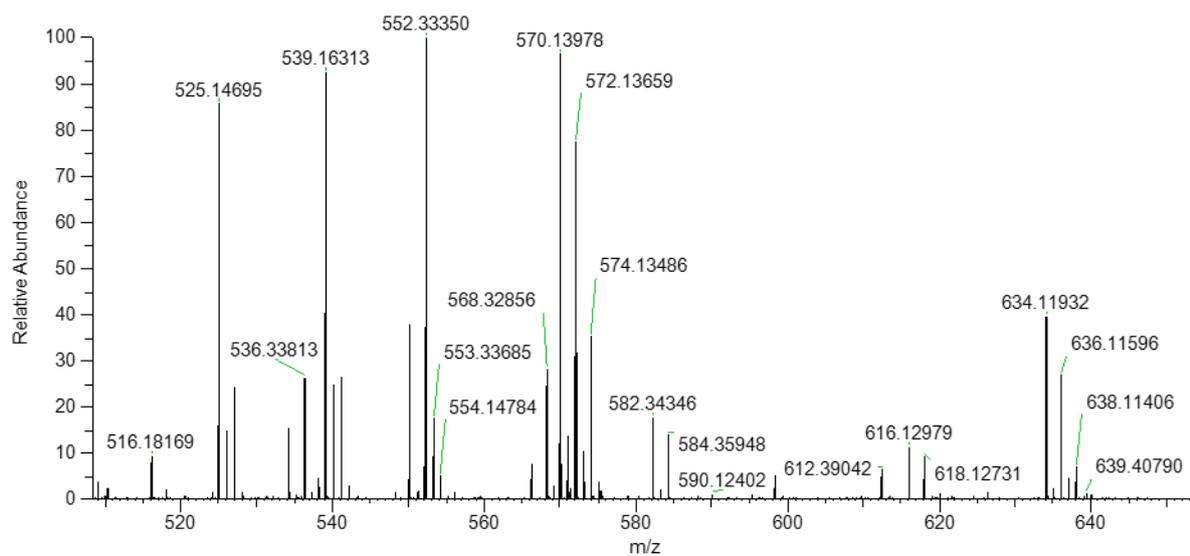
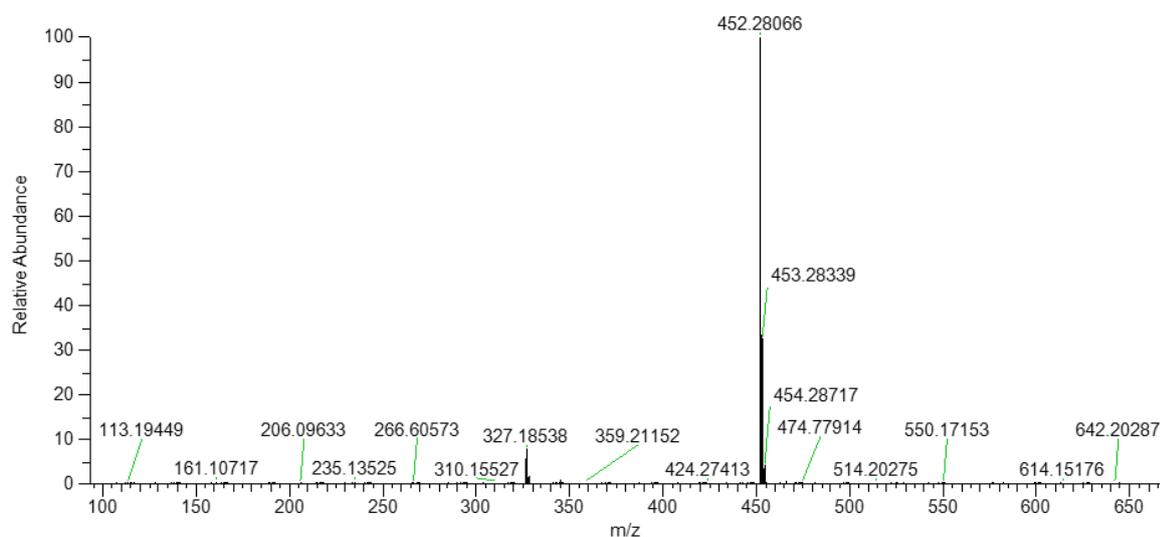


FIGURA 4.28- Espectro de massas do complexo ZnPTPh.

EX3385 #12-167 RT: 0.1-1.46 AV: 156 NL: 3.78E+007
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-650.0000]



EX3385 #12-167 RT: 0.1-1.46 AV: 156 NL: 3.78E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-650.0000]

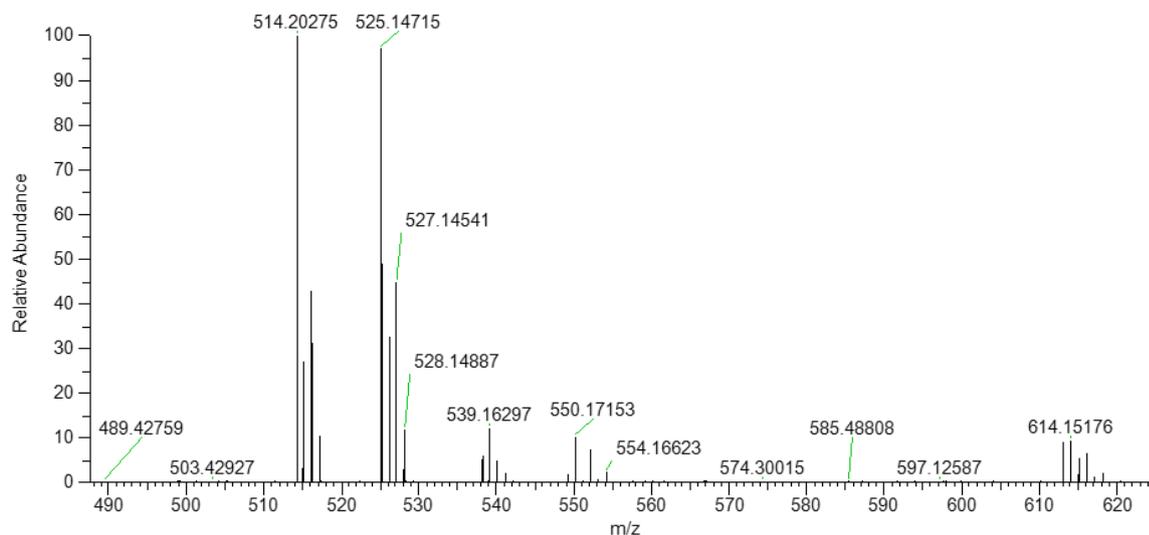


FIGURA 4.29- Espectro de massas do complexo ZnPTB.

Portanto, a espectrometria de massa confirma as estruturas propostas para os ligantes e suas coordenações ao centro metálico de zinco e cobre. Os valores de erro (Tabela 4.5) confirmam as atribuições realizadas.

4.2- Atividade mimética nitrito redutase dos complexos de Cu^{2+}

Nos estudos de atividade mimética dos complexos foram avaliados inicialmente a coordenação do nitrito e a influência da adição do ácido nas soluções. Em seguida foram realizados os ensaios de catálise química e

eletroquímica, para finalmente propor um mecanismo de redução de nitrito pelos complexos de cobre deste trabalho.

4.2.1- Coordenação do nitrito

A primeira etapa do ciclo catalítico da CuNiR é a coordenação do substrato, logo é muito importante que este coordene ao sítio metálico para que ocorra a reação. A coordenação do nitrito aos complexos de cobre foi evidenciada pelas técnicas UV-Vis, infravermelho, condutividade iônica e EPR.

Os complexos de Cu^{2+} quando solubilizados em metanol apresentaram coloração azul e a adição de 1 equivalente de NaNO_2 causou uma rápida mudança de cor da solução para verde escuro como pode ser observado na Figura 4.30.

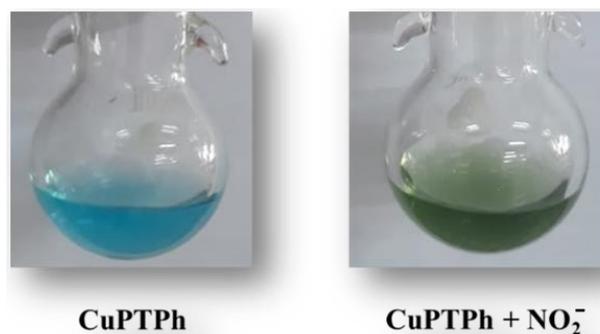


FIGURA 4.30- Foto das soluções do CuPTPh com e sem o nitrito.

A titulação de uma solução 1,2 mM do CuPTPh ($\mu=0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ PTBA) com uma solução de nitrito é apresentada na Figura 4.31. No espectro de UV-Vis observa-se que a banda de transição d-d em 644 nm do CuPTPh deslocasse para 580 nm, esse deslocamento para regiões de maior energia ocorre devido a coordenação do ligante NO_2^- de campo mais forte, que causa um maior desdobramento do campo cristalino. Além disso, observa-se também o surgimento de uma banda em 373 nm que pode ser atribuída a banda de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) nitrito de acordo com relatos semelhantes na literatura.⁴⁶ Quando a concentração do nitrito alcança 1,2

mM os valores de absorvância permanecem praticamente inalteradas, indicando que a coordenação do nitrito aos complexos de cobre ocorre em uma proporção 1:1, de acordo com a Equação (8). As pequenas variações na absorvância após a $[\text{NO}_2^-] > 1.2 \text{ mM}$ é devido ao NO_2^- livre que absorve fracamente em $\lambda_{\text{máx}} = 352 \text{ nm}$ ($\epsilon = 26 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em solução de metanol.³⁵ A banda d-d dos complexos CuPTB e CuPTP seguem a mesma tendência e também deslocam para 580 nm após a adição de NO_2^- (Fig. Apêndice-33).

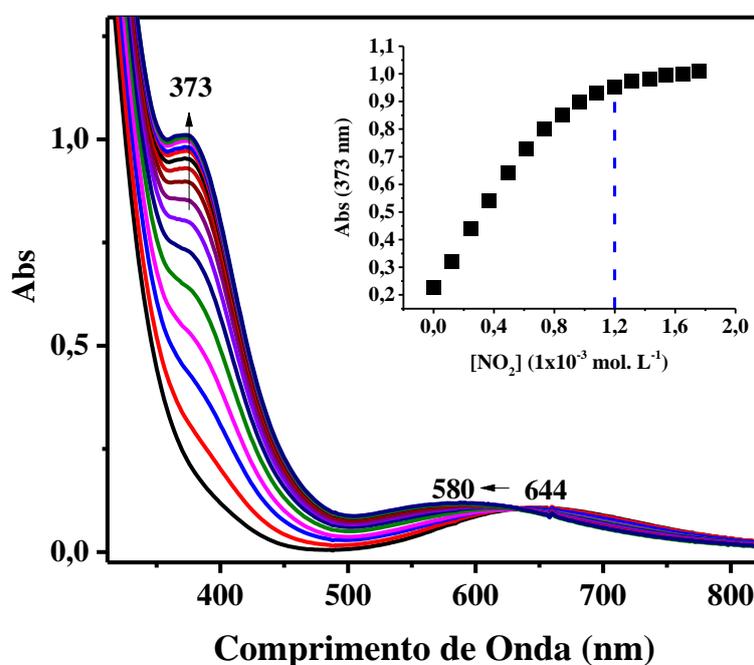


FIGURA 4.31-Mudanças espectrais durante a titulação do complexo CuPTPh 1,2 mM ($\mu = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ PTBA) com nitrito em metanol. Gráfico da concentração do nitrito vs absorvância em 373nm.

A condutividade iônica de uma solução 1mM dos complexos em metanol também indicam a presença de um eletrólito 1:1 com os valores de $\Lambda_m = 88,0 \pm 0,4$; $82,7 \pm 0,8$ e $88,5 \pm 0,6 \mu\text{S cm}^{-1}$ para os complexos $[\text{Cu}(\text{PTPh})(\text{NO}_2)](\text{ClO}_4)$, $[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{NO}_2)](\text{ClO}_4)$ e $[\text{Cu}(\text{PTP})(\text{NO}_2)](\text{ClO}_4)$, respectivamente.

As soluções dos complexos de cobre contendo 1 equivalente de NaNO_2 foram secas e lavadas com água para que fossem feitas as caracterizações no estado sólido.

Uma das técnicas que pode ser muito útil para distinguir entre os possíveis modos de coordenação do NO_2^- é a espectroscopia na região do infravermelho. Cada modo de coordenação apresenta uma banda em região característica. A coordenação do íon nitrito pode ocorrer por três possíveis modos de coordenação, os quais são os mais comuns estão ilustrados na Figura 4.32.

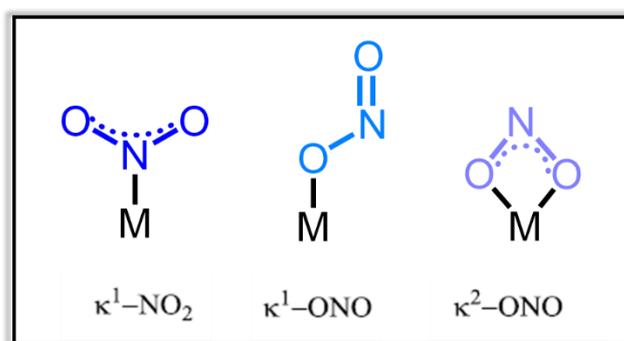


FIGURA 4.32- Modos mais comuns de coordenação do nitrito.

Nos nitro complexos a coordenação acontece pelo nitrogênio ($\kappa^1\text{-NO}_2$)³³ e as bandas dos modos de vibração $\nu_s(\text{NO}_2)$ e $\nu_{\text{ass}}(\text{NO}_2)$ aparecem no espectro em 1470–1370 e 1340–1320 cm^{-1} , respectivamente. Quando coordenado por um dos átomos de oxigênio ($\kappa^1\text{-ONO}$),⁹⁰ o grupo nitrito apresenta bandas de vibrações em regiões mais separadas de $\nu(\text{N=O})$ e $\nu(\text{NO})$, em 1485-1400 e 1110-1050 cm^{-1} , respectivamente. Quando o grupo nitrito é quelante ($\kappa^2\text{-ONO}$)^{19,90-92} os modos vibracionais de $\nu(\text{N=O})$ e $\nu(\text{NO})$ deslocam para menor e maiores frequências respectivamente, com relação aos do complexo unidentado. Essa separação fica menor que aquelas dos complexos unidentados e as bandas aparecem em regiões intermediárias.⁹³ O trabalho publicado por LEHNERT et al. (2007)⁹⁴ apresenta a estrutura cristalina de complexos de Cu^{2+} com nitrito coordenado no modo de coordenação $\kappa^2\text{-ONO}$. No espectro de infravermelho esse composto apresenta bandas em 1287 e 1197 cm^{-1} , que são caracterizadas como

$\nu_s(\text{N-O})$ e $\nu_{\text{ass}}(\text{N-O})$, respectivamente. Outro trabalho publicado por CHUANG et al. (2018)⁹⁵ atribui as bandas de ν_{ass} e $\nu_s(\text{N-O})$ em 1265 e 1209 cm^{-1} , respectivamente.

Os espectros obtidos para o complexo CuPTB antes e após a coordenação com o nitrito é apresentado na Figura 4.33. A comparação dos espectros dos três complexos com nitrito coordenado é apresentado na Figura 4.34.

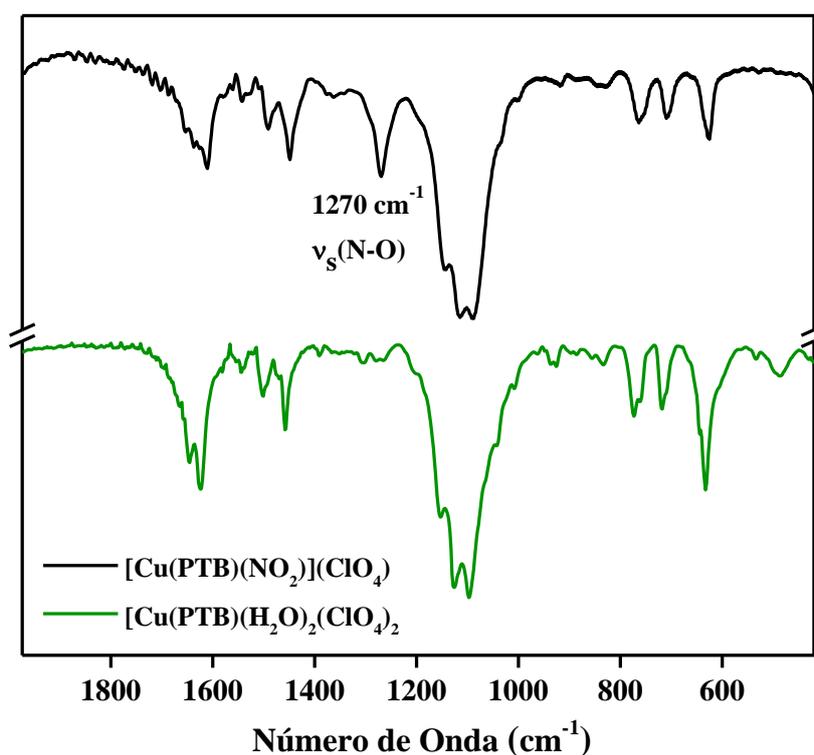


FIGURA 4.33- Espectros de infravermelho dos complexos de CuPTB (verde) e $\text{CuPTB} + \text{NO}_2^-$ (preto), em pastilha de KBr.

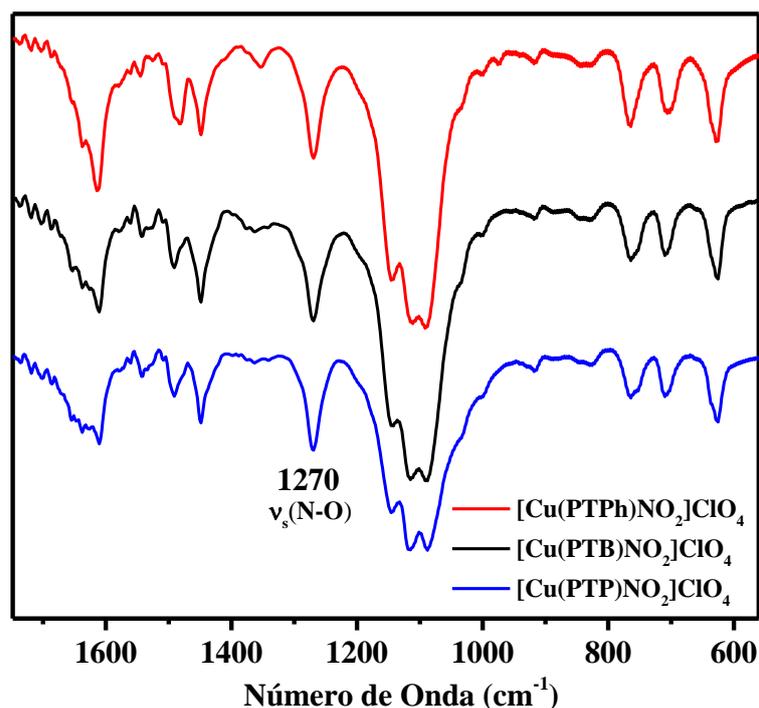


FIGURA 4.34- Espectros de infravermelho dos complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP com nitrito coordenado, em pastilha de KBr.

Após a coordenação do nitrito aos complexos, pode-se observar o surgimento de uma nova banda intensa em 1270 cm^{-1} comum aos três espectros. Esta banda pode ser atribuída ao $\nu_s(\text{N-O})$ e modo de coordenação bidentado do nitrito, de acordo com os relatos da literatura citados acima. A banda de $\nu_{\text{ass}}(\text{N-O})$ pode estar encoberta pela banda larga de $\nu_s(\text{Cl-O})$ do perclorato. O espectro do NaNO_2 livre apresenta a banda de $\nu_s(\text{N-O})$ em 1293 cm^{-1} .⁷⁹

A análise dos espectros de EPR das soluções dos complexos em metanol com a adição de 1equivalente de NaNO_2 corroboram com os dados anteriores (Figura 4.35). Comparando-se os parâmetros g_0 e A dos espectros obtidos em temperatura ambiente (298 K) dos aquo complexos ($g_0= 2,1248$ e $A_0= 60,20$) com os espectros após a coordenação do nitrito, observa-se que os valores mudaram para $g_0=2,1060$ e $A= 82,77$. Na Tabela 4.6 (no tópico seguinte) estão descritos os parâmetros espectroscópicos em temperatura ambiente e temperatura de N_2 líquido.

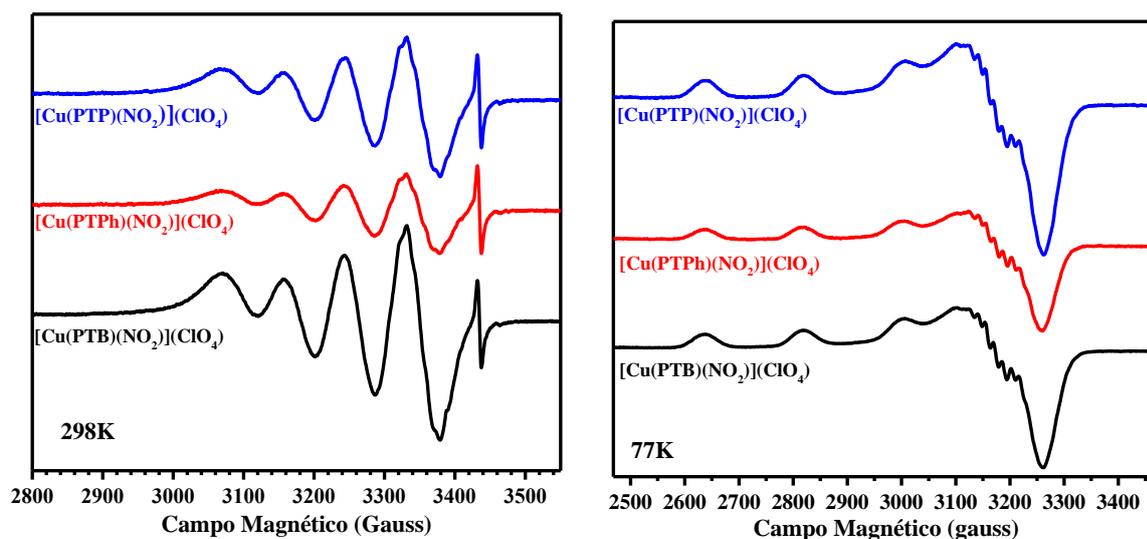


FIGURA 4.35- Espectros de EPR dos complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP com NO₂⁻ coordenado em metanol em temperatura ambiente 298 K (esquerda) de N₂ líquido 77 K (direita).

Nos complexos com nitrito coordenado observa-se a formação de linhas super-hiperfinas mais bem definidas devido a substituição de duas moléculas de água por NO₂⁻ bidentado. O espectro experimental e sua primeira derivada (Figura 4.36), são semelhantes com o espectro teórico e indicam que o ambiente de ligação em torno do Cu²⁺ está com 3 nitrogênios coordenados. Esse resultado corrobora com as análises dos espectros de infravermelho, indicando que o nitrito se coordena pelos oxigênios.

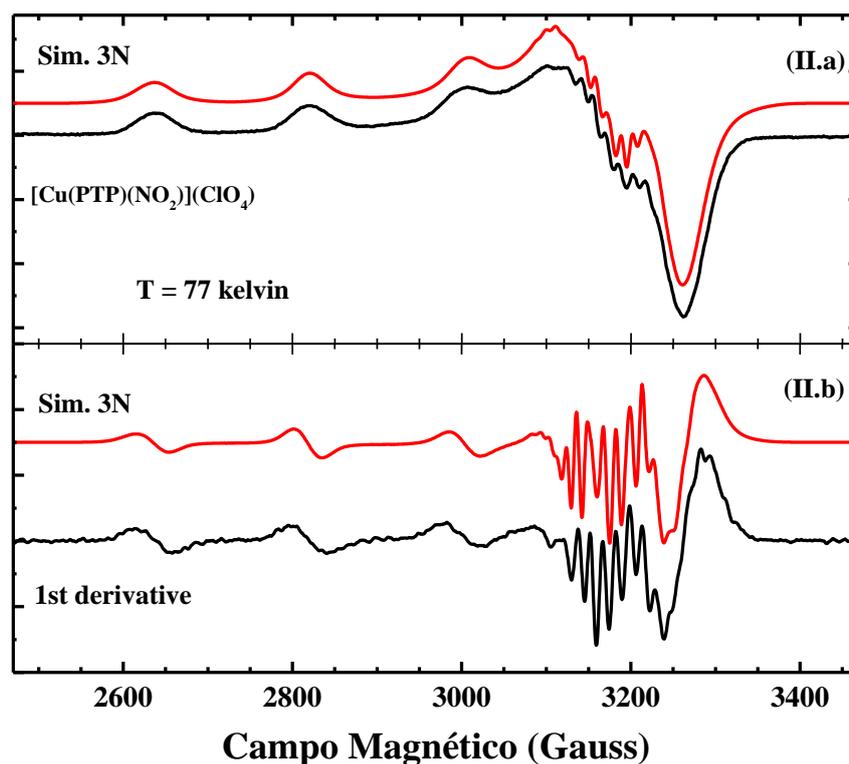


FIGURA 4.36- Espectro de EPR e primeira derivada do complexo $[\text{Cu}(\text{PTP})(\text{NO}_2)](\text{ClO}_4)$ (preto) em metanol, medidos em temperatura de nitrogênio líquido (77 K). As linhas vermelhas são simulações usando 3 nitrogênios ligados ao íon Cu^{2+} .

As análises em solução e no estado sólido indicam que as moléculas de água coordenadas são facilmente substituídas pelo íon NO_2^- em solução de metanol. Desta forma, sugere-se que assim como na enzima CuNiR^{10} , o substrato NO_2^- coordena-se aos complexos de CuPTPh , CuPTB e CuPTP no modo bidentado.

4.2.2 Influência da adição de ácido benzóico

Uma das condições necessárias para que a reação catalítica ocorra é a adição de ácido. Neste trabalho foi utilizado o ácido benzóico como doador de

próton, devido este ser empregado em trabalhos semelhantes de redução do nitrito.^{41,45}

Primeiramente, foi avaliado por espectroscopia de UV-Vis a estabilidade dos complexos na presença de ácido benzóico. Foi observado que a adição de até 100 equivalentes do ácido não causou deslocamento significativo da banda d-d dos complexos, como ilustrado na Figura 4.37. A diminuição da intensidade da banda ocorre devido ao efeito de diluição.

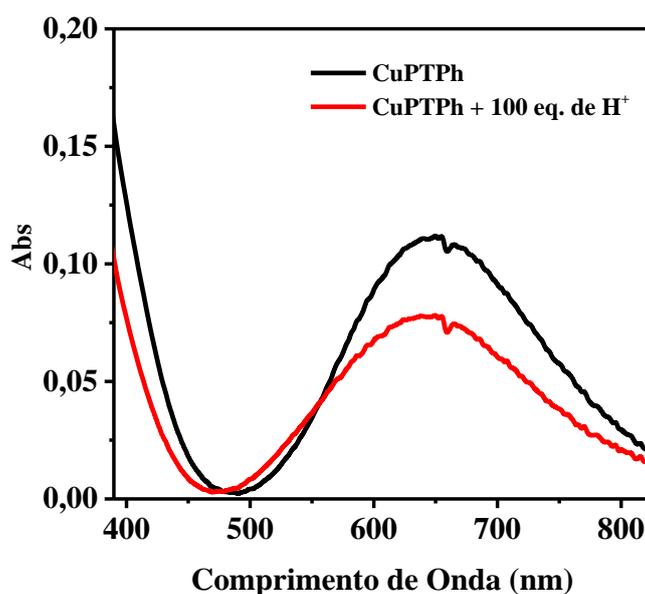


FIGURA 4.37- Espectro de UV-Vis do complexo CuPTPh e na presença de 100 eq. de ácido benzóico, na região de 400-800nm.

Posteriormente foi observado o comportamento dos complexos com NO_2^- coordenado na presença do ácido. A adição de ácido benzóico causa uma rápida mudança na cor da solução verde para verde claro. No espectro de UV-Vis (Figura 4.38) observa-se que a adição de 1 eq. de ácido benzóico na solução do complexo $[\text{Cu}(\text{PTPh})(\text{NO}_2)]^+$ causa uma diminuição de 34% da intensidade da banda em 373 nm. Um excesso maior de ácido benzóico (100 eq.) resulta em uma diminuição mais acentuada da banda. Porém, não é observado nenhuma mudança significativa na banda de transição d-d do complexo $[\text{Cu}(\text{PTPh})(\text{NO}_2)]^+$.

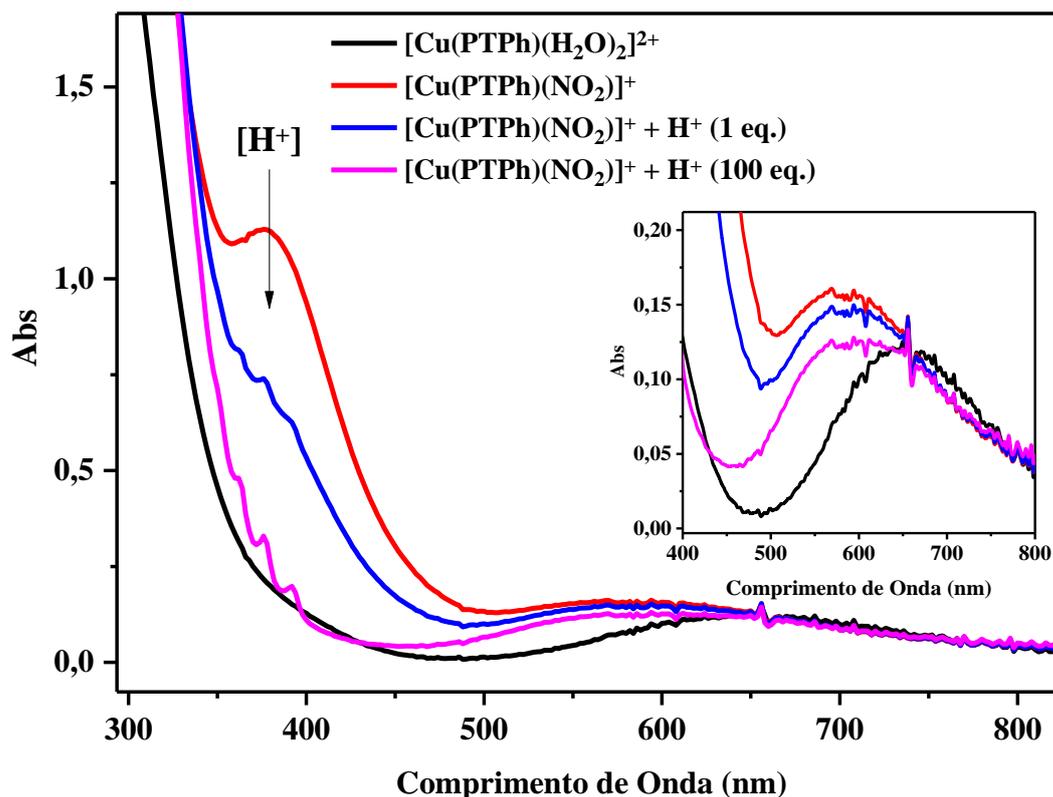


FIGURA 4.38– Mudança espectral do complexo CuPTPh, com adição de 1 eq. de nitrito, 1 e 100 eq. de ácido benzóico. O gráfico a direita é uma expansão da região de 400-800 nm.

Após a adição de ácido benzóico, observa-se que na banda em 373 nm ocorre o surgimento de bandas finas, características de HONO livre. Essas bandas poderiam indicar que o ácido benzóico estaria substituindo o nitrito no complexo. Então, a substituição do substrato causaria uma inibição da atividade catalítica dos complexos. No entanto, o espectro de infravermelho foi registrado para o complexo $[\text{CuPTPh}(\text{NO}_2)](\text{ClO}_4)$ na presença de ácido benzóico. A comparação com o complexo $[\text{Cu}(\text{PTPh})(\text{NO}_2)](\text{ClO}_4)$ é mostrado na Figura 4.39. Observa-se o surgimento de bandas em 1383 cm^{-1} e 1558 cm^{-1} , que correspondem a $\nu_{\text{ass}}\text{COO}^-$ e $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ respectivamente, de benzoato iônico, sugerindo apenas uma troca de contra-íon.⁷⁹ Associado a isso, a ausência de deslocamento na banda d-d (Figura 4.38), indicam que o ácido benzóico não substitui o nitrito coordenado ao complexo de cobre.

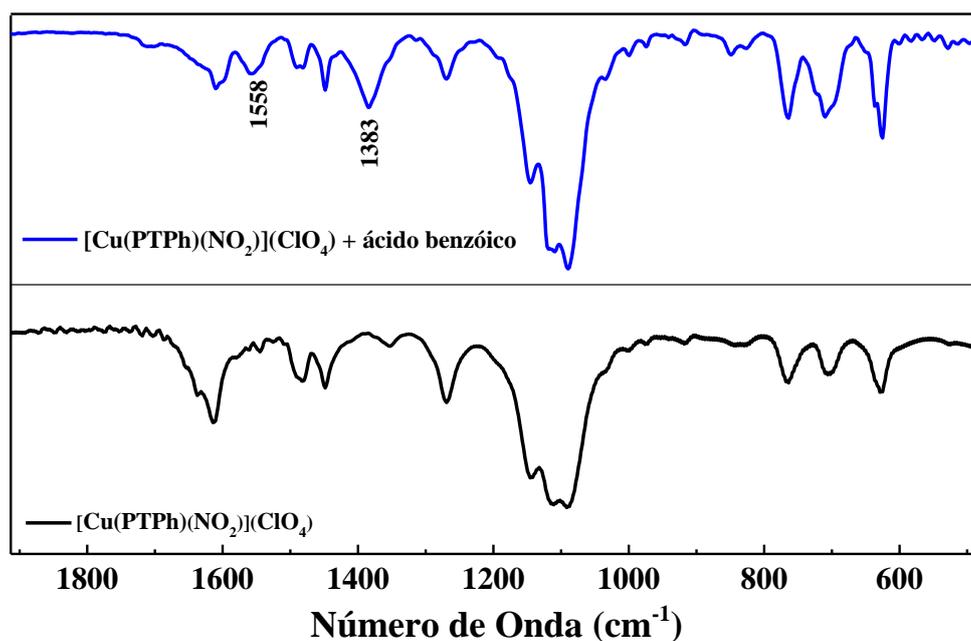


FIGURA 4.39- Infravermelho do complexo CuPTPh com nitrito, e após adição de ácido benzóico.

Considerando que o HONO tem um $pK_a = 3,15$ e que o ácido benzóico tem um $pK_a = 4,2^{96}$ a reação ácido-base seria favorecida em direção ao ácido benzóico protonado. Uma diferença maior entre os valores de pK_a ocorre com a coordenação do ácido nitroso. Espera-se que o ácido nitroso coordenado tenha um pK_a menor que 3,15 devido a influência eletrostática dos centros M^{2+} na acidificação de pequenas unidades HX coordenadas. Na literatura é relatado que o valor de pK_a do ácido nitroso coordenado pelo N em complexos de rutênio⁹⁷ foi de -0,80. Com este valor de pK_a 30% do ácido nitroso coordenado estaria protonado a 100 equivalentes de ácido benzóico. Portanto a adição de um excesso de ácido benzóico desloca o equilíbrio para a protonação do nitrito, o qual pode estar em equilíbrio com as espécies de HONO livre e coordenada. O surgimento das bandas finas ocorre devido ao equilíbrio ácido base das espécies em solução como ilustrado na Figura 4.40.

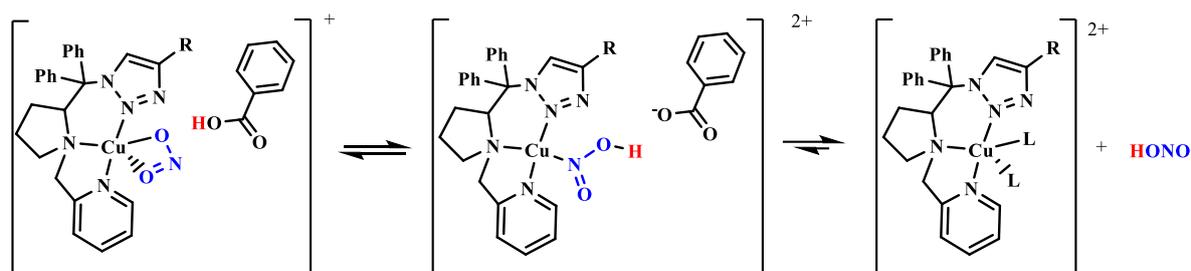


FIGURA 4.40- Esquema da protonação do nitrito coordenado e o equilíbrio entre as espécies em solução.

A mudança espectral causada com a adição de ácido benzóico também pode estar associada a uma mudança no modo de coordenação do nitrito quelato κ^2 -ONO para um modo κ^1 -NOOH (Figura 4.40).

A espectroscopia de EPR foi realizada para verificar se a mudança no modo de coordenação ocorre. Nas Figuras 4.41 e 4.42 são comparados os espectros dos complexos na ausência e na presença do nitrito, e com a adição de ácido benzóico, todos os espectros foram registrados em metanol, em temperatura ambiente (296 K) e congelados sobre nitrogênio líquido (77 K).

Os espectros registrados em temperatura ambiente (298K) apresentaram comportamentos semelhantes e também são parecidos com os espectros dos complexos com nitrito coordenado. Como observado anteriormente, a adição de nitrito causa uma mudança nos espectros, nos parâmetros g_0 e das constantes hiperfinas A , com a adição de 1 equivalente de ácido benzóico, na solução dos complexos com nitrito coordenado, os parâmetros g e A não sofreram mudanças significativas como pode ser observado na Tabela 4.6.

Quando congelado em nitrogênio líquido a 77K, a adição de ácido benzóico na solução do complexo $[Cu(PTP)(NO_2)](ClO_4)$ causou um alargamento dos sinais devido a formação de aglomerados na presença de nitrito e ácido, provavelmente devido ao grupo hidroxila do ligante PTP. Os outros dois complexos, no entanto, CuPTPh e CuPTB apresentaram-se semelhantes aos nitrito-complexos correspondentes.

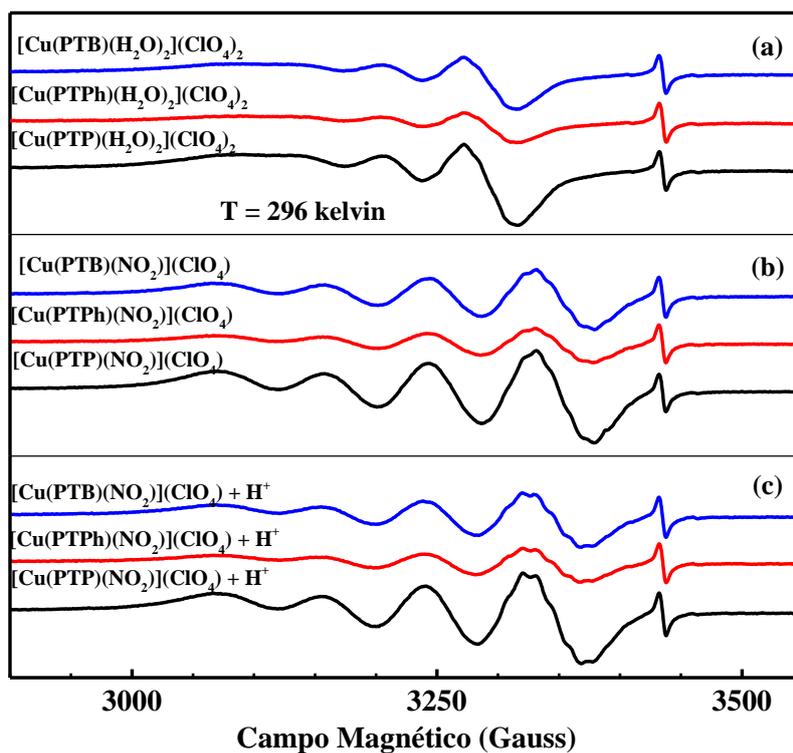


FIGURA 4.41– Comparação dos espectros de EPR dos complexos de cobre antes (A) e depois da adição de nitrito (B) e ácido benzóico (C).

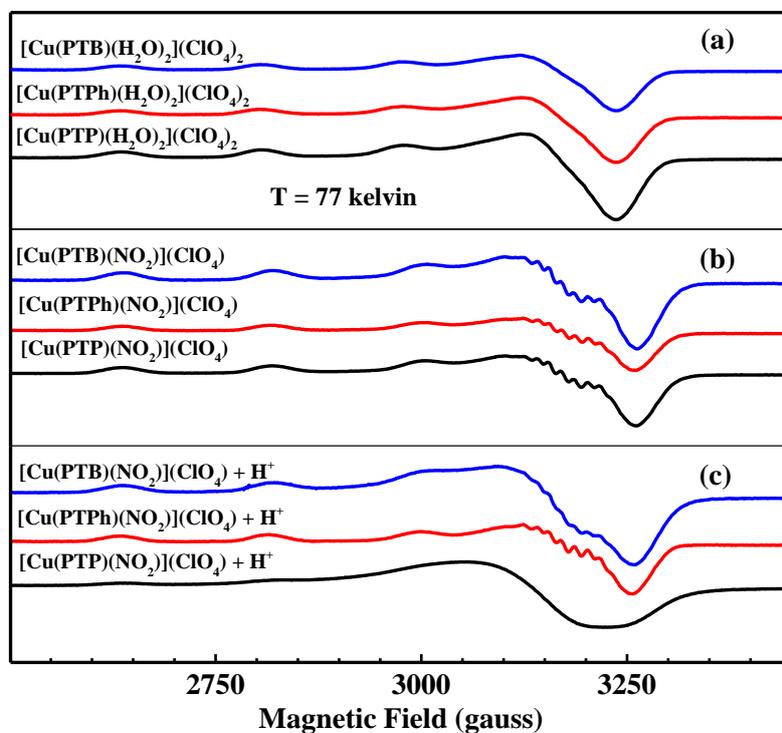


FIGURA 4.42– Espectro de EPR dos complexos de cobre antes (A) e depois da adição de nitrito (B) e ácido benzóico (C).

Apesar da semelhança entre os espectros dos complexos com nitrito coordenado, na ausência e na presença de ácido benzóico, foram observadas algumas diferenças entre eles nas linhas super-hiperfinas. A 1ª derivada dos espectros de EPR experimentais do complexo CuPTB na ausência e na presença do nitrito, e com adição de ácido benzóico (Figura 4.43) foram comparados com os espectros simulados para um ambiente de coordenação com 3 e 4 nitrogênios. A subtração entre os espectros simulados e experimental para o complexo $[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{NO}_2)]^+$ na presença e ausência do ácido benzóico são mostrados em (b') e (c'), respectivamente. A melhor simulação deve ser aquela que resulta em uma linha mais próxima de uma linha plana ou com menos ruído após a subtração entre os espectros de simulação e experimental. Desta forma, os complexos $[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{NO}_2)]^+$ exibem uma maior similaridade com a simulação com 3 ligantes N, como foi dito anteriormente. Quando ácido benzóico é adicionado, uma maior similaridade é observada com o espectro simulado para 4 N coordenados. Isto indica a isomerização do ligante nitrito, o qual muda seu modo de coordenação de $\kappa^2\text{-ONO}$ para $\kappa^1\text{-NO}_2$ na presença de ácido.

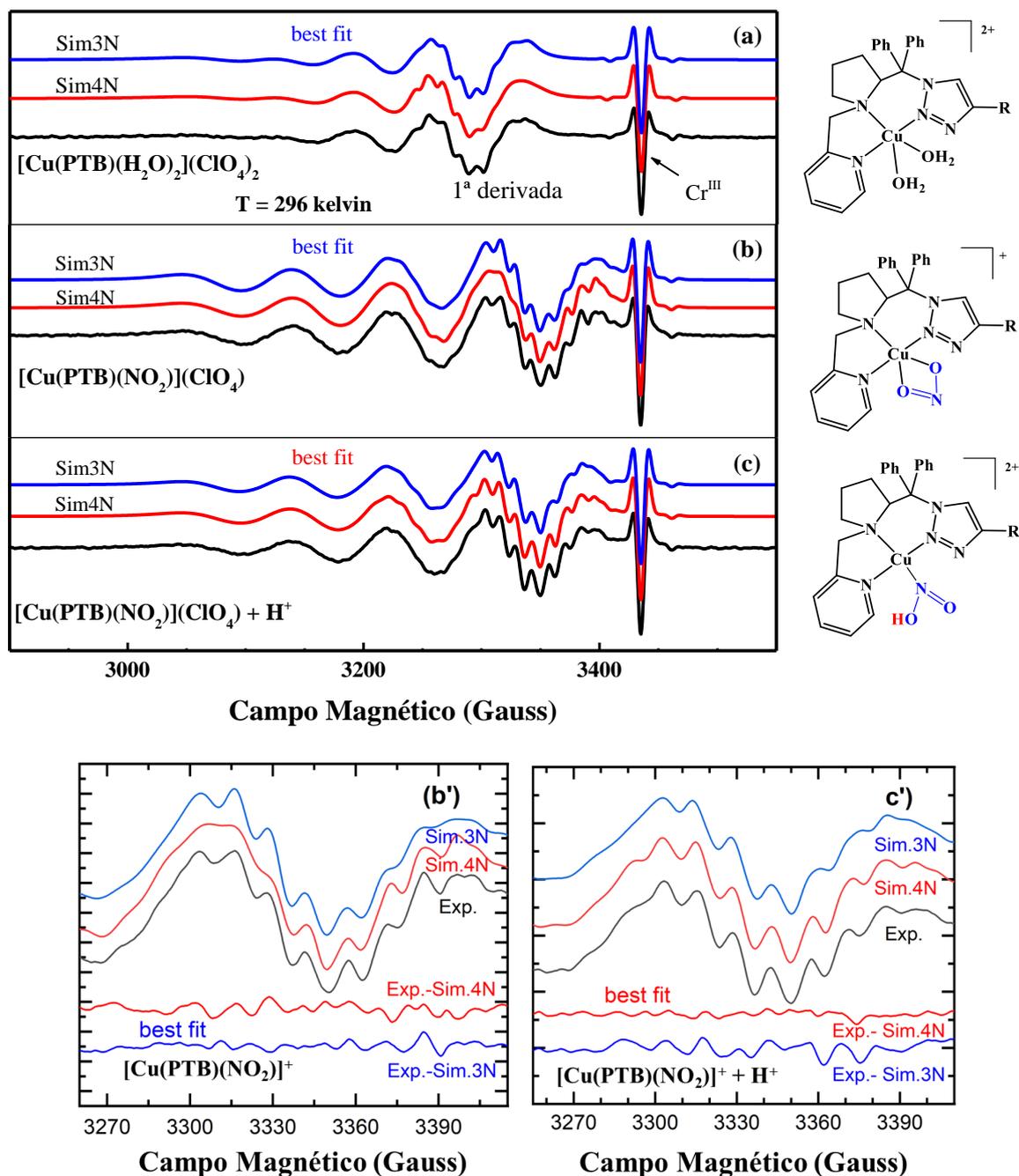


FIGURA 4.43- Primeira derivada dos espectros de EPR do complexo CuPTB sobre temperatura ambiente (296K) antes (a) e depois (b) da adição de nitrito de sódio e com a adição de ácido benzóico (c) comparações com as simulações do meio de coordenação com 3 (linha azul) e 4 (linha vermelha) nitrogênios coordenados. Subtração entre os espectros simulados e experimental para o complexo $[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{NO}_2)]^+$ na presença e ausência do ácido benzóico são mostrados em (b') e (c'), respectivamente.

TABELA 4.6- Parâmetros de EPR dos complexos $[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{NO}_2)]^+$, $[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{HNO}_2)]^+$ em solução de metanol em 296 e 77K.

Compostos	296 K		77 K	
	g ₀	A	g ₀ [xyz]	A[xyz]
$[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2$	2.1248	60,20	2.0420	8.81
			2.0780	19.0
			2.2505	171.0
$[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{NO}_2)](\text{ClO}_4)$	2.1060	82.77	2.0550	21.7
			2.0520	21.8
			2.2340	181.9
$[\text{Cu}(\text{PTB})(\text{NO}_2\text{H})](\text{ClO}_4)$	2.1079	80.15	2.0550	21.0
			2.0520	21.0
			2.2350	181.9

Os valores $A_{\text{Cu}^{2+}}$ estão em gauss.

Esse comportamento da mudança do modo de coordenação do nitrito foi proposto para o mecanismo da enzima nitrito redutase envolvendo cálculos DFT, ^{9,24,98} e complexos miméticos.⁸⁷

4.2.3- Redução dos complexos de Cu^{2+} com ascorbato de sódio.

Na enzima CuNiR a reação de redução do nitrito ocorre pela redução de 1 elétron, proveniente do sítio T1Cu para o sítio T2Cu. No caso dos complexos de Cu^{2+} a redução pode ser feita com o ascorbato de sódio que atua como doador de elétrons. Foi observado por espectroscopia de UV-Vis que a adição de 1 equivalente de ascorbato de sódio (solubilizado em metanol) a uma solução de CuPTPh em metanol, sob atmosfera inerte, causa o desaparecimento da banda de transição d-d em 644 nm (Figura 4.44A). A solução muda de cor azul para amarelo. Esses dados são consistentes com a redução de 1 elétron do Cu^{2+} no complexo CuPTPh, indicando que esses complexos podem ser facilmente

reduzidos na presença de ascorbato de sódio (Equação 9). A diminuição da banda é estável em até 40 min sob argônio sem que ocorra um aumento significativo na absorção, no entanto a adição de 1 equivalente de nitrito de sódio e 2 equivalentes de ácido benzóico causa um rápido aumento na intensidade da banda, indicando a reoxidação para o Cu^{2+} (Figura 4.44A e Equação 10).

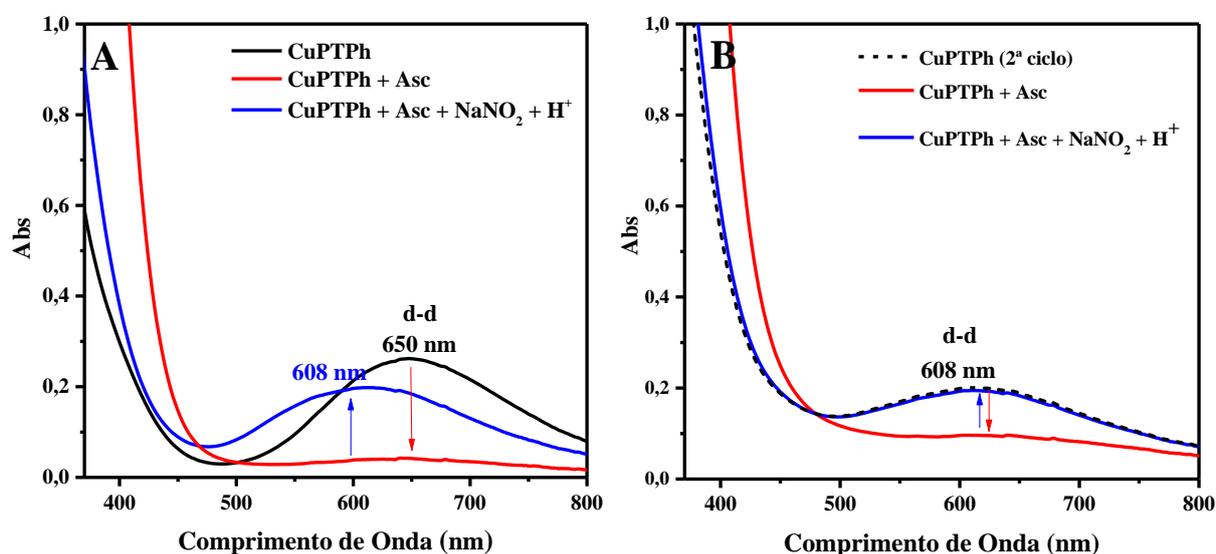
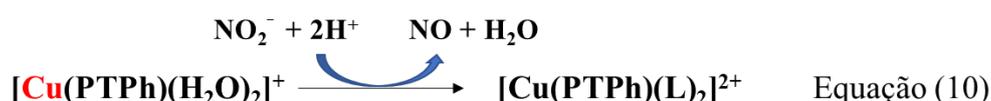


FIGURA 4.44- Espectros de UV-Vis do complexo CuPTPh (preto) e adição de 1 eq. de ascorbato de sódio (vermelho) e adição de 1eq. de NO_2^- + 2 eq. de ácido benzóico (azul) em metanol (A) Segunda adição de ascorbato de sódio (vermelho) a mesma solução do complexo CuPTPh (pontilhado) e segunda adição de NO_2^- + ácido benzóico (azul) (B).

A reoxidação para Cu^{2+} causou um deslocamento da banda d-d de 644 para 608 nm. Esse deslocamento pode ocorrer devido a coordenação do íon benzoato ou hidróxido ao final da reação, como visto para compostos semelhantes.³⁰ Para verificar se a reação ocorre novamente (a partir do produto $[\text{Cu}(\text{PTPh})(\text{L})_2]^{2+}$), foi feita uma segunda adição de ascorbato de sódio na solução

do complexo, e foi observado que a banda em 608 nm do complexo de Cu^{2+} desaparece e uma nova adição de NaNO_2 e ácido benzoico causaram novamente o aumento na banda para 608 nm. Isso indica que o complexo pode ser reduzido e oxidado seguidas vezes para redução do NO_2^- . Após a reoxidação do Cu^+ para Cu^{2+} na presença de nitrito e ácido, não foram observados nenhuma banda de nitrito coordenado, nem as bandas finas de HONO próximo a 400 nm, indicando que a redução do NO_2^- a NO ocorre antes da dissociação do HONO em solução.

Para mostrar a dependência do doador de prótons e doador de elétrons na reação, foram feitos testes de soluções de CuPTPh e ascorbato de sódio em metanol sob atmosfera inerte, adicionando solução de NaNO_2 ou ácido benzóico. Nestes casos não foi observado a reoxidação do Cu^+ , como já esperado de acordo com a equação 1.

O rápido aumento da banda d-d dos complexos foi acompanhado pela técnica de *stopped-flow* na temperatura de 10°C (Figura 4.45). Foram preparadas as soluções 1mM de cada complexo, 50 eq. de ácido benzóico e o NaNO_2 foi adicionado com diferentes concentrações em metanol. A leitura iniciou-se após a adição de uma solução de ascorbato de sódio 1mM em metanol. O gráfico do aumento da absorvância em 608 nm *vs* tempo da reoxidação da banda dos complexos (Figura 4.50 A,C e D) mostram que o aumento da banda ocorre em menos de 15 segundos, a 10°C para os três complexos. Esses dados permitiram a construção do gráfico de velocidade inicial *vs* a concentração de NO_2^- adicionada.

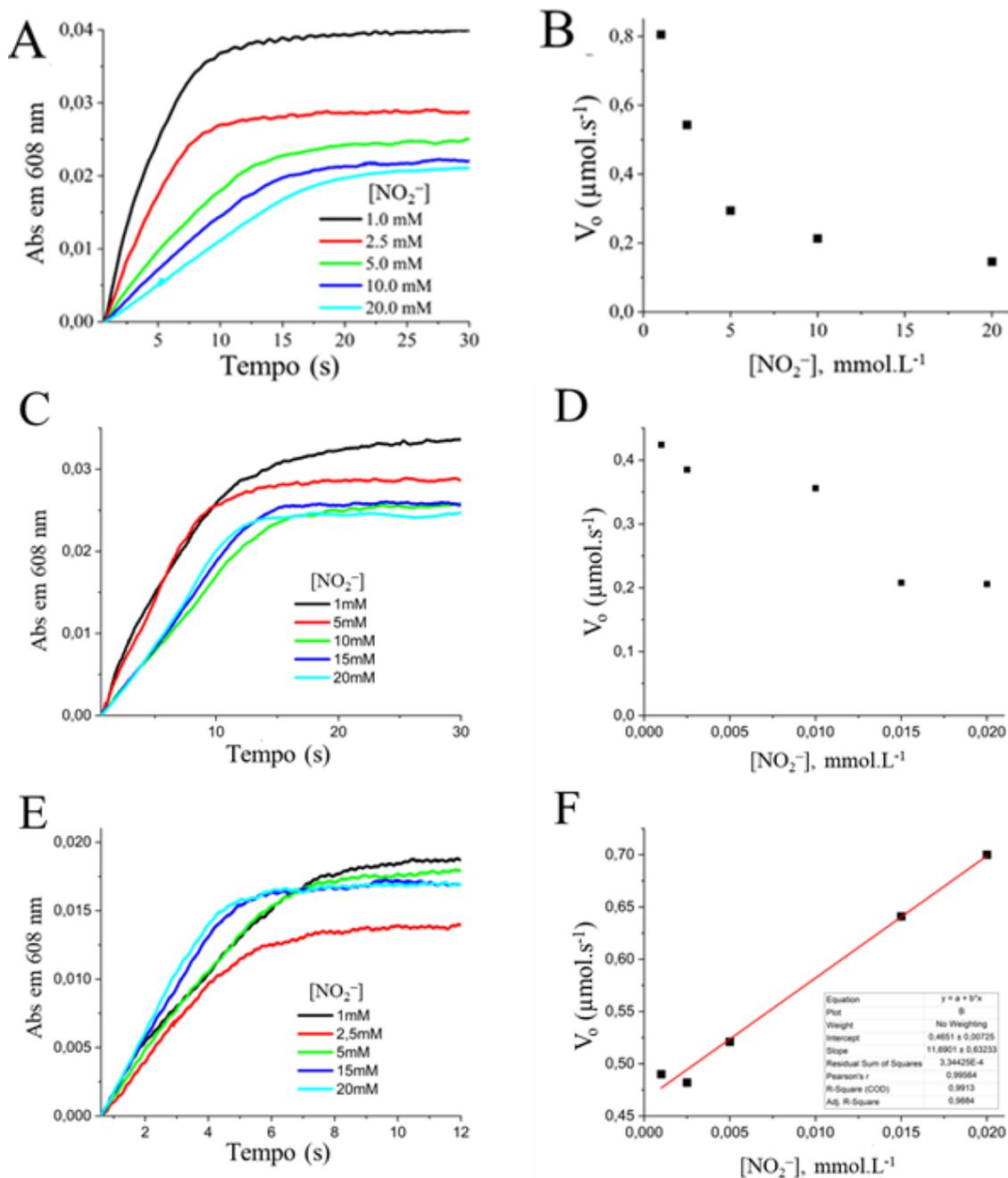


FIGURA 4.45- Espectros de UV-Vis *Stopped-Flow* de uma solução 1mM do complexo CuPTB (A) CuPTPh (C) CuPTP e (E) e 50 eq. de ácido benzóico e subsequentes adições de nitrito em metanol a 10°C. A direita o gráfico de velocidade inicial vs a concentração de nitrito dos complexos CuPTB(B) CuPTPh(D) e CuPTP (F).

Foi observado que o aumento da concentração do substrato causou uma diminuição da velocidade de reação dos complexos CuPTB e CuPTPh, enquanto que no complexo CuPTP o aumento da concentração de substrato causa um aumento na velocidade de reação (Figura 4.45 B, D e F). Portanto, nesse estudo, o aumento da concentração do substrato inibiu a atividade dos miméticos CuPTPh e CuPTB, mas o CuPTP não foi inibido. Na literatura, foi relatado que a variante AxNiR da enzima CuNiR com mutação nos resíduos envolvidos na transferência de prótons também foram inibidos em altas concentrações de NO_2^- .¹⁶ Essa inibição foi explicada pela ligação de uma segunda molécula de nitrito ou pela ocorrência de diferentes vias no ciclo de reação, com velocidade mais lenta, se tornando dominante em altas concentrações de substrato.¹⁶ A etapa de transferência de elétrons, determinante da reação, ocorre cineticamente acoplada ao próton, portanto, a etapa de transferência de prótons pode também determinar a velocidade da reação.^{16,24} O complexo CuPTP foi o único que não foi inibido nas condições das reações acompanhadas por *stopped-flow*, provavelmente devido a seu grupo substituinte *n*-propanol facilitar a etapa de transferência de prótons, enquanto o grupo fenil ou *n*-butil nos complexos CuPTPh e CuPTB são menos prováveis de atuar no transporte de prótons.

Considerando que os complexos de cobre são carregados positivamente (mesmo após a coordenação do nitrito), é evidente que há uma atração maior com o nitrito carregado negativamente do que com o cátion hidrônio. Assim, um aumento na concentração de nitrito pode bloquear a entrada de H_3O^+ no sítio catalítico, dificultando a transferência de prótons e inibindo o processo catalítico (Figura 4.46 A e B). O volume e a maior mobilidade do *n*-butil, em comparação com o fenil, podem bloquear a interação entre o complexo e as moléculas de nitrito adicionais, causando um maior impacto na etapa de transferência de prótons. Isso resulta em uma inibição mais pronunciada por nitrito no complexo CuPTB. Por outro lado, o substituinte *n*-propanol pode auxiliar na entrega de hidrônio na proximidade do sítio ativo (Figura 4.46C).

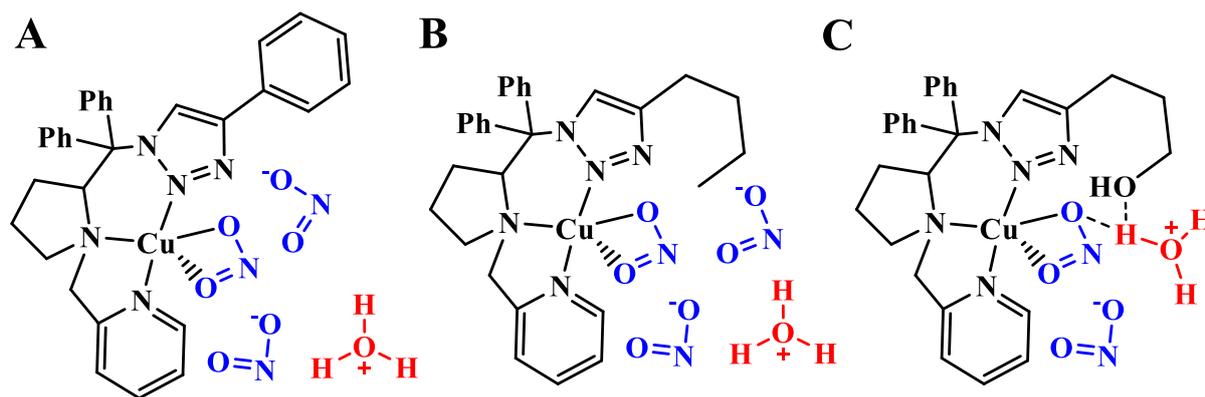
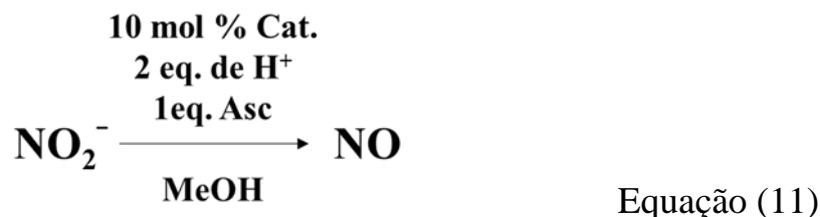


FIGURA 4.46- Ilustração interação entre os complexos CuPTPh (A), CuPTB (B) e CuPTP (C) com nitrito e hidrônio.

Assim, o grupo fenil do complexo CuPTPh permite um sítio ativo mais exposto e o nitrito interage eletrostaticamente com o complexo. Já o complexo CuPTB tem um grupo *n*-butano volumoso que pode repelir parte do nitrito, mas ainda permite que o nitrito interaja eletrostaticamente com o complexo. Por outro lado, o complexo CuPTP pode se ligar ao hidrônio, auxiliando na transferência de prótons para o sítio ativo.

4.2.4- Reação de redução química do nitrito.

Os estudos catalíticos de redução do NO_2^- com os complexos de Cu^{2+} foram testadas em uma solução de metanol (solvente foi escolhido pois solubiliza todos os componentes da reação) sob atmosfera inerte. Para os testes adicionou-se 10% mol do complexo de cobre, em relação ao substrato e na presença de 2 e 1 equivalentes de ácido benzóico e ascorbato de sódio, respectivamente.



Ao balão desta reação foi passando um fluxo de N_2 para um segundo balão contendo uma solução tampão citrato 0,1M pH=5 previamente desaerada

com N_2 e contendo o complexo $[Fe(EDTA)]^{2-}$ o qual já é conhecido na literatura^{35,39,99,100} para coordenação de NO. Após 10 min foi observado a mudança de cor da solução para amarelo e o surgimento da banda em 432 nm (Figura 4.47) que é característico do complexo de coloração amarela $[Fe(EDTA)(NO)]^{39}$.

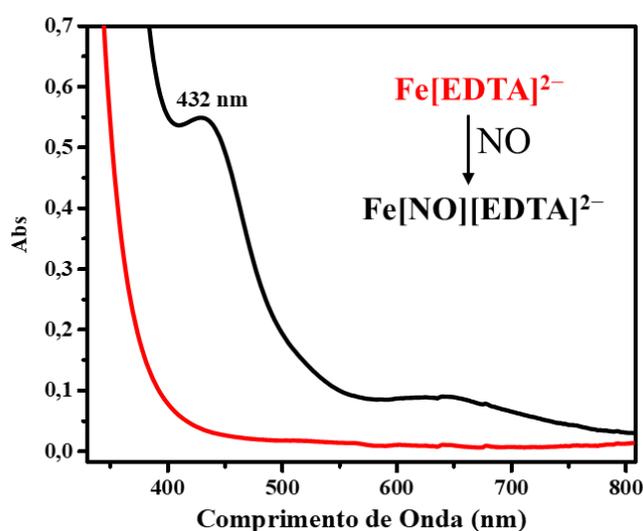


FIGURA 4.47- Espectro de UV-Vis do complexo $Fe[EDTA]^{2-}$ antes e após a coordenação com o NO.

Os valores de NO detectado como $[Fe(EDTA)(NO)]$ foram comparados com a reação controle, usando nitrito de sódio em meio ácido. Utilizando estas condições, a porcentagem de NO detectada foi 70.8% (± 0.01), 56.6% (± 0.03) e 89.6% (± 0.01) para os complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP, respectivamente (Figura 4.48). Na reação realizada sem os complexos de cobre (branco), a banda em 432 nm não foi observada, indicando que sob as condições ácidas desse experimento o NO não é gerado espontaneamente.

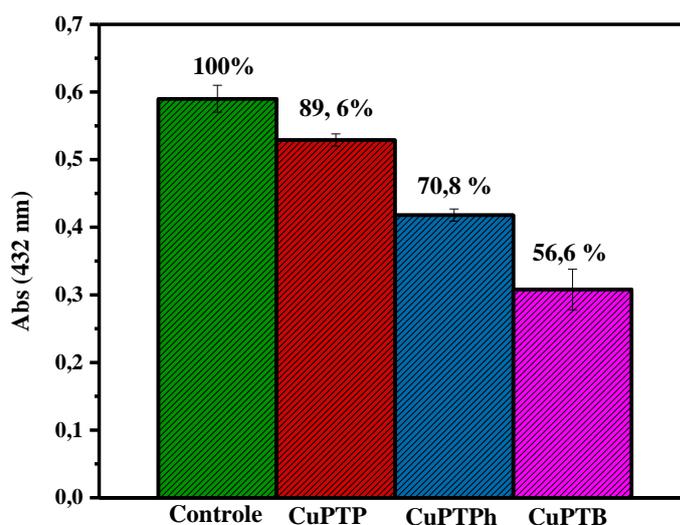


FIGURA 4.48- Gráfico da absorvância em 432 nm do complexo $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ de detecção de NO gerado pelos complexos de cobre.

Todos os complexos foram capazes de gerar NO, e os diferentes valores detectados confirmam a influência da segunda esfera de coordenação no processo catalítico dos complexos. O complexo CuPTP mostrou-se o catalisador mais eficiente devido facilitar a etapa de protonação, sendo que quase 90% de todo o nitrito adicionado foi convertido em NO. O CuPTPh também gerou uma alta quantidade de NO, pois apesar de não conter um grupo que facilite a etapa de protonação, seu sítio ativo é mais exposto para a coordenação do substrato. O complexo CuPTB conseguiu reduzir um pouco mais que a metade do nitrito, pois além de não ter o grupo facilitador no transporte de prótons, seu grupo *n*-butil torna o centro metálico mais impedido para a coordenação do substrato.

4.2.5- Redução eletroquímica dos complexos de Cu^{2+} para redução do NO_2^- .

A habilidade eletrocatalítica dos complexos de cobre também foi avaliada. Nesse estudo, a eletrocatalise permite observar o comportamento

catalítico dos complexos sem a necessidade de um doador de elétrons em excesso, além disso permite a obtenção dos parâmetros catalíticos.

O voltamograma cíclico da solução 1mM dos complexos de cobre em metanol e a adição de 50 eq. de NaNO_2 , desloca o potencial do par redox $\text{Cu}^{2+/1+}$ para regiões menos positivas (Figura 4.49), devido à coordenação do íon NO_2^- . Pode-se observar que na ausência de ácido (que é necessário para a catálise), nenhum aumento de corrente ocorre, apenas o deslocamento dos potenciais redox.

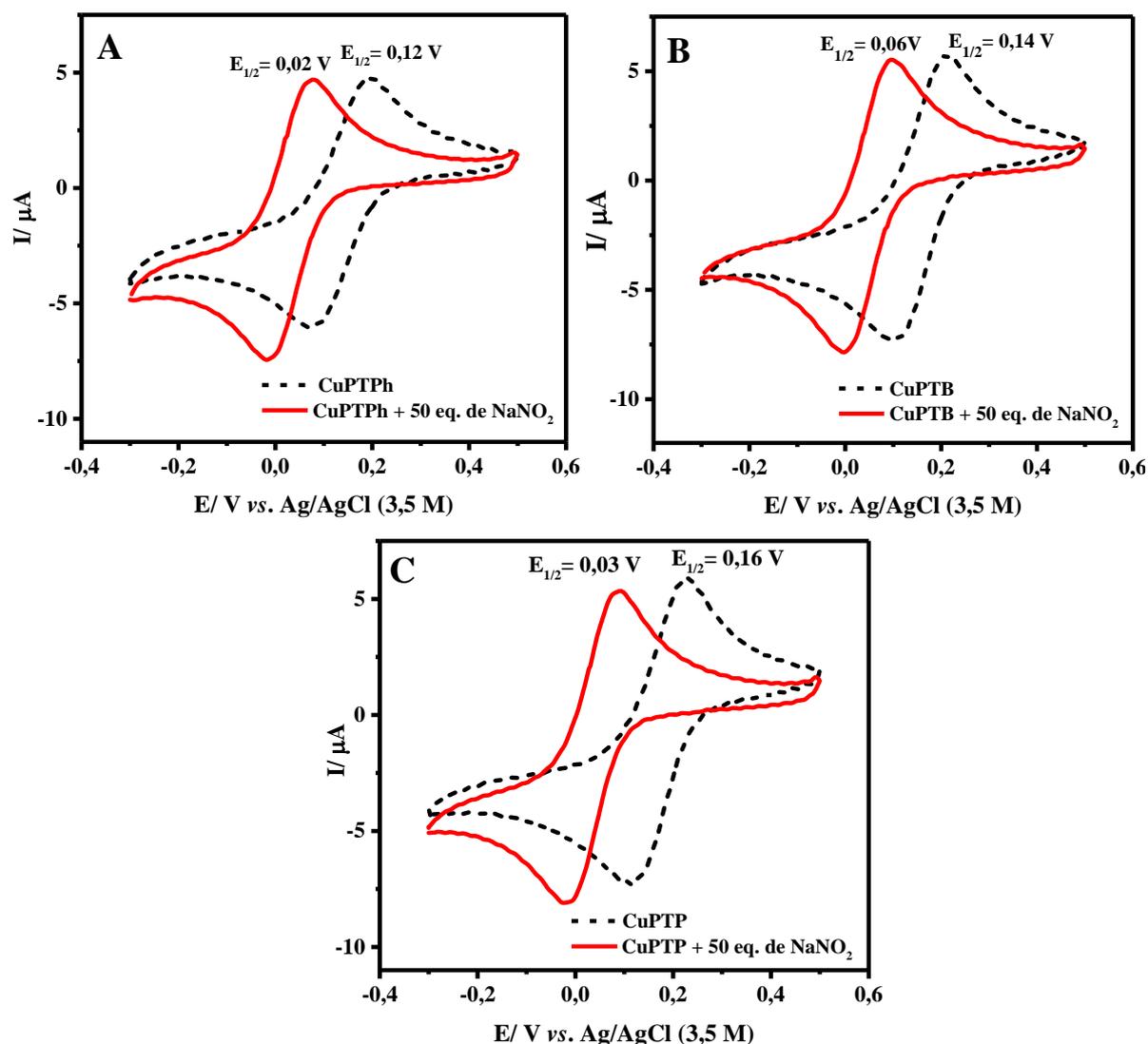


FIGURA 4.49- Voltamogramas cíclicos dos complexos CuPTPh (A), CuPTB(B) e CuPTP(C) e adição de 50 eq. de NaNO_2 em metanol contendo PTBA 0,1 mol.L^{-1} .

Quando o ácido benzoico é adicionado na solução eletroquímica dos complexos, ocorre um aumento na corrente de redução e uma diminuição na corrente de oxidação, que está relacionada a uma corrente catalítica (Figura 4.50).¹⁰¹ Quanto mais ácido é adicionado, maior é a corrente de oxidação do par redox $\text{Cu}^{2+/+}$. Todos os complexos apresentam uma corrente catalítica em uma velocidade de varredura de 50mV/s.

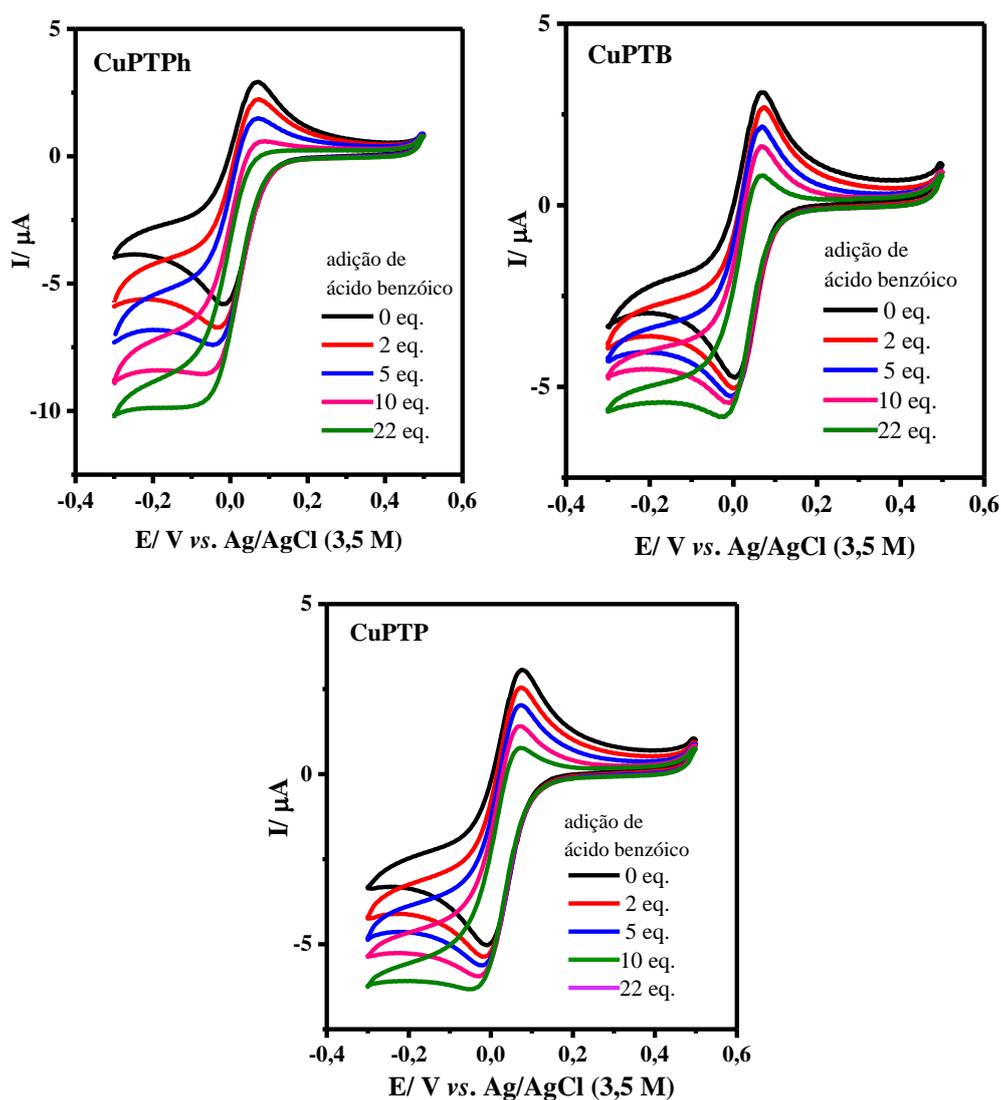


FIGURA 4.50- Voltametria cíclica dos complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP na presença de 50 eq. de NaNO_2 e consequentes adições de ácido benzoico. Os experimentos foram realizados em metanol, usando 0,1 M de PTBA como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 50 mV/s.

Neste experimento, as moléculas dos complexos de cobre próximas à superfície do eletrodo são reduzidas para Cu^+ . Como o ácido está presente na solução, o processo de oxidação para Cu^{2+} vai diminuindo com o aumento da quantidade de H^+ em solução, e o processo de redução vai aumentando. Isto ocorre, pois à medida que se forma íons Cu^+ , este transfere o elétron rapidamente para o NO_2^- , como ilustrado na Figura 4.51.

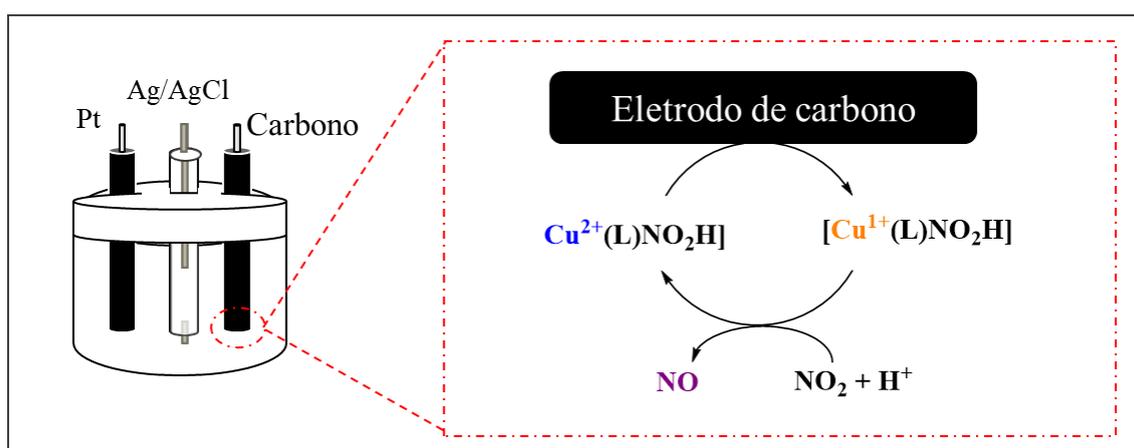


FIGURA 4.51- Ilustração da reação que ocorre na superfície do eletrodo.

Curiosamente, neste estudo o complexo CuPTPh apresentou uma maior corrente catalítica com o aumento da concentração do ácido benzóico. Isto indica que na presença de um excesso do substrato, aumenta a velocidade da reação do complexo CuPTPh com o nitrito, seguido pelos complexos CuPTP e CuPTB .

Para verificar se esse aumento na corrente catalítica está de fato associado a geração de NO , foi realizado eletrólise com aplicação de potencial fixo em $-0,1\text{V}$ por 2h (nas mesmas condições da catálise com o ascorbato de sódio). Foi utilizada uma cela eletroquímica desaerada e fechada. Dentro da cela foi adicionado um microtubo aberto, separadamente da solução eletroquímica, contendo uma solução de CoTPP^{41} solubilizado em diclorometano. O CoTPP é bastante utilizado para a detecção de NO e foi escolhido nesse experimento devido à sua melhor estabilidade e a possibilidade de ser realizado o processo catalítico

em um sistema fechado por mais tempo, comparado com o $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$. No final do experimento, uma alíquota desta solução foi retirada e um espectro de UV-Vis foi registrado (Figura 4.52). O deslocamento das bandas está de acordo com a coordenação de NO.¹⁹ Em seguida a solução restante do microtubo foi transferida para um balão e o solvente removido sob pressão reduzida. O sólido obtido foi analisado por espectroscopia na região de infravermelho (Figura 4.53), e observou-se uma banda intensa em 1695 cm^{-1} , característica de $\nu(\text{N-O})$ do óxido nítrico coordenado.^{19,87} A eletrólise da solução com os mesmos componentes, exceto o complexo de cobre, foi realizada e a porfirina CoTPP não detectou NO.

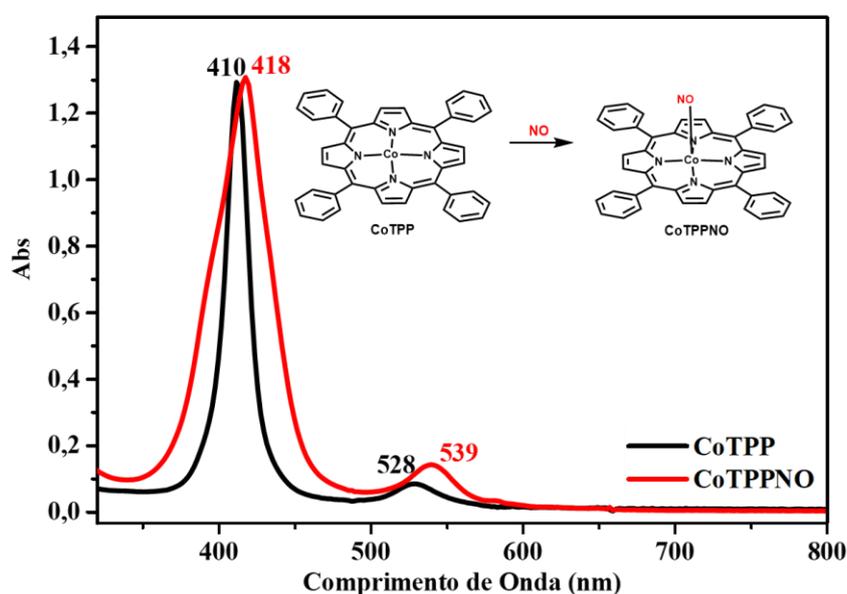


FIGURA 4.52- Espectro de UV-Vis do CoTPP e CoTPPNO em CH_2Cl_2 .

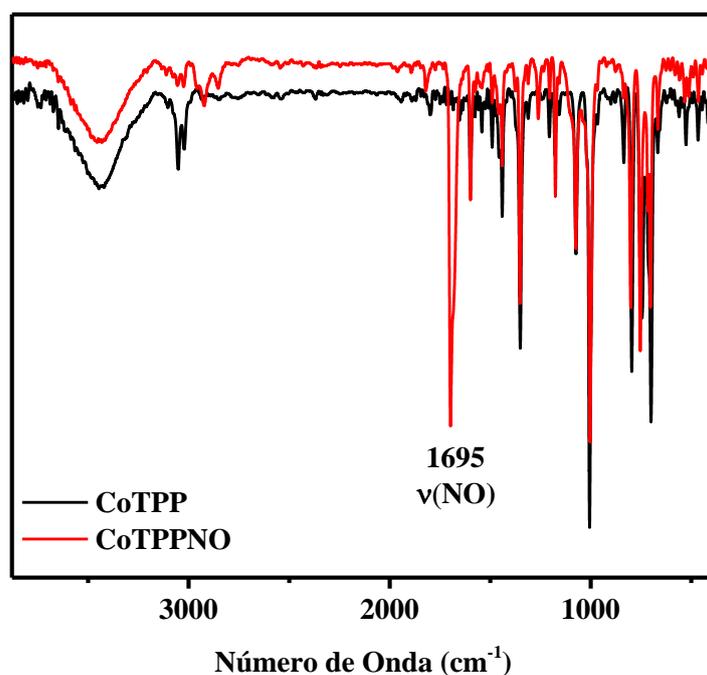


FIGURA 4.53- Espectro de infravermelho do CoTPP e CoTPPNO em pastilha de KBr.

A cinética de redução do nitrito também pode ser avaliada por voltametria cíclica. Foram obtidos os voltamogramas dos complexos (1mM) com um excesso de ácido benzoico (100 equivalentes), e nesse estudo foi variado as quantidades de NaNO_2 adicionado. Os voltamogramas foram obtidos em uma velocidade de varredura de 50 mV/s (Figura 4.54). Pode-se observar que nesse experimento, os três complexos apresentaram uma maior corrente catalítica com o aumento da concentração de nitrito.

Esses dados permitem a obtenção da curva de V_{NO} vs a concentração de NaNO_2 , os quais podem ser plotados como uma cinética de saturação de Michaelis–Menten (Figura 4.55), de acordo com a equação abaixo.

$$V_{[\text{NO}]} = V_{\text{máx}}[\text{NO}_2^-] / (K_M + [\text{NO}_2^-]) \quad \text{Equação (12)}$$

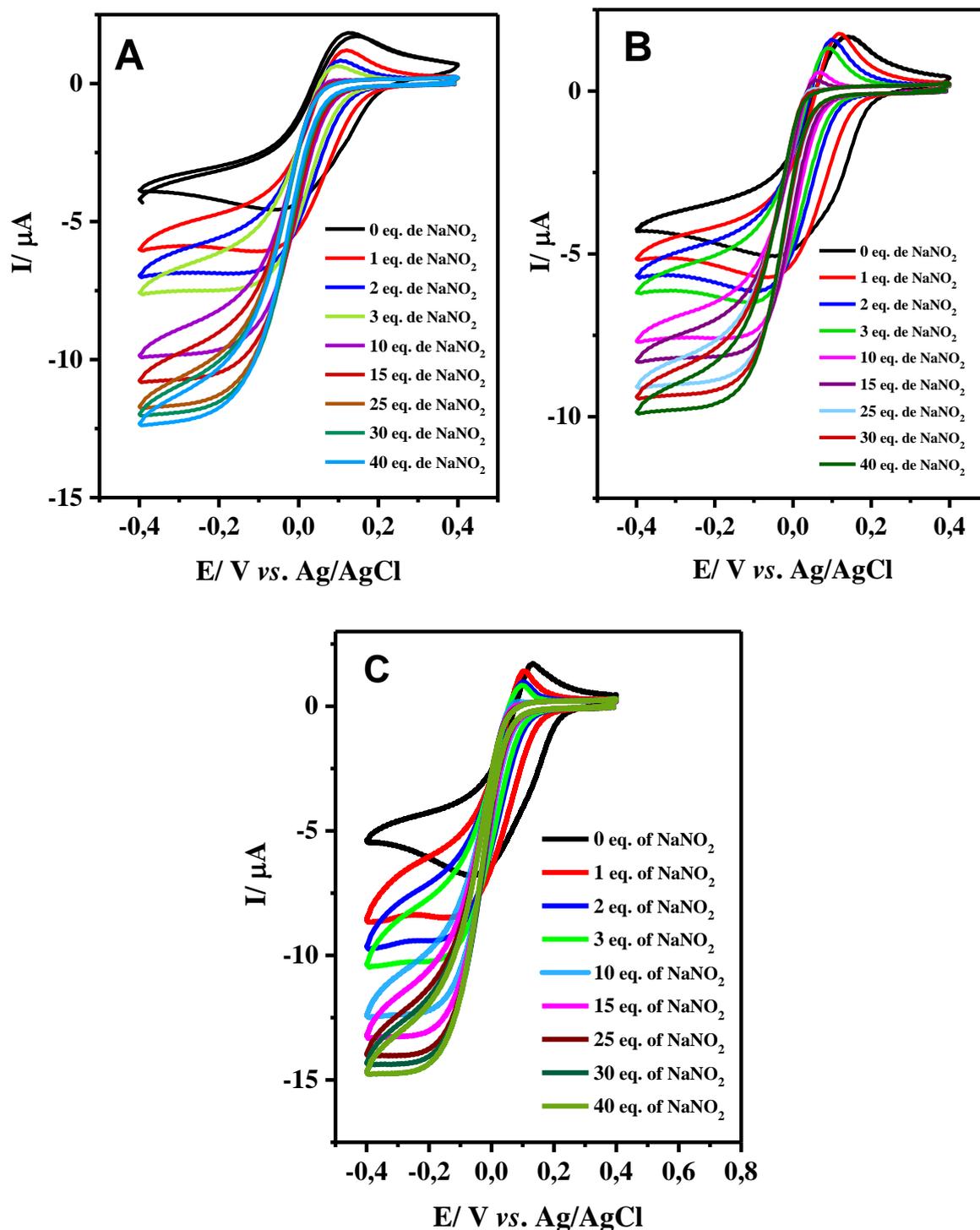


FIGURA 4.54- Voltametria cíclica dos complexos CuPTPh (A), CuPTB (B) e CuPTP(C) + 100 eq. de ácido benzóico e subsequentes adições de NaNO_2 . Em metanol contendo PTBA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Este gráfico permite a obtenção dos valores de $V_{\text{máx}}$ e K_M para os complexos e estão descritos na Tabela 4.7. Os valores de $V_{\text{máx}}$ podem ser

convertidos para o rendimento de Michaelis–Menten (k_{cat}) dividindo-se $V_{\text{máx}}$ pela concentração do catalisador. Como a quantidade de complexo que participou do processo catalítico é a que estava na superfície do eletrodo na voltametria cíclica, a concentração pode ser determinada pela integral da carga passada na onda redox reversível $\text{Cu}^{2+/+}$ na ausência do substrato. O valor obtido foi $2.5 \times 10^{-10} \text{ mol. cm}^{-2}$.

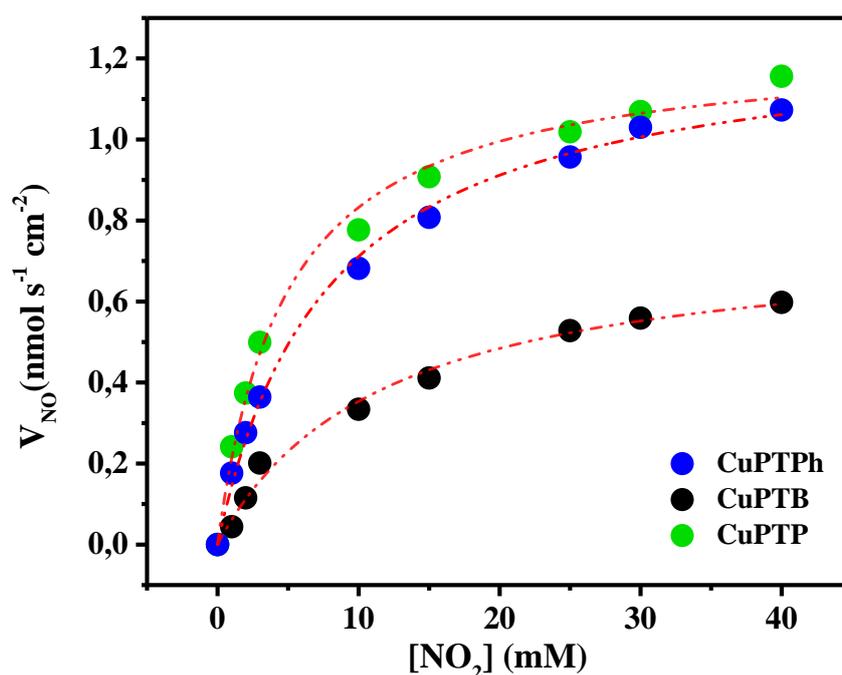
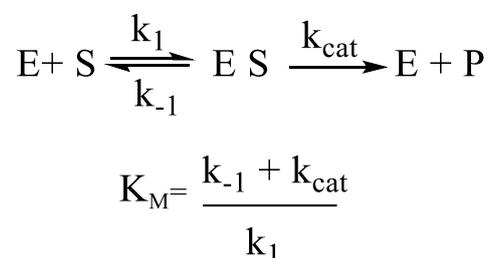


FIGURA 4.55- Gráfico da concentração de NO_2^- vs V_{NO} .

TABELA 4.7- Comparação dos potenciais de meia onda, de redução, dos valores de $V_{\text{máx}}$, K_{M} , k_{cat} e eficiência catalítica dos complexos de Cobre.

	CuPTPh	CuPTB	CuPTP
$V_{\text{máx}}$ (nmol s⁻¹ cm⁻²)	1,27	0,76	1,23
K_{M} (mM)	7,86	11,7	4,87
k_{cat} (s⁻¹)	5,08	3,04	4,92
$k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ (M⁻¹ s⁻¹)	646,3	259,8	1010,2

A constante de Michaelis-Menten (K_M) está relacionada à afinidade de ligação do substrato e também à velocidade com que o complexo enzima-substrato (ES) é transformado em produto (k_{cat}).



O complexo CuPTB apresentou um maior valor de K_M , indicando que este complexo tem uma menor afinidade com o substrato comparado com o CuPTPh e CuPTP. Seu menor valor de k_{cat} indica que a reação para a formação do produto é mais lenta. Isso está relacionado com a sua menor atividade catalítica.

O complexo CuPTPh tem um valor de K_M maior quando comparado ao complexo CuPTP. Isso explica por que nos voltamogramas da Figura 4.50 o complexo CuPTPh apresentou corrente catalítica maior que o complexo CuPTP. Neste experimento a alta concentração de nitrito inicialmente adicionada, favorece sua coordenação ao complexo, compensando o alto valor de K_M . O complexo CuPTP, portanto, tem um menor valor de K_M , e um valor de k_{cat} ligeiramente menor que o do complexo CuPTPh.

A relação k_{cat}/K_M indica a eficiência catalítica dos complexos. O complexo CuPTP apresentou um maior valor de k_{cat}/K_M , seguido do complexo CuPTPh e CuPTB, corroborando com os estudos catalíticos anteriores. A eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) do complexo CuPTP é semelhante à relatada para um complexo de cobre tetradentado com o ligante tris(2-metilpiridil)amina ($1200 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁴¹ Isso indica que o grupo *n*-propanol do complexo pode auxiliar a protonação via transferência de elétrons acoplada ao próton, de maneira semelhante ao mecanismo sugerido por CIONCOLONI et al. (2018).⁴¹ O grupo *n*-propanol, portanto, mimetiza o resíduo de aspartato do sítio ativo de CuNiR.

Curiosamente, a estrutura cristalina do CuPTPh evidencia a presença de duas moléculas de água coordenadas ao cobre. Essa característica é semelhante às enzimas *Br^{2D}NiR* que apresentam uma eficiência catalítica diminuída de ~100 vezes em comparação com CuNiR com uma molécula de água coordenada, como *AxNiR*.¹¹ O k_{cat}/K_M dessas NiR é da ordem de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,^{12,25} indicando que k_{cat}/K_M da NiR coordenado com duas águas pode ser em torno de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esta eficiência catalítica é apenas uma ordem de grandeza maior do que a obtida para o complexo CuPTP, indicando uma boa semelhança entre o complexo CuPTP e o sítio ativo da *Br^{2D}NiR*.

4.2.6- Proposta do mecanismo catalítico dos complexos miméticos.

Com base nos resultados obtidos, foi proposto o mecanismo para a reação de redução do nitrito pelos complexos CuPTPh, CuPTB e CuPTP (Figura 4.56). Inicialmente a coordenação do nitrito ao complexo de cobre ocorre pelo modo de coordenação bidentado $\kappa^2\text{-NO}_2$, substituindo as duas moléculas de água. Com a adição de ácido benzóico como doador de prótons, foi observado que o nitrito coordenado isomeriza para o modo de coordenação $\kappa^1\text{-NO}_2$. Em seguida, os complexos puderam ser reduzidos química e eletroquimicamente para formar complexos de Cu^{1+} que rapidamente reoxidam transferindo um elétron para o nitrito e gerando o NO. Esse mecanismo corrobora com o mecanismo II proposto para a CuNiR.

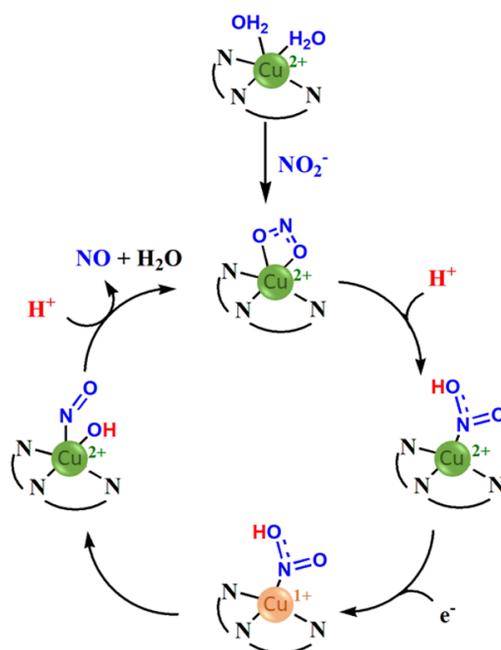


FIGURA 4.56- Mecanismo proposto para a redução do nitrito com complexos de cobre deste trabalho.

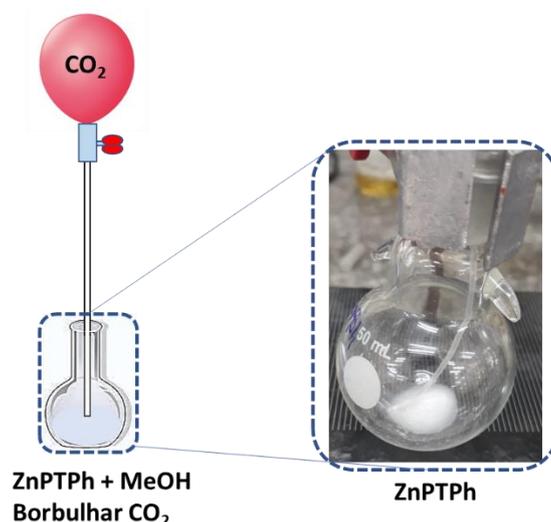
4.3- Atividade mimética anidrase carbônica dos complexos de Zn^{2+}

A atividade mimética dos complexos de Zn^{2+} para a reação de hidratação do CO_2 foi avaliada. Como esta é uma enzima rápida para a geração de bicarbonato e seu mecanismo já é bem definido, foram avaliados a fixação de CO_2 em solvente orgânico, hidratação e captura do CO_2 pelos complexos de Zn^{2+} .

4.3.1 – Estudo de Fixação do CO_2 .

Na enzima anidrase carbônica o CO_2 é inicialmente fixado, formando o íon carbonato coordenado, o qual é posteriormente substituído por moléculas de água. O modo de coordenação do bicarbonato é importante pois este pode influenciar nas reações catalíticas. Por exemplo, se ele coordena-se ao metal de modo bidentado ou em ponte, poderia inibir ou tornar o processo catalítico mais lento.^{65,102}

A fixação de CO_2 pelos complexos de zinco foi avaliada borbulhando-se CO_2 (contido em um balão) na solução dos complexos em metanol (Figura 4.57), previamente desaerada. O solvente orgânico foi utilizado para evitar a troca do bicarbonato coordenado por moléculas de água.



Fonte: Próprio Autor

FIGURA 4.57- Ilustração do borbulhamento de gás CO_2 na solução do complexo CuPTPh e foto da formação do precipitado após 1h.

Observou-se que após 1h borbulhando CO_2 , um precipitado branco foi formado nos experimentos no caso dos complexos ZnPTP e ZnPTB . Com o complexo ZnPTPh , a formação do precipitado ocorreu em 30 min. Os sólidos obtidos foram separados da solução e após a secagem, foram feitas as análises no infravermelho. O espectro de infravermelho dos complexos ZnPTPh , ZnPTB e ZnPTP em pastilha de KBr antes e após borbulhar CO_2 estão ilustrados nas Figuras 4.58-4.60.

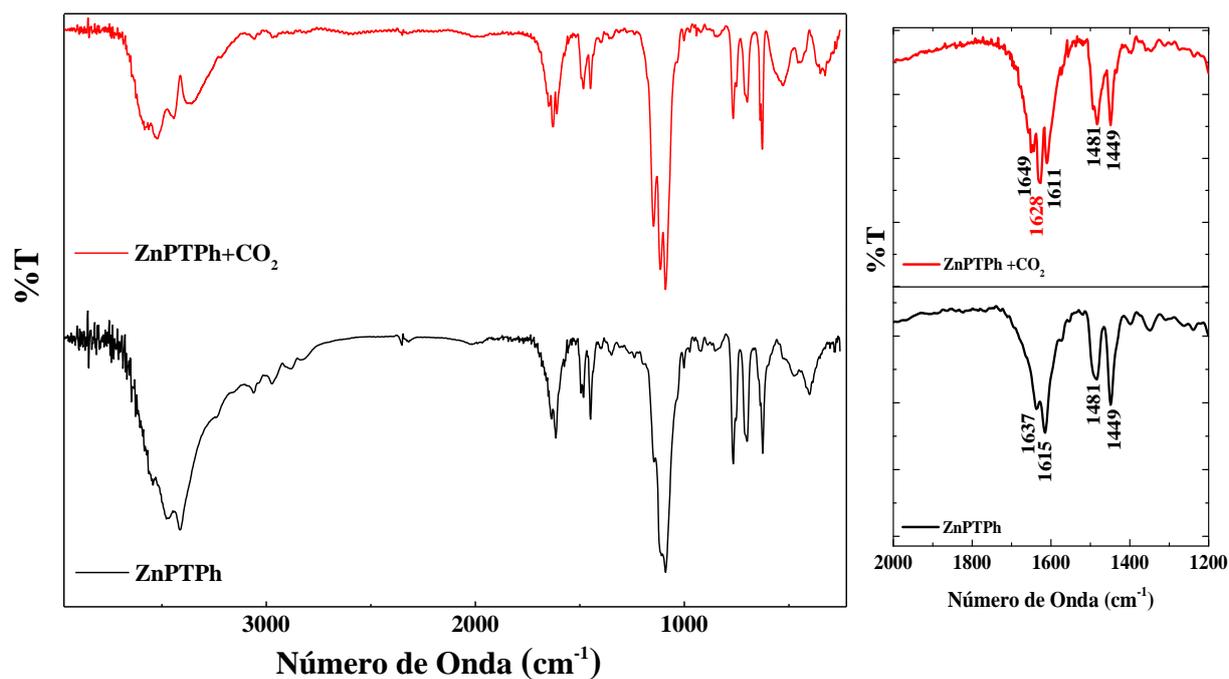


FIGURA 4.58- Espectro de Infravermelho do complexo ZnPTPh antes e após borbulhar CO₂. A direita, a expansão da região de 2000 a 1200 cm⁻¹.

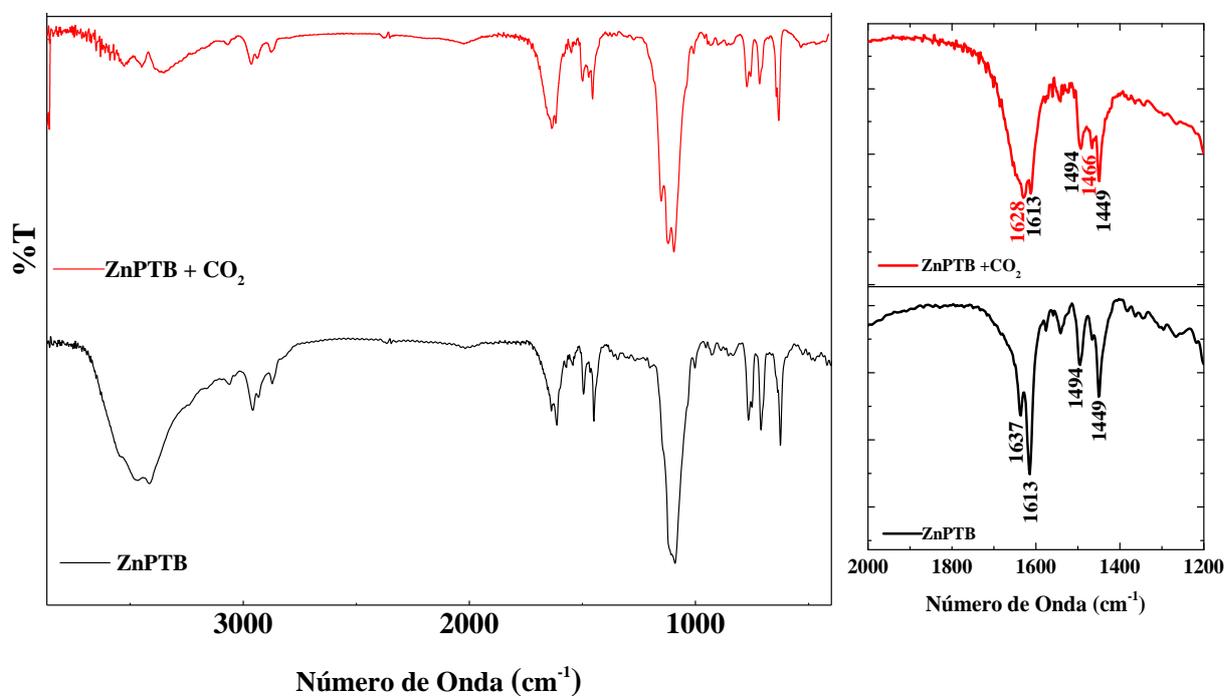


FIGURA 4.59- Espectro de Infravermelho do complexo ZnPTB antes e após borbulhar CO₂. A direita, a expansão da região de 2000 a 1200 cm⁻¹.

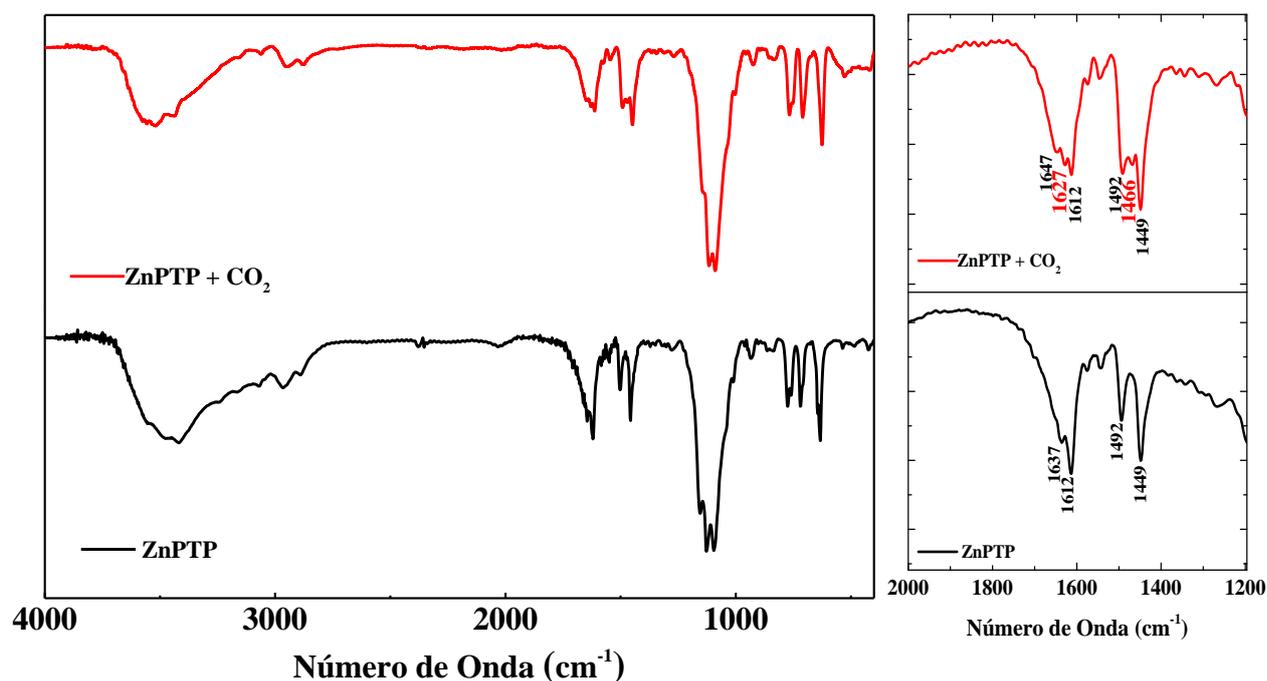


FIGURA 4.60- Espectro de Infravermelho do complexo ZnPTP antes e após borbulhar CO₂. A direita, a expansão da região de 2000 a 1200 cm⁻¹.

Os espectros dos complexos após borbulhar CO₂ são semelhantes ao inicial, porém observa-se o surgimento de bandas na região de 1628 cm⁻¹ comum a todos os complexos. Nos complexos ZnPTP e ZnPTB observa-se também a banda em 1466 cm⁻¹. Essas bandas foram atribuídas ao ν_s e $\nu_{ass}(\text{C}=\text{O})$ do bicarbonato coordenado monodentado, de acordo com compostos semelhantes da literatura.^{77,103} No complexo ZnPTPh essa banda pode estar encoberta pelas bandas de $\nu(\text{C}=\text{C})$. O modo de coordenação monodentado é mais favorecido para os complexos de Zn²⁺, sendo o bidentado mais comum para complexos com outros centros metálicos.^{65,104} Este é um dos fatores que causa a diminuição da atividade catalítica da enzima Anidrase Carbônica quando o zinco é substituído por outros metais.^{53,105}

A obtenção dos espectros de RMN ^1H dos complexos com o bicarbonato coordenado não foi possível, devido às suas insolubilidades e dissociação nos solventes orgânicos deuterados testados.¹⁰⁶

Portanto, os complexos ZnPTPh, ZnPTB e ZnPTP foram eficientes para a fixação de CO_2 em solução de metanol, na forma de bicarbonato monodentado, como ilustrado na Figura 4.61.

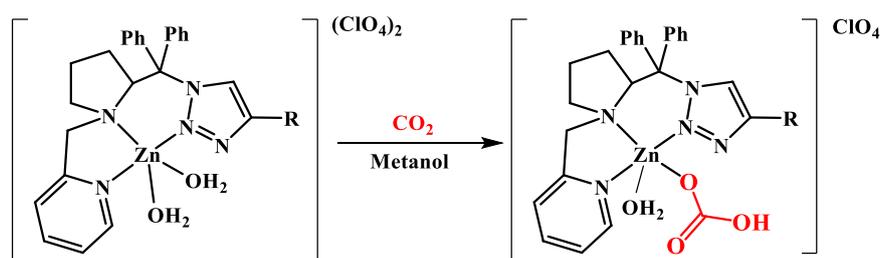
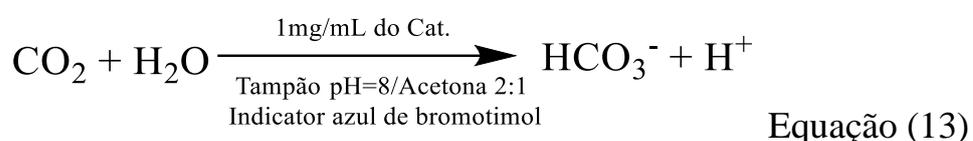


FIGURA 4.61- Ilustração do modo de coordenação do bicarbonato nos complexos de Zn^{2+} .

4.3.2 – Reação de hidratação do CO_2

Os estudos de hidratação do CO_2 foram realizados com a adição dos complexos de zinco em uma solução tampão pH=8/ Acetona, na proporção 2:1 e adição do indicador de pH azul de bromotimol. O meio básico permite uma rápida desprotonação da molécula de água coordenada para formar o hidróxido complexo. A adição do solvente orgânico foi necessária devido a insolubilidade dos complexos em água. A formação do íon bicarbonato causa uma diminuição do pH da solução, essa diminuição do pH foi acompanhada por espectroscopia de UV-Vis pela diminuição da banda $\lambda_{\text{máx}} = 626 \text{ nm}$ do indicador de pH azul de bromotimol (Figura 4.62).



Após borbulhar CO_2 nas soluções foi observado que os complexos ZnPTPh, ZnPTB e ZnPTP foram eficientes para a diminuição do pH quando comparados com a reação sem o complexo (branco). Os valores das velocidades iniciais obtidos foram de 2,56; 1,1 e 0,96 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para os complexos ZnPTP, ZnPTB e ZnPTPh, respectivamente. O ZnPTP foi o complexo que conseguiu uma diminuição do pH mais rápido, seguido dos complexos ZnPTB e ZnPTPh.

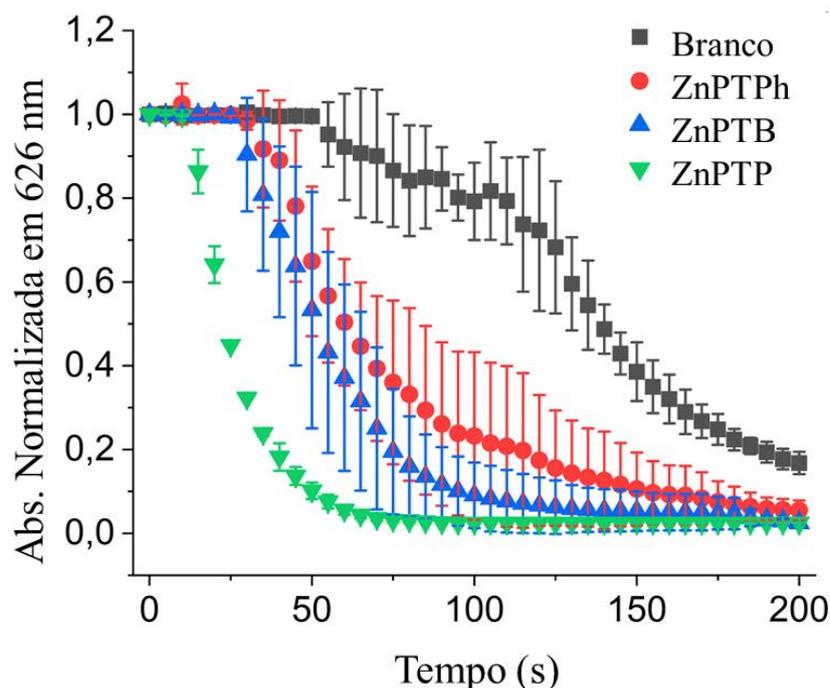


FIGURA 4.62- Gráfico da absorvância da banda com $\lambda_{\text{máx}}$ em 626 nm do indicador azul de bromotimol vs tempo.

Como observado por PARK e LEE (2019)⁶⁶ em seus estudos com complexos de Zn^{2+} , a adição de um substituinte OH no ligante, que possa interagir com a molécula de água coordenada por ligação de hidrogênio, causa a diminuição do pK_a da água coordenada de 8,0 para 6,8. A rede de ligação de hidrogênio estabiliza o hidróxido formado, causa um aumento do comprimento da ligação Zn-OH e aumenta a nucleofilicidade do hidróxido.⁶⁶ Esse substituinte, portanto, mimetiza o aminoácido Thr-199 que atua na desprotonação da água coordenada. Assim, a reação mais rápida do complexo ZnPTP pode ser devido ao

substituinte *n*-propanol que pode interagir com a molécula de água coordenada, facilitando a etapa de desprotonação, como ilustrado na Figura 4.63.^{107,108}

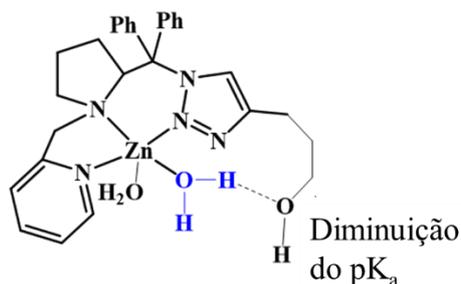


FIGURA 4.63-Ilustração do complexo ZnPTP com o grupo *n*-propanol atuando na desprotonação da água coordenada.

Além disso, outro fator importante é que o substituinte *n*-propanol tem mobilidade perto do sítio ativo, o que pode facilitar a saída do bicarbonato coordenado. Como relatado na literatura, grupos mais volumosos próximo ao bicarbonato coordenado mimetizam a região hidrofóbica da enzima e podem facilitar a saída do bicarbonato, além de impedir que este se coordene em ponte, o que causaria uma mais lenta troca pela molécula de água.⁵¹ Apesar da semelhança da atividade do complexo ZnPTB com o ZnPTPh (com base nos valores do erro), o complexo com o grupo *n*-butil também apresenta em sua estrutura o substituinte que pode mimetizar a região mais hidrofóbica da enzima.

Esses estudos indicam que os complexos ZnPTPh, ZnPTB e ZnPTP mimetizam a primeira esfera de coordenação da enzima anidrase carbônica. Além disso, o complexo ZnPTP, contém um grupo substituinte que mimetiza também a segunda esfera de coordenação.

4.3.3- Formação de CaCO₃

Como os complexos de Zn²⁺ foram eficientes para a formação do HCO₃⁻, a reação de captura do CO₂ como CaCO₃ foi realizada. Após borbulhar CO₂ na solução do complexo em tampão pH=8/ Acetona 2:1 e um excesso de CaCl₂, foi observado a formação de um precipitado. O sólido obtido foi separado

da solução, lavado com acetona, pesado e as massas do CaCO_3 formado estão ilustrados na Figura 4.64.

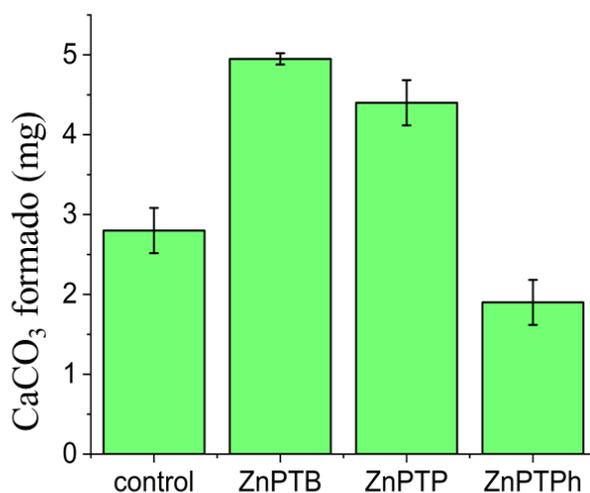


FIGURA 4.64- Gráfico das massas de CaCO_3 após a reação de hidratação dos complexos de Zn^{2+} .

Neste experimento foi observado que a quantidade de CaCO_3 formado com os complexos ZnPTB e ZnPTP são de ~5,0 e 4,5 mg, respectivamente, para o complexo ZnPTPh, a massa de CaCO_3 formado foi menor que a obtida para o controle. A inibição causada no complexo ZnPTPh pode ser devido ao excesso de íons Cl^- na solução, o qual pode interferir no processo catalítico por sua alta afinidade aos complexos com carga 2+. O complexo com o grupo fenil pode permitir que mais íons cloretos se aproximem dificultando a reação com o CO_2 .

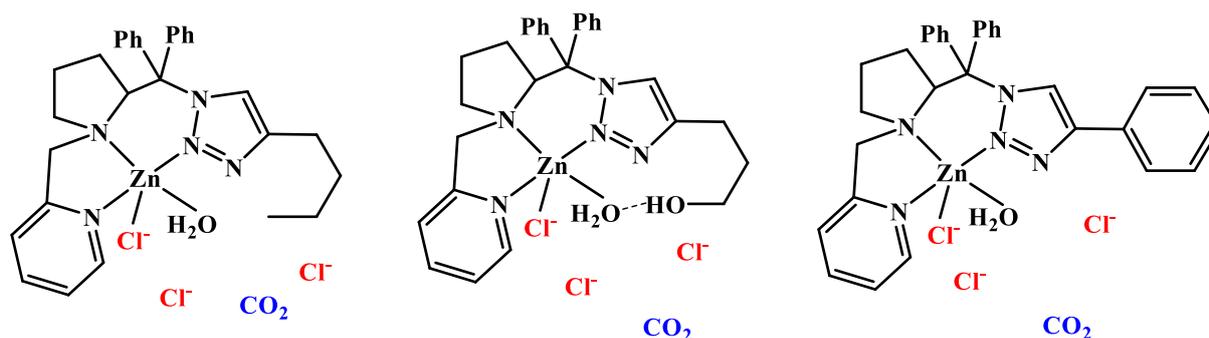


FIGURA 4.65- Ilustração dos complexos de zinco na presença de excesso de íons Cl⁻.

Como ilustrado na Figura 4.65, os íons cloretos podem coordenar no centro metálico tornando o processo catalítico dos complexos mais lenta. Porém, os complexos de ZnPTP e ZnPTB apresentam ligantes com substituintes que podem interferir na coordenação desses íons ao centro metálico, enquanto que no complexo ZnPTPh com o grupo fenil, isso não acontece. Esse estudo ressalta a importância da segunda esfera de coordenação dos complexos miméticos.

Muitos complexos com ligantes tridentados são relatados na literatura, com estudos em solvente orgânico para a reação estequiométrica com CO₂, porém neste estudo foi mostrado que os complexos ZnPTPh, ZnPTB e ZnPTP com ligantes volumosos, conseguem mimetizar a enzima em uma solução tampão/acetona.

5- CONCLUSÃO

Foram sintetizados e caracterizados três novos ligantes tridentados com pontos de coordenação “NNN” e diferentes grupos substituintes R. A partir destes foram sintetizados os complexos miméticos da enzima CuNiR e da enzima Anidrase Carbônica.

As estruturas dos complexos de cobre são semelhantes à enzima CuNiR com duas moléculas de água coordenada ($Br^{2D}NiR$). Os complexos de Cu^{2+} foram catalisadores eficientes para a geração de NO tanto por catálise química com ascorbato, quanto por eletrocatalise. Os complexos apresentaram uma alta afinidade ao substrato e seguiram a mesma rota catalítica para a redução do nitrito. Foi observado a importância da segunda esfera de coordenação nos complexos miméticos, onde o CuPTP com o grupo *n*-propanol atuou no transporte de prótons em um mecanismo de transferência de elétrons acoplada ao próton, conferindo a este os melhores resultados catalíticos, seguido do CuPTPh e CuPTB. A eficiência catalítica do complexo CuPTP foi uma ordem de magnitude a menos que a enzima $Br^{2D}NiR$ com eficiência catalítica de $10^4 M^{-1} s^{-1}$.

Os complexos de zinco apresentaram estruturas semelhantes aos complexos de cobre. Os três complexos conseguiram fixar o CO_2 na forma de bicarbonato, e foi observado que o complexo mais rápido para a formação de bicarbonato foi o ZnPTP, devido seu grupo atuar na desprotonação da molécula de água, além de ter mobilidade para causar um impedimento no sítio catalítico e proporcionar uma saída mais rápida do bicarbonato.

A obtenção de compostos miméticos que sejam catalisadores eficientes como a enzima, ainda é um desafio, visto a complexa estrutura e diversas interações presentes nas enzimas. Portanto, os estudos envolvendo estes compostos podem trazer cada vez mais informações úteis para a obtenção de catalisadores mais eficientes.

REFERÊNCIAS

1. Cardoso, C. L., De Moraes, M. C. & Cass, Q. B. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: A tool to research of inhibitor compounds. *Quim. Nova* 32, 175–187 (2009).
2. Thompson, Z. & Cowan, J. A. Artificial Metalloenzymes: Recent Developments and Innovations in Bioinorganic Catalysis. *Small* 16, 1–18 (2020).
3. Castro, C. B., Ferreira, M. P. & Marques Netto, C. G. C. Metalloenzyme mechanisms correlated to their turnover number and metal lability. *Curr. Res. Chem. Biol.* 1, 100004 (2021).
4. Sun, Y. J., Huang, Q. Q. & Zhang, J. J. Series of structural and functional models for the ES (enzyme-substrate) complex of the Co(II)-containing quercetin 2,3-dioxygenase. *Inorg. Chem.* 53, 2932–2942 (2014).
5. Zhao, M., Wang, H. B., Ji, L. N. & Mao, Z. W. Insights into metalloenzyme microenvironments: Biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere. *Chem. Soc. Rev.* 42, 8360–8375 (2013).
6. Crabtree, R. H. Multifunctional ligands in transition metal catalysis. *New J. Chem.* 35, 18–23 (2011).
7. Ng, G. K. Y., Ziller, J. W. & Borovik, A. S. Preparation and structures of dinuclear complexes containing MII–OH centers. *Chem. Commun.* 48, 2546–2548 (2012).
8. Hematian, S., Siegler, M. A. & Karlin, K. D. Nitric oxide generation from heme/copper assembly mediated nitrite reductase activity Topical Issue in honor of Ivano Bertini. Guest editors: Lucia Banci, Claudio Luchinat. *J. Biol. Inorg. Chem.* 19, 515–528 (2014).
9. Li, Y., Hodak, M. & Bernholc, J. Enzymatic mechanism of copper-containing nitrite reductase. *Biochemistry* 54, 1233–1242 (2015).
10. Merkle, A. C. & Lehnert, N. Binding and activation of nitrite and nitric

- oxide by copper nitrite reductase and corresponding model complexes. *Dalt. Trans.* 41, 3355–3368 (2012).
11. Sasaki, D. et al. Reverse protein engineering of a novel 4-domain copper nitrite reductase reveals functional regulation by protein–protein interaction. *FEBS J.* 288, 262–280 (2021).
 12. Fukuda, Y. et al. Structural and functional characterization of the *Geobacillus* copper nitrite reductase: Involvement of the unique N-terminal region in the interprotein electron transfer with its redox partner. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 396–405 (2014).
 13. Fukuda, Y., Hirano, Y., Kusaka, K., Inoue, T. & Tamada, T. High-resolution neutron crystallography visualizes an OH-bound resting state of a copper-containing nitrite reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 4071–4077 (2020).
 14. Ghosh, S., Dey, A., Sun, Y., Scholes, C. P. & Solomon, E. I. Spectroscopic and computational studies of nitrite reductase: Proton induced electron transfer and backbonding contributions to reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 277–288 (2009).
 15. Rose, S. L. et al. An unprecedented insight into the catalytic mechanism of copper nitrite reductase from atomic-resolution and damage-free structures. (2021).
 16. Leferink, N. G. H. et al. Proton-coupled electron transfer in the catalytic cycle of *Alcaligenes xylosoxidans* copper-dependent nitrite reductase. *Biochemistry* 50, 4121–4131 (2011).
 17. Maekawa, S., Matsui, T., Hirao, K. & Shigeta, Y. Theoretical Study on Reaction Mechanisms of Nitrite Reduction by Copper Nitrite Complexes: Toward Understanding and Controlling Possible Mechanisms of Copper Nitrite Reductase. *J. Phys. Chem. B* 119, 5392–5403 (2015).
 18. Averill, B. A. Dissimilatory nitrite and nitric oxide reductases. *Chem. Rev.* 96, 2951–2964 (1996).

19. Maji, R. C. et al. Copper complexes relevant to the catalytic cycle of copper nitrite reductase: Electrochemical detection of NO(g) evolution and flipping of NO₂ binding mode upon Cu(II) → Cu(I) reduction. *Inorg. Chem.* 52, 11084–11095 (2013).
20. Zhang, X. et al. Recent advances in electrocatalytic nitrite reduction. *Chem. Commun.* 2777–2787 (2022) doi:10.1039/d1cc06690k.
21. Kataoka, K., Furusawa, H., Takagi, K., Yamaguchi, K. & Suzuki, S. Functional analysis of conserved aspartate and histidine residues located around the type 2 copper site of copper-containing nitrite reductase. *J. Biochem.* 127, 345–350 (2000).
22. Antonyuk, S. V., Strange, R. W., Sawers, G., Eady, R. R. & Hasnain, S. S. Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12041–12046 (2005).
23. Maia, L. B. & Moura, J. J. G. How biology handles nitrite. *Chem. Rev.* 114, 5273–5357 (2014).
24. Brenner, S. et al. Demonstration of proton-coupled electron transfer in the copper-containing nitrite reductases. *J. Biol. Chem.* 284, 25973–25983 (2009).
25. Leferink, N. G. H. et al. Impact of residues remote from the catalytic centre on enzyme catalysis of copper nitrite reductase. *Nat. Commun.* 5, 1–8 (2014).
26. Woollard-Shore, J. G., Holland, J. P., Jones, M. W. & Dilworth, J. R. Nitrite reduction by copper complexes. *Dalt. Trans.* 39, 1576–1585 (2010).
27. Knott, A. B. & Bossy-Wetzel, E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxidants Redox Signal.* 11, 541–553 (2009).
28. Maria, S., Chattopadhyay, T., Ananya, S. & Kundu, S. Reduction of nitrite to NO at a mononuclear copper(II)-phenolate site. *Inorganica Chim. Acta* 506, (2020).

29. Hao, D. et al. Emerging artificial nitrogen cycle processes through novel electrochemical and photochemical synthesis. *Mater. Today* 46, 212–233 (2021).
30. Kujime, M. & Fujii, H. Spectroscopic characterization of reaction intermediates in a model for copper nitrite reductase. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 45, 1089–1092 (2006).
31. Halfen, J. A. & Tolman, W. B. Synthetic Model of the Substrate Adduct to the Reduced Active Site of Copper Nitrite Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 5475–5476 (1994).
32. Halfen, J. A. et al. Synthetic modeling of nitrite binding and activation by reduced copper proteins. Characterization of copper(I)-nitrite complexes that evolve nitric oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 763–776 (1996).
33. Chang, Y. et al. Structure and nitrite reduction reactivity study of bio-inspired copper(I)-nitro complexes in steric and electronic considerations of tridentate nitrogen ligands. 5335–5341 (2018) doi:10.1039/c7dt03843g.
34. Kujime, M., Izumi, C., Tomura, M., Hada, M. & Fujii, H. Effect of a Tridentate Ligand on the Structure, Electronic Structure, and Reactivity of the Copper (I) Nitrite Complex: Role of the Conserved Three-Histidine Ligand Environment of the Type-2 Copper Site in Copper-Containing Nitrite Reductases. 6088–6098 (2008).
35. Casella, L., Carugo, O., Gullotti, M., Doldi, S. & Frassoni, M. Synthesis, Structure, and Reactivity of Model Complexes of Copper Nitrite Reductase. *Inorg. Chem.* 35, 1101–1113 (1996).
36. Siek, S., Dixon, N. A. & Papish, E. T. Electrochemical reduction of Ttz copper(II) complexes in the presence and absence of protons: Processes relevant to enzymatic nitrite reduction (TtzR, R' = tris(3-R, 5-R'-1, 2, 4-triazolyl)borate). *Inorganica Chim. Acta* 459, 80–86 (2017).
37. Hunt, A. P. et al. Nitric Oxide Generation on Demand for Biomedical Applications via Electrocatalytic Nitrite Reduction by Copper BMPA-

- And BEPA-Carboxylate Complexes. *ACS Catal.* 9, 7746–7758 (2019).
38. Ren, H. et al. Electrochemically modulated nitric oxide (NO) releasing biomedical devices via copper(II)-tri(2-pyridylmethyl)amine mediated reduction of nitrite. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 3779–3783 (2014).
39. Tegoni, M., Yu, F., Bersellini, M., Penner-Hahn, J. E. & Pecoraro, V. L. Designing a functional type 2 copper center that has nitrite reductase activity within α -helical coiled coils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 21234–21239 (2012).
40. Wijma, H. J., Canters, G. W., De Vries, S. & Verbeet, M. P. Bidirectional catalysis by copper-containing nitrite reductase. *Biochemistry* 43, 10467–10474 (2004).
41. Cioncoloni, G. et al. Proton-Coupled Electron Transfer Enhances the Electrocatalytic Reduction of Nitrite to NO in a Bioinspired Copper Complex. *ACS Catal.* 8, 5070–5084 (2018).
42. Orain, C. et al. Electrocatalytic reduction of nitrite ions by a copper complex attached as SAMs on gold by ‘self-induced electroclick’: Enhancement of the catalytic rate by surface coverage decrease. *Electrochem. commun.* 34, 204–207 (2013).
43. Migita, Y. et al. Electrocatalytic nitrite reduction to nitrogen oxide by a synthetic analogue of the active site of cu-containing nitrite reductase incorporated in nafion film. *Electroanalysis* 21, 2441–2446 (2009).
44. Wijma, H. J., Jeuken, L. J. C., Verbeet, M. P., Armstrong, F. A. & Canters, G. W. A random-sequential mechanism for nitrite binding and active site reduction in copper-containing nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 281, 16340–16346 (2006).
45. Roger, I., Wilson, C., Senn, H. M., Sproules, S. & Symes, M. D. An investigation into the unusual linkage isomerization and nitrite reduction activity of a novel tris(2-pyridyl) copper complex. *R. Soc. Open Sci.* 4, (2017).

46. Scarpellini, M., Neves, A., Castellano, E. E., De Almeida Neves, E. F. & Franco, D. W. A structural model for oxidized type II copper nitrite reductase with a polyimidazole tripodal ligand. *Polyhedron* 23, 511–518 (2004).
47. Maren, H. ‘Physiological Reviews.’ *Lancet* 196, 958 (1920).
48. Hewett-Emmett, D. & Tashian, R. E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 50–77 (1996).
49. Krishnamurthy, V. M. et al. Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein – Ligand Binding. 946–1051 (2008).
50. Keilin, D. Carbonic anhydrase, purification and nature of the enzyme. *Pharmacol. Ther.* 74, 1–20 (1940).
51. Strasse, S. & June, R. Zn(II). 5749–5755 (1993) doi:10.1021/ic00077a017.
52. Rogers, D. M., Jiao, D., Pratt, L. R. & Rempe, S. B. Structural Models and Molecular Thermodynamics of Hydration of Ions and Small Molecules. *Annual Reports in Computational Chemistry* vol. 8 (Elsevier, 2012).
53. Kim, J. K. et al. Elucidating the role of metal ions in carbonic anhydrase catalysis. *Nat. Commun.* 11, 1–10 (2020).
54. Song, H., Wilson, D. L., Farquhar, E. R., Lewis, E. A. & Emerson, J. P. Revisiting zinc coordination in human carbonic anhydrase II. *Inorg. Chem.* 51, 11098–11105 (2012).
55. Crichton, R. R. Zinc – Lewis Acid and Gene Regulator. *Biol. Inorg. Chem.* 229–246 (2012) doi:10.1016/b978-0-444-53782-9.00012-7.
56. Coleman, J. E. Zinc enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 222–234 (1998).
57. Pérez-Fortes, M., Schöneberger, J. C., Boulamanti, A. & Tzimas, E. Methanol synthesis using captured CO₂ as raw material: Techno-economic and environmental assessment. *Appl. Energy* 161, 718–732 (2016).
58. Huang, Y. et al. A Zinc Coordination Complex Mimicking Carbonic

- Anhydrase for. *Inorg. Chem.* 58, 9916–9921 (2019).
59. Liang, S., Wu, X., Zong, M. & Lou, W. Zn-triazole coordination polymers : Bioinspired carbonic anhydrase mimics for hydration and sequestration of CO₂. *Chem. Eng. J.* 398, 125530 (2020).
 60. Ibrahim, M. M., Shaban, S. Y. & Ichikawa, K. A promising structural zinc enzyme model for CO₂ fixation and calcification. *Tetrahedron Lett.* 49, 7303–7306 (2008).
 61. Zhangt, X. & Eldik, R. Van. A Functional Model for Carbonic Anhydrase: Thermodynamic and Kinetic Study of a Tetraazacyclododecane Complex of Zinc(II). 5606–5614 (1995).
 62. LINDSKOG, S. Effects of pH and inhibitors on some properties related to metal binding in bovine carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 238, 945–951 (1963).
 63. Alsfasser, R., Vahrenkamp, H., Trofimenko, S., Looney, A. & Parkin, G. A Mononuclear Zinc Hydroxide Complex Stabilized by a Highly Substituted Tris(pyrazolyl)hydroborato Ligand: Analogies with the Enzyme Carbonic Anhydrase. *Inorg. Chem.* 30, 4098–4100 (1991).
 64. Echizen, T. et al. Nucleophilic reaction by carbonic anhydrase model zinc compound: Characterization of intermediates for CO₂ hydration and phosphoester hydrolysis. *J. Inorg. Biochem.* 98, 1347–1360 (2004).
 65. Lee, M. S., Park, D. & Lee, M. S. Kinetic study of catalytic CO₂ hydration by metal- substituted biomimetic carbonic anhydrase model complexes. (2019).
 66. Park, D. K. & Lee, M. S. Kinetic study of CO₂ hydration by small-molecule catalysts with a second coordination sphere that mimic the effect of the Thr-199 residue of carbonic anhydrase. *Biomimetics* 4, (2019).
 67. Kitajima, N., Hikichi, S., Tanaka, M. & Moro-oka, Y. Fixation of Atmospheric CO₂ by a Series of Hydroxo Complexes of Divalent Metal Ions and the Implication for the Catalytic Role of Metal Ion in Carbonic

- Anhydrase. Synthesis, Characterization, and Molecular Structure of $[LM(OH)]_n$ ($n = 1$ or 2) and $LM(\mu-CO_3)$. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 5496–5508 (1993).
68. Andring, J. T., Kim, C. U. & McKenna, R. Structure and mechanism of copper-carbonic anhydrase II: A nitrite reductase. *IUCrJ* 7, 287–293 (2020).
69. Shen, Y., Feng, X., Li, Y., Zhang, G. & Jiang, Y. Asymmetric Cyanosilylation of Ketones Catalyzed by Bifunctional Chiral N-Oxide Titanium Complex Catalysts. *European J. Org. Chem.* 129–137 (2004) doi:10.1002/ejoc.200300415.
70. Reyes-Rangel, G., Vargas-Caporali, J. & Juaristi, E. In search of diamine analogs of the α,α -diphenyl prolinol privileged chiral organocatalyst. Synthesis of diamine derivatives of α,α -diphenyl-(S)-prolinol and their application as organocatalysts in the asymmetric Michael and Mannich reactions. *Tetrahedron* 72, 379–391 (2016).
71. Baptista, L. et al. A reação “Click” na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. *Quim. Nova.* 34, 1791–1804 (2011).
72. Adleb, A. D., Longo, F. R. & Finarelli, J. D. for meso-Tetraphenylporphyrin line TPP of relatively high purity . In addition , the general Fluorinated Anils. *J. Org. Chem.* 32, 476 (1966).
73. Sikervar, V. Ruthenium, Carbonyl[5,10,15,20-tetraphenyl-21 H ,23 H -porphinato(2-)- $\kappa N 21,\kappa N 22,\kappa N 23,\kappa N 24$]- . *Encycl. Reagents Org. Synth.* 1–6 (2015) doi:10.1002/047084289x.rm01886.
74. Química, P. D. E. P. E. M., Bueno, G., Pereira, S. & Sp, S. C. Universidade federal de são carlos. (2020).
75. Isoda, N., Yokoyama, H., Nojiri, M., Suzuki, S. & Yamaguchi, K. Electroreduction of nitrite to nitrogen oxide by a copper-containing nitrite reductase model complex incorporated into collagen film. *Bioelectrochemistry* 77, 82–88 (2010).

76. Nabipour, H., Wang, X., Song, L. & Hu, Y. Facile synthesis of a novel zinc-triazole complex for simultaneous improvement in fire safety and mechanical properties of epoxy resins. *Compos. Part A* 143, 106284 (2021).
77. Ibrahim, M. M., Amin, M. A. & Ichikawa, K. Synthesis and characterization of benzimidazole-based zinc complexes as structural carbonic anhydrase models and their applications towards CO₂ hydration. *J. Mol. Struct.* 985, 191–201 (2011).
78. Pavia, D. et al. *Introdução à espectroscopia*. 6th ed.; cengage learning, 2010.
79. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A : Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*. 6th ed.; Wiley: New York, 1986.
80. Velho, R. G. *Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química- UFSCar. Dissertação de mestrado, 170 p. (2006).
81. Geary, W. The use of conductivity measurements in organic solvents. *Coord. Chem. Rev.* 7, 81-122 (1971).
82. Manikandan, P., Justin Thomas, K. R. & Manoharan, P. T. Structural and spectral diversities in copper(n) complexes of 2,6-bis(3,5-dimethylpyrazol-1-ylmethyl)pyridine. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 2779–2785 (2000)
83. Elliott, A. H. The american chemical society. *J. Am. Chem. Soc.* 2, 73 (1880).
84. Leandri, V. et al. Electronic and Structural Effects of Inner Sphere Coordination of Chloride to a Homoleptic Copper(II) Diimine Complex. *Inorg. Chem.* 57, 4556–4562 (2018).
85. Van Benschoten, J. J., Lewis, J. Y., Heineman, W. R., Roston, D. A. & Kissinger, P. T. Cyclic voltammetry experiment. *J. Chem. Educ.* 60, 772–776 (1983).

86. Kissinger, P. T. & Heineman, W. R. Cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.* 60, 702–706 (1983).
87. Maji, R. C. et al. A Copper(II) Nitrite That Exhibits Change of Nitrite Binding Mode and Formation of Copper(II) Nitrosyl Prior to Nitric Oxide Evolution. *Inorg. Chem.* 57, 1550-1561 (2018)
88. Beretta, M. et al. Copper complexes of a new tridentate imidazole-containing ligand: Spectroscopy, structures and nitrite reductase reactivity: The molecular structures of [Cu(biap)(NO₂)₂] and [Cu(biap)Br₂]. *Inorganica Chim. Acta* 310, 41–50 (2000).
89. Moraes, M. C. B. et al. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Quim. Nova.* 26, 556–563 (2003).
90. Chandra Maji, R. et al. A Copper(II) Nitrite That Exhibits Change of Nitrite Binding Mode and Formation of Copper(II) Nitrosyl Prior to Nitric Oxide Evolution. *Inorg. Chem.* 57, 1550–1561 (2018).
91. Kundu, S., Kim, W. Y., Bertke, J. A. & Warren, T. H. Copper(II) Activation of Nitrite: Nitrosation of Nucleophiles and Generation of NO by Thiols. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 1045–1048 (2017).
92. Indra, A., Mobin, S. M., Bhaduri, S. & Lahiri, G. K. Pentacoordinated copper-sparteine complexes with chelating nitrite or nitrate ligand: Synthesis and catalytic aspects. *Inorganica Chim. Acta* 374, 415–421 (2011).
93. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B : Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry.* 6th ed.; Wiley: New York, 1986.
94. Lehnert, N. et al. Synthesis and spectroscopic characterization of copper(II)-nitrito complexes with hydrotris(pyrazolyl)borate and related coligands. *Inorg. Chem.* 46, 3916–3933 (2007).
95. Chuang, W. J. et al. Nitric oxide-release study of a bio-inspired copper(i)-

- nitrito complex under chemical and biological conditions. *Dalt. Trans.* 47, 13151–13157 (2018).
96. Saphier, M., Burg, A., Sheps, S. & Meyerstein, Complexes of copper(I) with aromatic compounds in aqueous solutions. *Dalton Trans.* 1845–1849 (1999).
97. Chen, Y., Lin, F. T. & Shepherd, R. E. ¹⁵N NMR and electrochemical studies of [RuII(hedta)]- complexes of NO, NO⁺, NO²⁻, and NCT. *Inorg. Chem.* 38, 973–983 (1999).
98. Stauffer, M. et al. Mechanism of O-Atom Transfer from Nitrite: Nitric Oxide Release at Copper(II). *Inorg. Chem.* (2021)
99. Monzani, E. et al. Binding of nitrite and its reductive activation to nitric oxide at biomimetic copper centers. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 251–261 (2000).
100. Fanning, J. C. The interaction of iron complexes with small nitrogen-containing molecules and ions. *Coord. Chem. Rev.* 110, 235–273 (1991).
101. Sandford, C. et al. A synthetic chemist's guide to electroanalytical tools for studying reaction mechanisms. *Chem. Sci.* 10, 6404–6422 (2019).
102. Bergquist, C., Fillebeen, T., Morlok, M. M. & Parkin, G. Protonation and reactivity towards carbon dioxide of the mononuclear tetrahedral zinc and cobalt hydroxide complexes, [TpBut,Me]ZnOH and [TpBut,Me]CoOH: Comparison of the reactivity of the metal hydroxide function in synthetic analogues of carbonic anhydr. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6189–6199 (2003).
103. Ibrahim, M. M., Ichikawa, K. & Shiro, M. Structural characterization of ([tren]Zn(HOMe))·ClO₄·BPh₄ (tren=tris(2-aminoethyl)amine) and CO₂ fixation into monomethyl carbonato zinc(II) complex. *Inorg. Chem. Commun.* 6, 1030–1034 (2003).
104. Bräuer, M., Pérez-Lustres, J. L., Weston, J. & Anders, E. Quantitative reactivity model for the hydration of carbon dioxide by biomimetic zinc complexes. *Inorg. Chem.* 41, 1454–1463 (2002).

105. Garmer, D. R. & Krauss, M. Metal Substitution and the Active Site of Carbonic Anhydrase. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 6487–6493 (1992).
106. Notni, J., Schenk, S., Görls, H., Breitzke, H. & Anders, E. Formation of a unique zinc carbamate by CO₂ fixation: Implications for the reactivity of tetra-azamacrocyclic ligated Zn(II) complexes. *Inorg. Chem.* 47, 1382–1390 (2008).
107. Slebocka-Tilk, H., Cocho, J. L., Frakman, Z. & Brown, R. S. Carbonic Anhydrase Models. 5. Tris(4,5-di-n-propyl-2-imidazolyl)phosphine-Zinc(II) and Bis(4,5-diisopropyl-2-imidazolyl)-2-imidazolylphosphine-Zinc(II). Catalysts Facilitating $\text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CO}_2$ Interconversion. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 2421–2431 (1984).
108. Koziol, L. et al. Toward a small molecule, biomimetic carbonic anhydrase model: Theoretical and experimental investigations of a panel of zinc(II) aza-macrocyclic catalysts. *Inorg. Chem.* 51, 6803–6812 (2012).

Apêndices

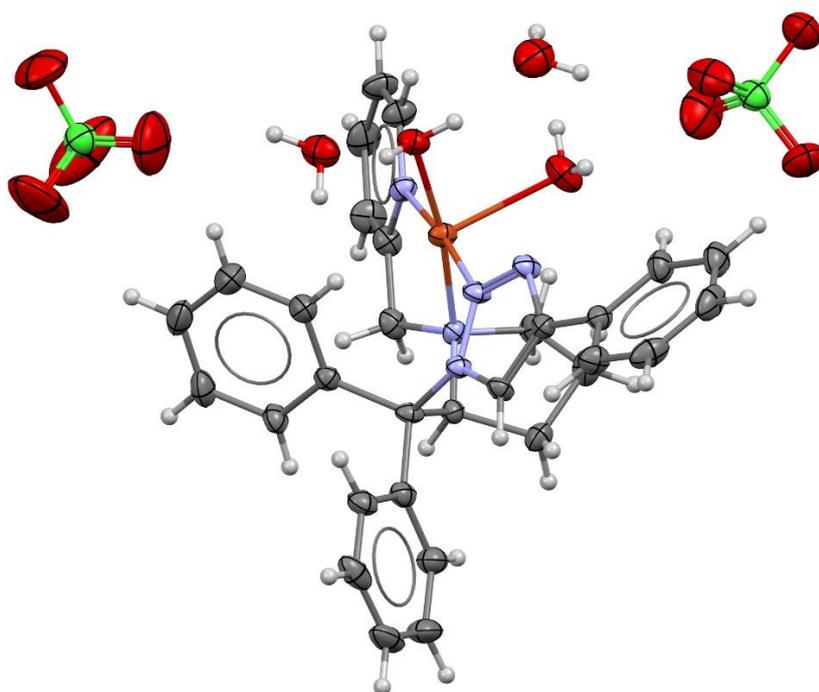


Fig. Apêndice 1- DRX do complexo CuPTPh.

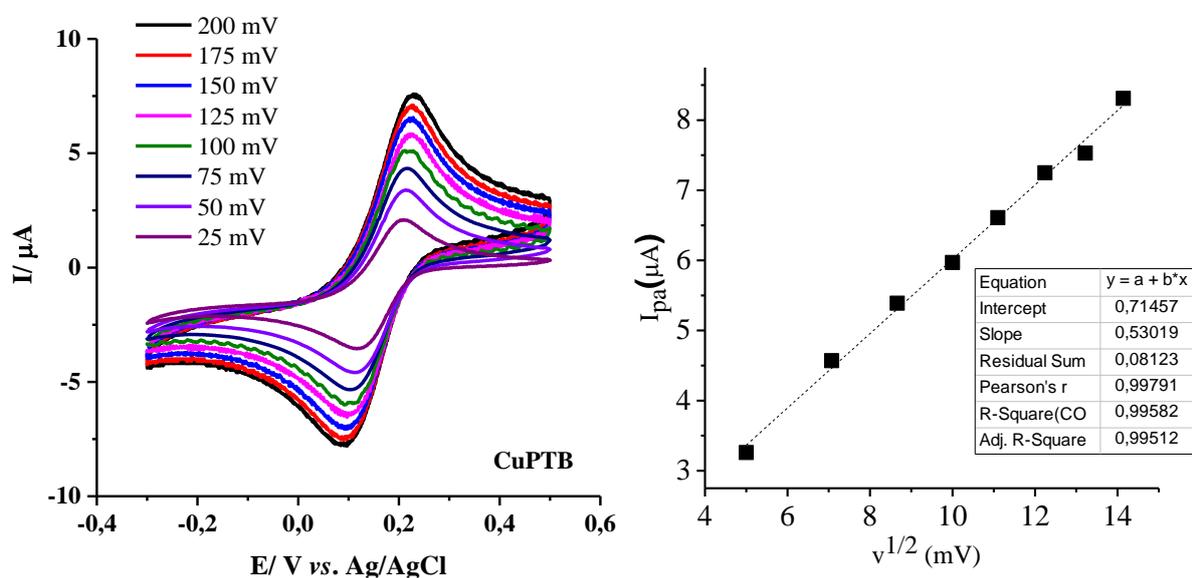


Fig. Apêndice 2- Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades para o eletrodo de carbono vítreo na presença do íon complexo CuPTB (esquerda) e gráfico de i_p versus $v^{1/2}$ (direita).

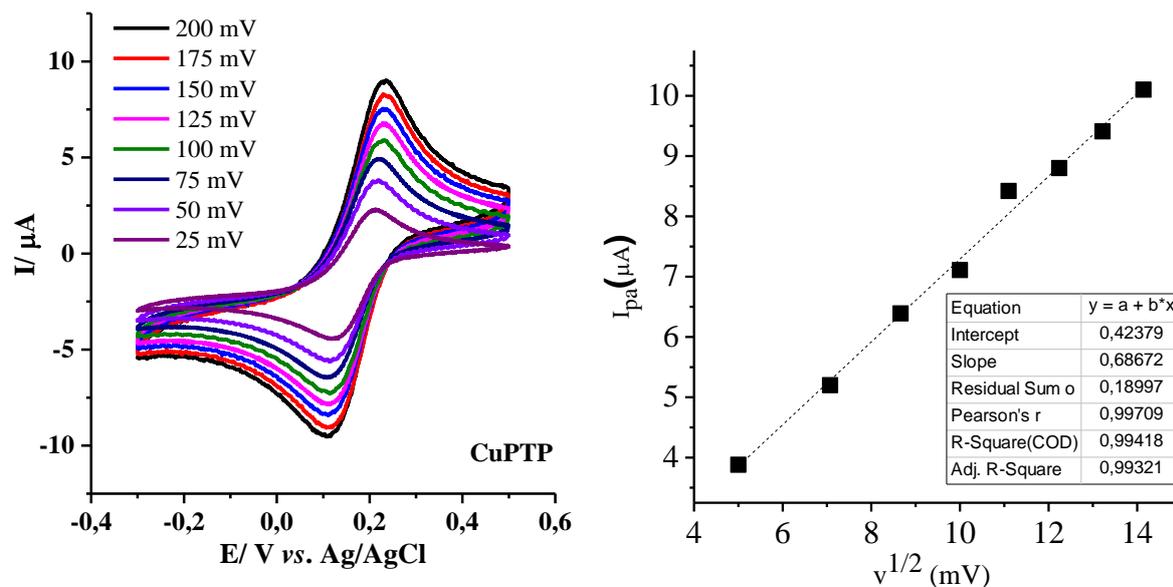


Fig. Apêndice 3- Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades para o eletrodo de carbono vítreo na presença do íon complexo CuPTP (esquerda) e gráfico de i_p versus $v^{1/2}$ (direita).

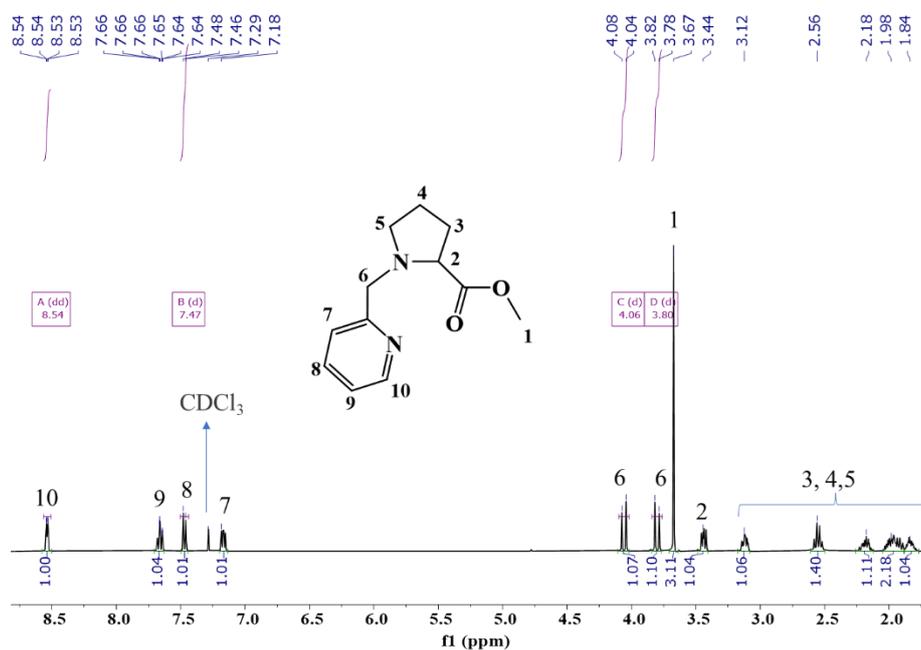


Fig. Apêndice 4- Espectro de RMN ^1H do composto (2). (CDCl_3).

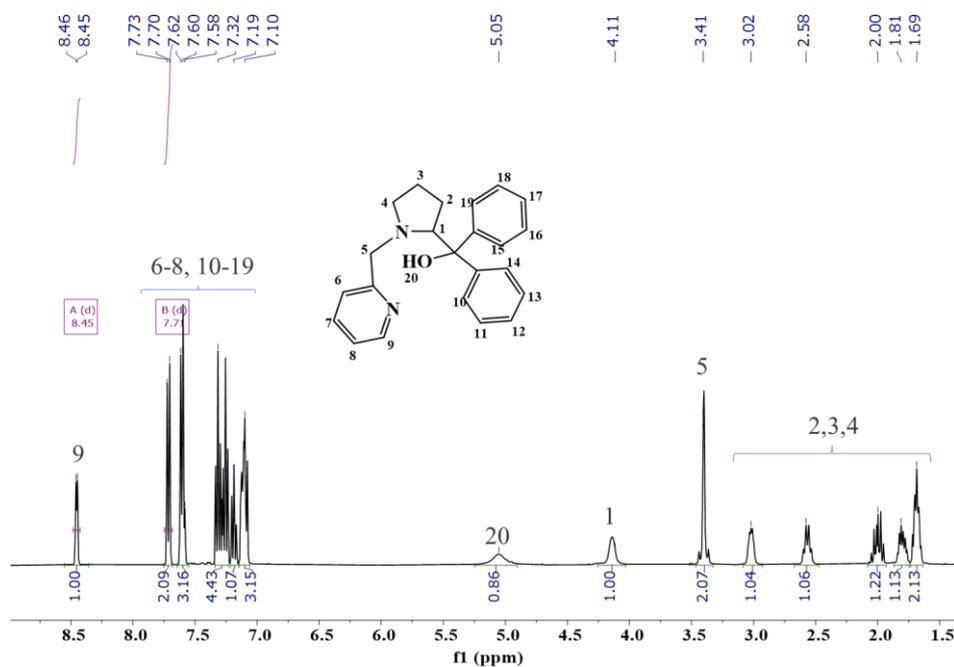


Fig. Apêndice 5- Espectro de RMN ¹H do composto (3) (CDCl₃).

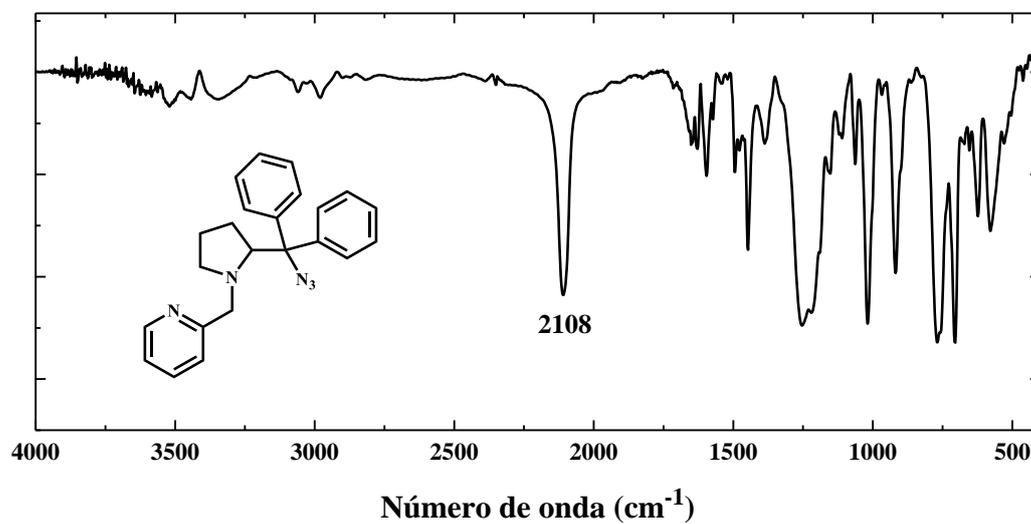


Fig. Apêndice 6- Espectro de infravermelho do composto (4) em pastilha de KBr.

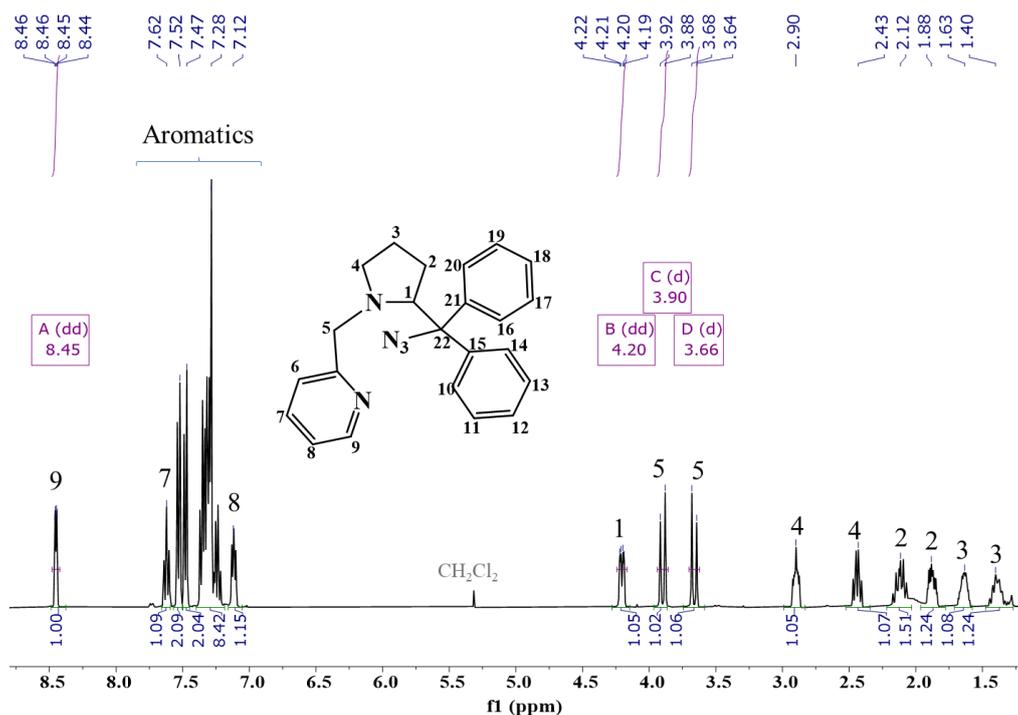


Fig. Apêndice 7- Espectro de RMN ¹H do composto (4). (CDCl₃).

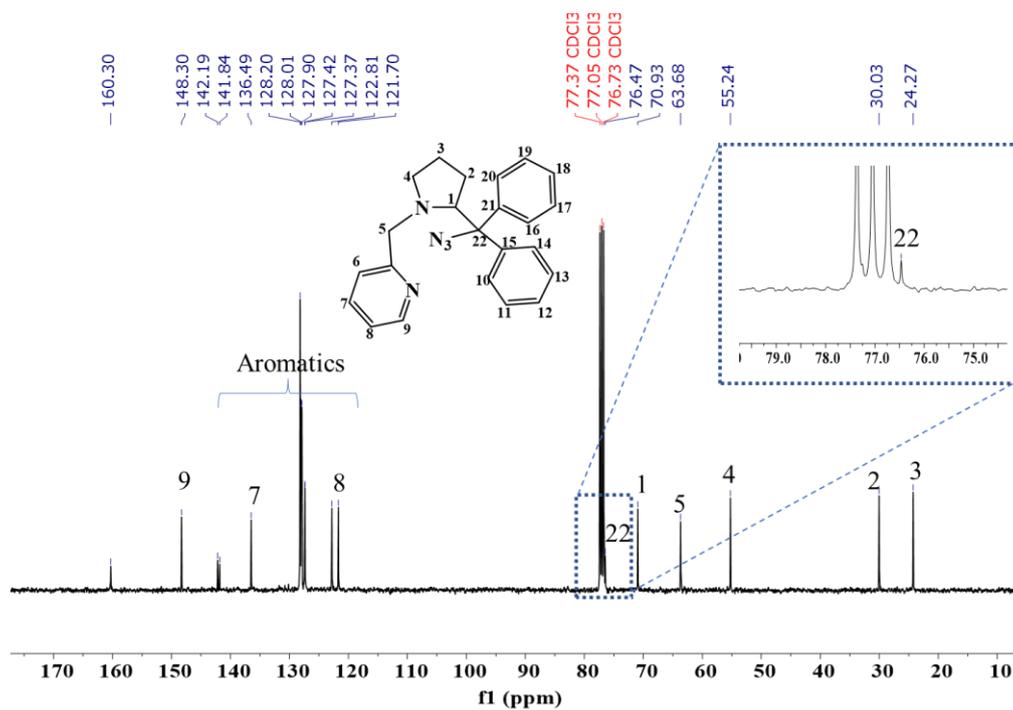


Fig. Apêndice 8- Espectro de RMN ¹³C do composto (4). (CDCl₃).

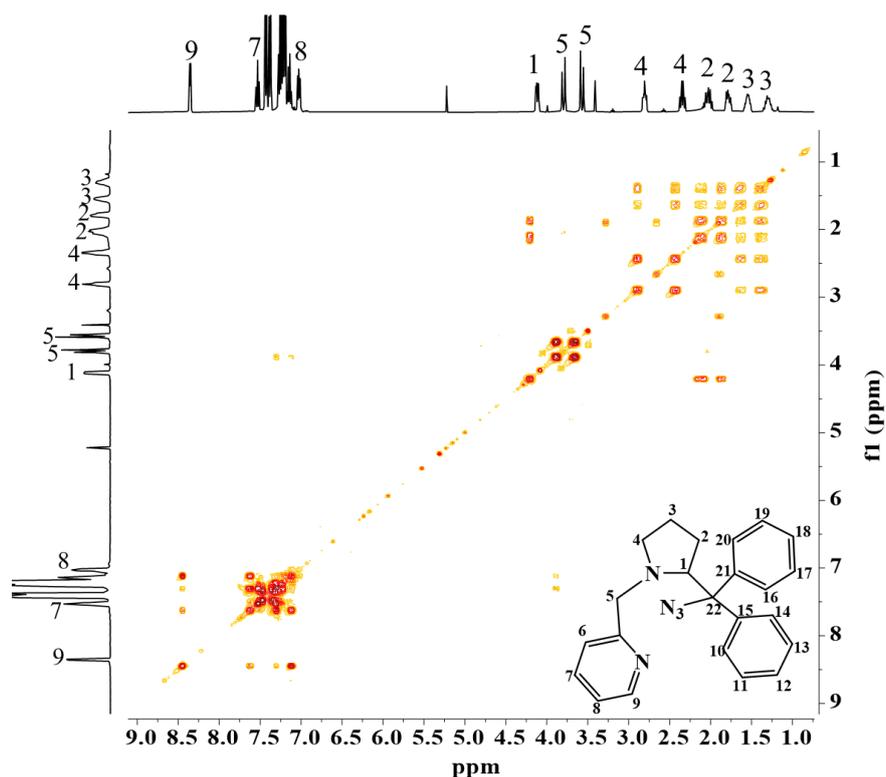


Fig. Apêndice 9- Espectro COSY do composto (4). (CDCl_3).

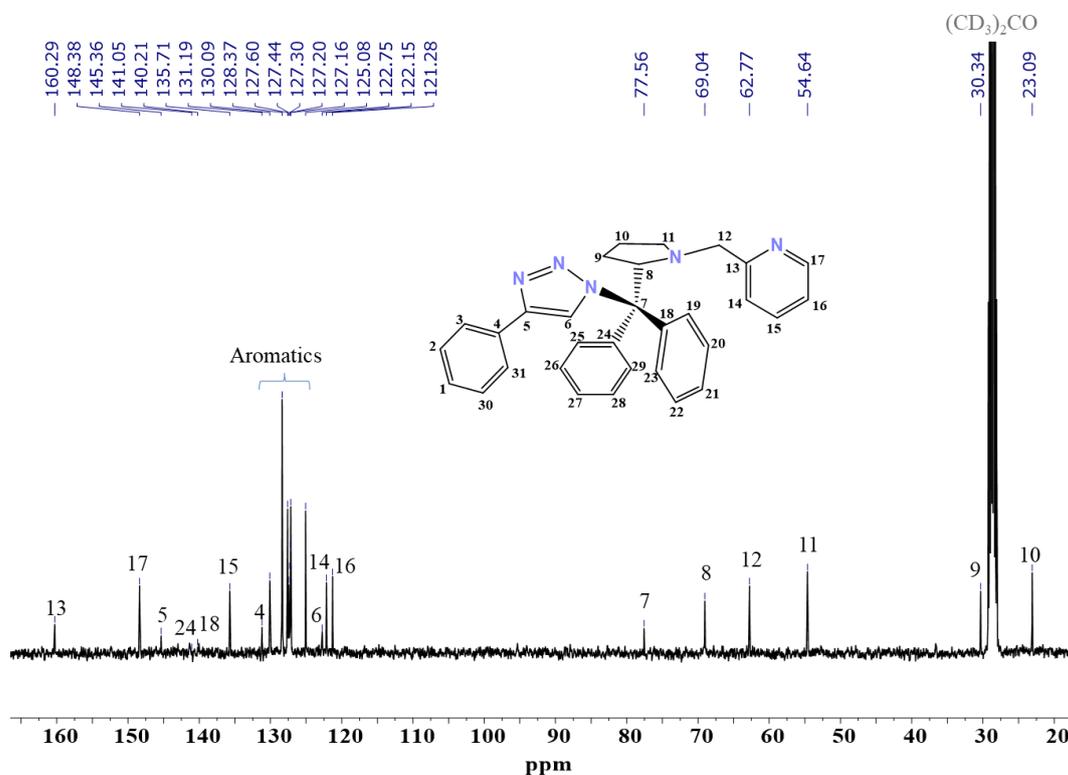


Fig. Apêndice 10- Espectro de RMN ^{13}C do ligante PTPh. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

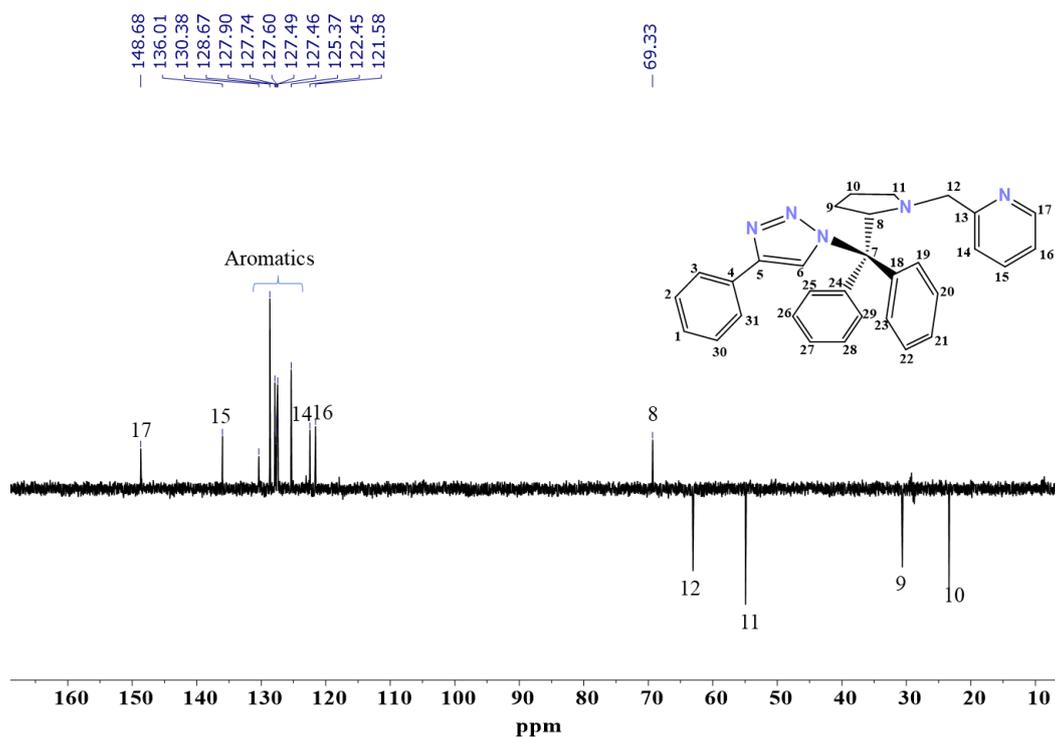


Fig. Apêndice 11- Espectro DEPT 135 do ligante PTPh. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

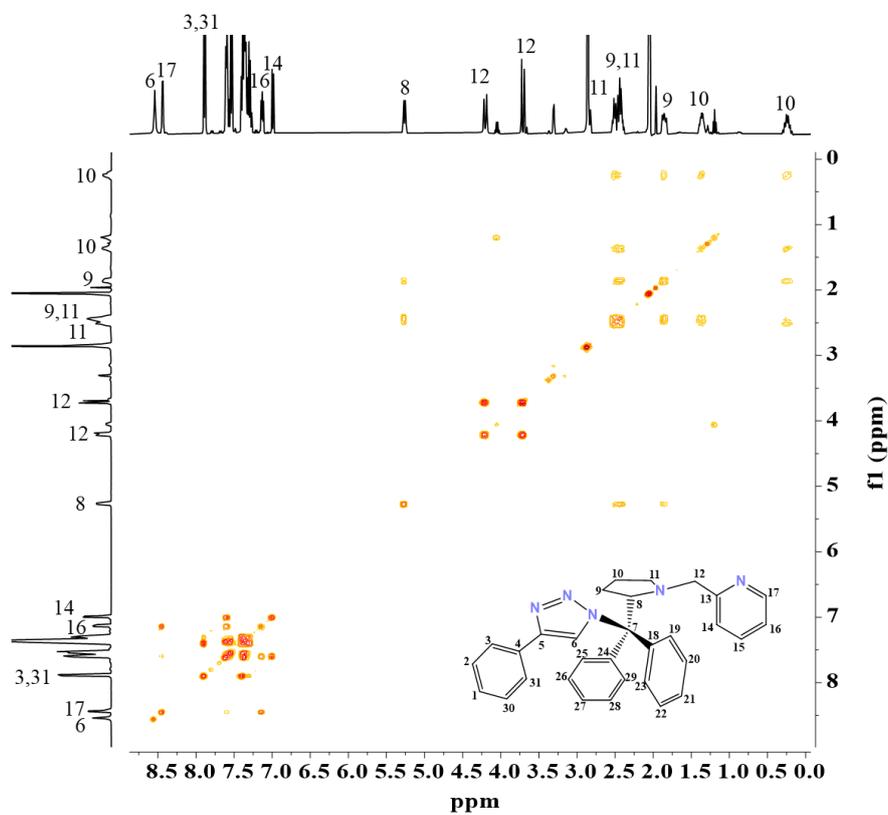


Fig. Apêndice 12- Espectro COSY do ligante PTPh. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

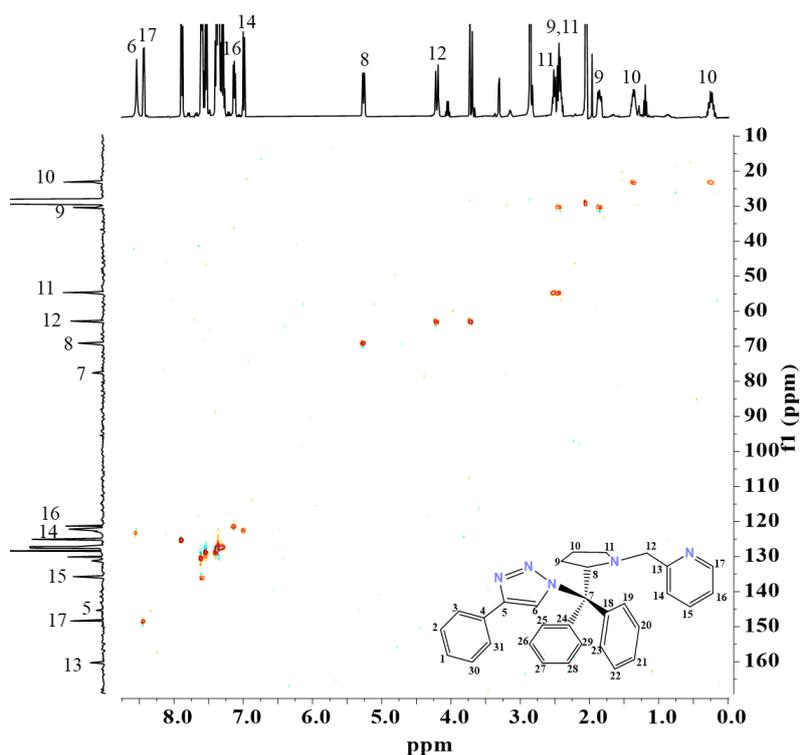


Fig. Apêndice 13- Espectro HSQC do ligante PTPh. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

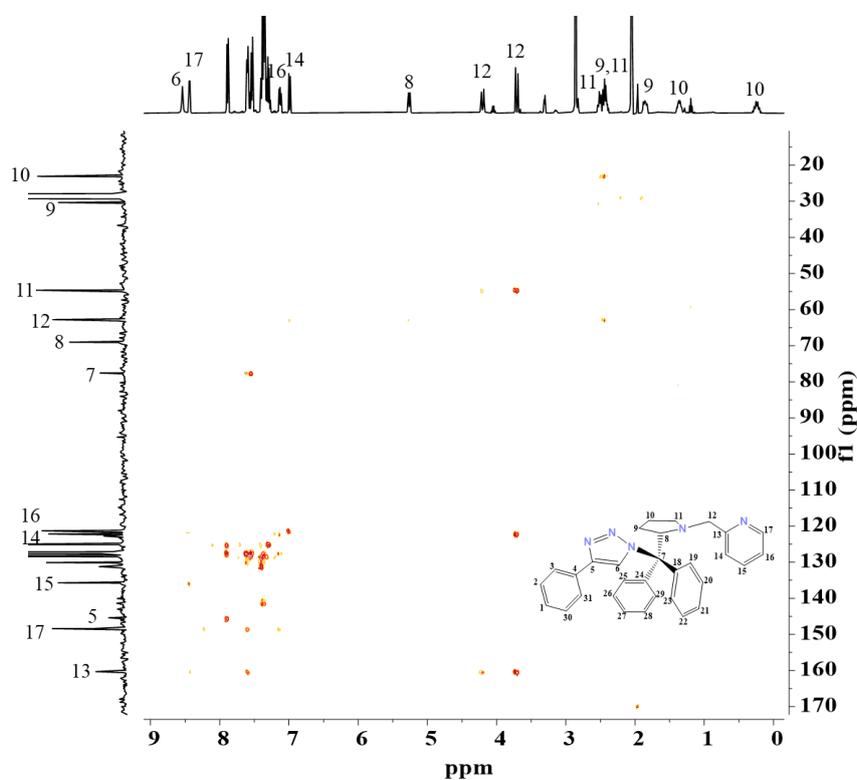


Fig. Apêndice 14- Espectro HMBC do ligante PTPh. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

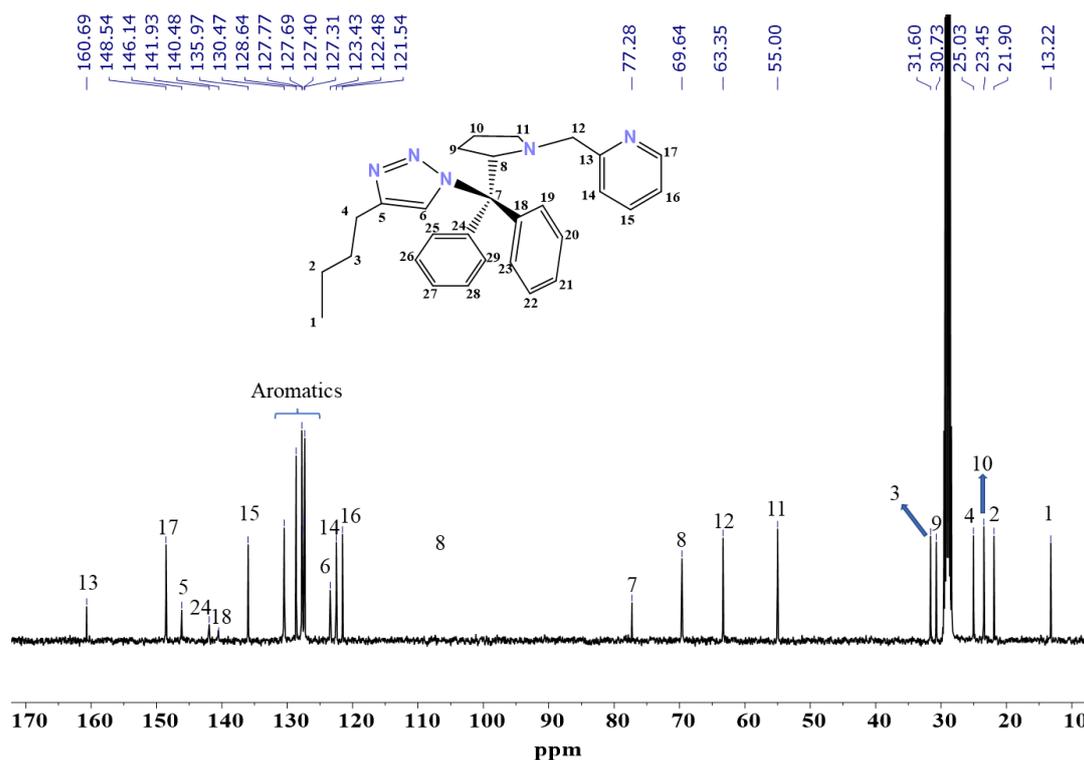


Fig. Apêndice 15- Espectro de RMN ^{13}C do ligante PTB. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

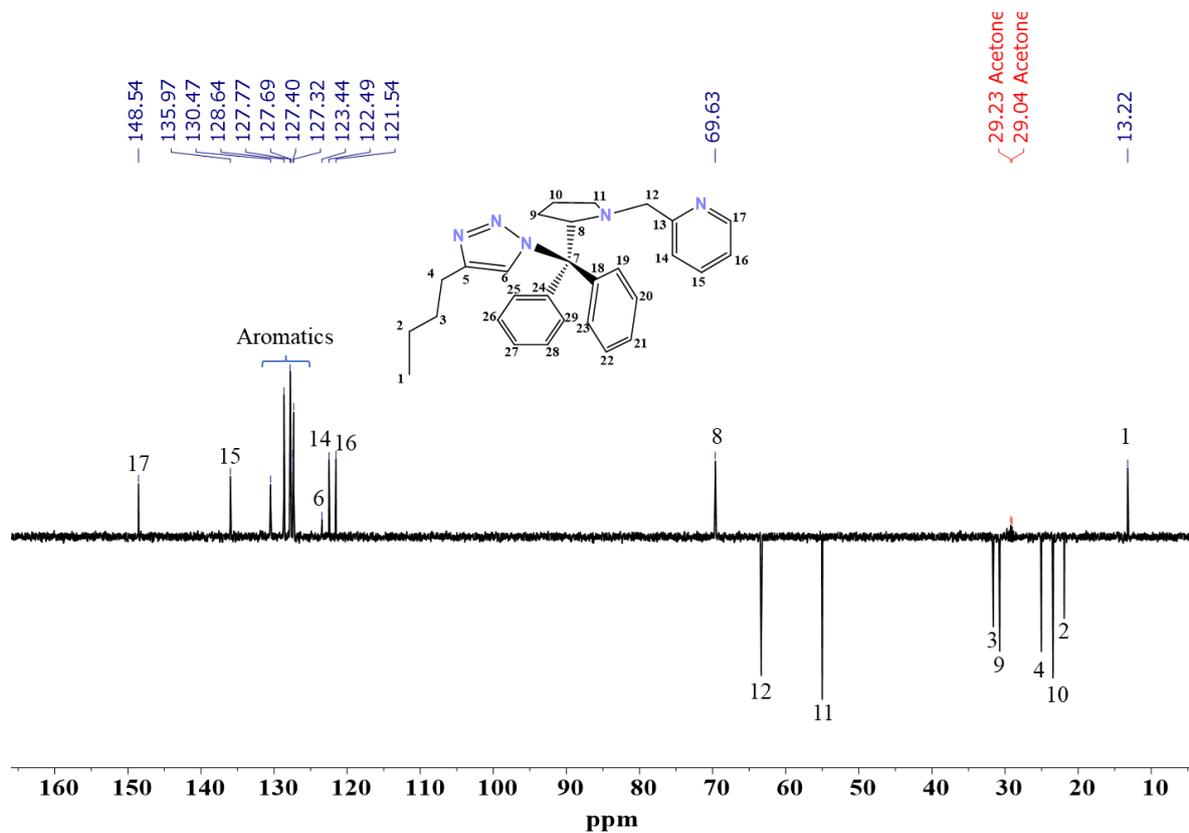


Fig. Apêndice 16- Espectro DEPT 135 do ligante PTB. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

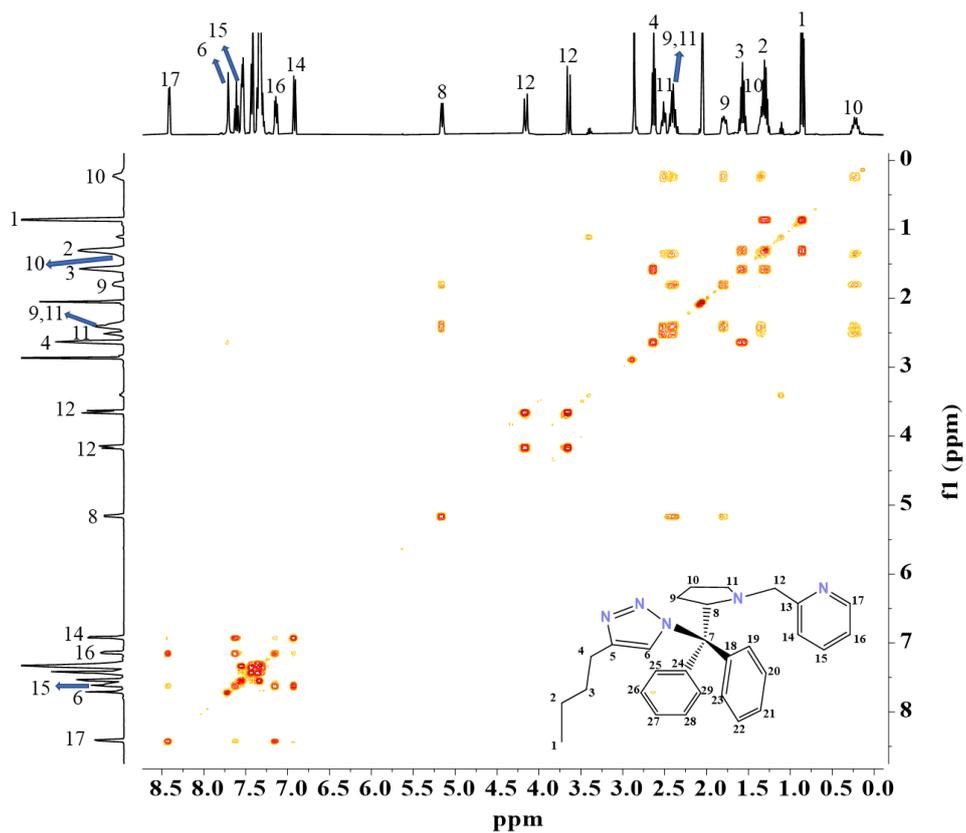


Fig. Apêndice 17- Espectro COSY do ligante PTB. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

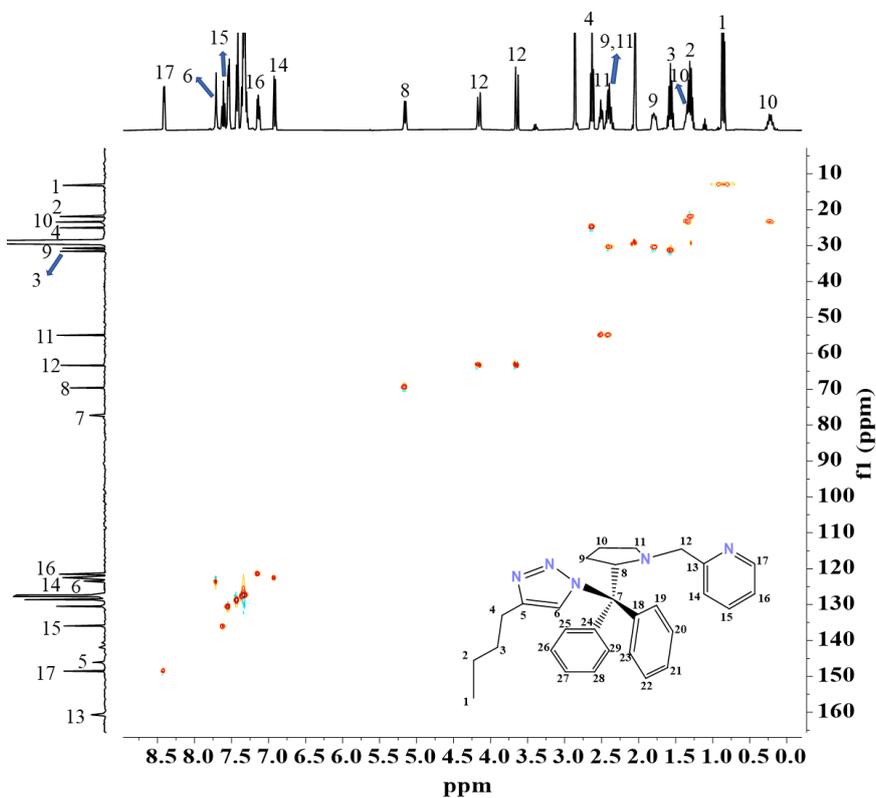


Fig. Apêndice 18- Espectro HSQC do ligante PTB. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

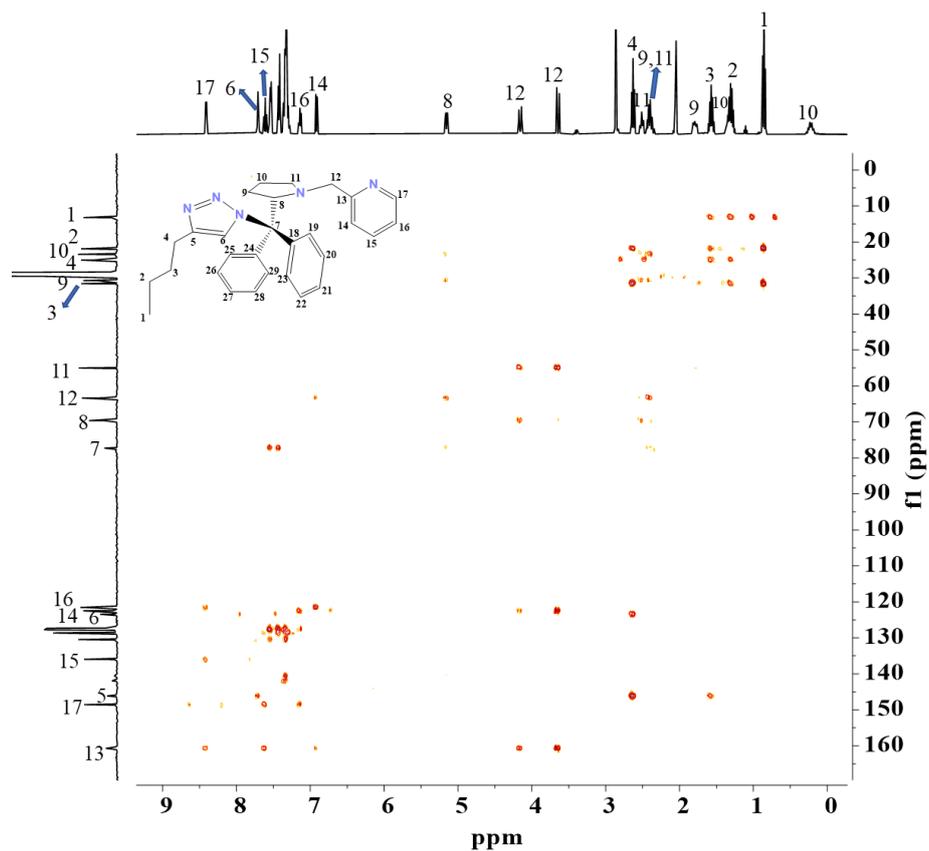


Fig. Apêndice 19- Espectro HMBC do ligante PTB. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

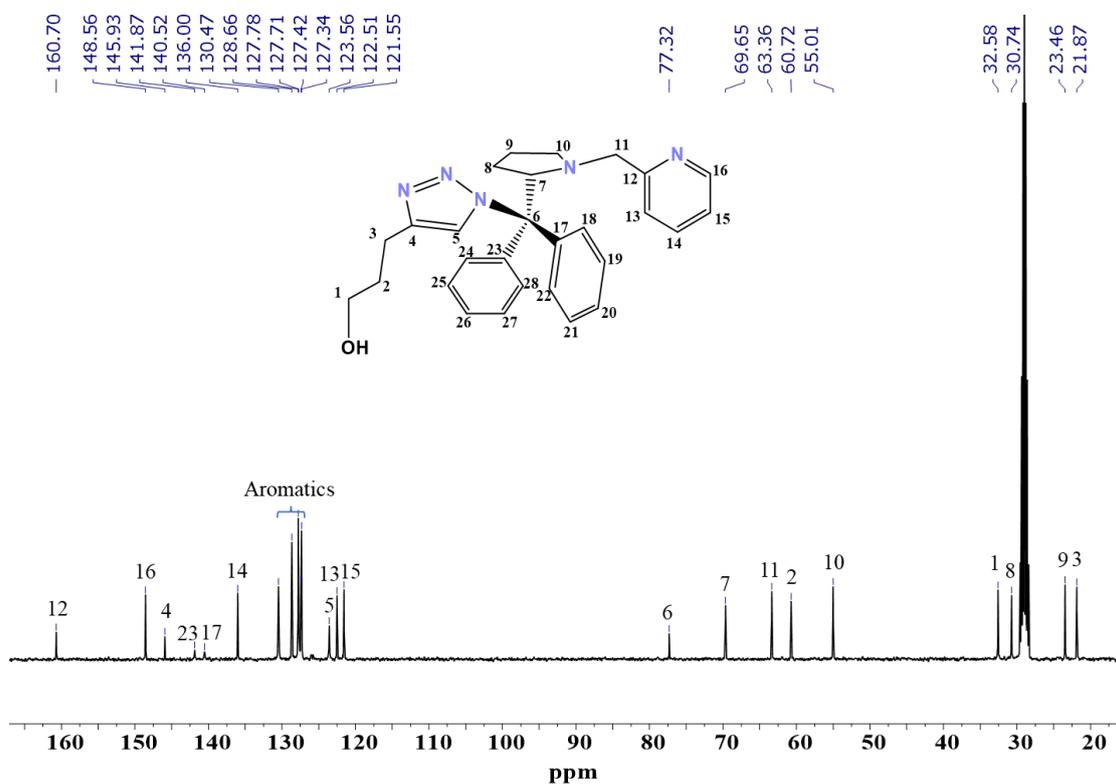


Fig. Apêndice 20- Espectro de RMN ^{13}C do ligante PTP. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

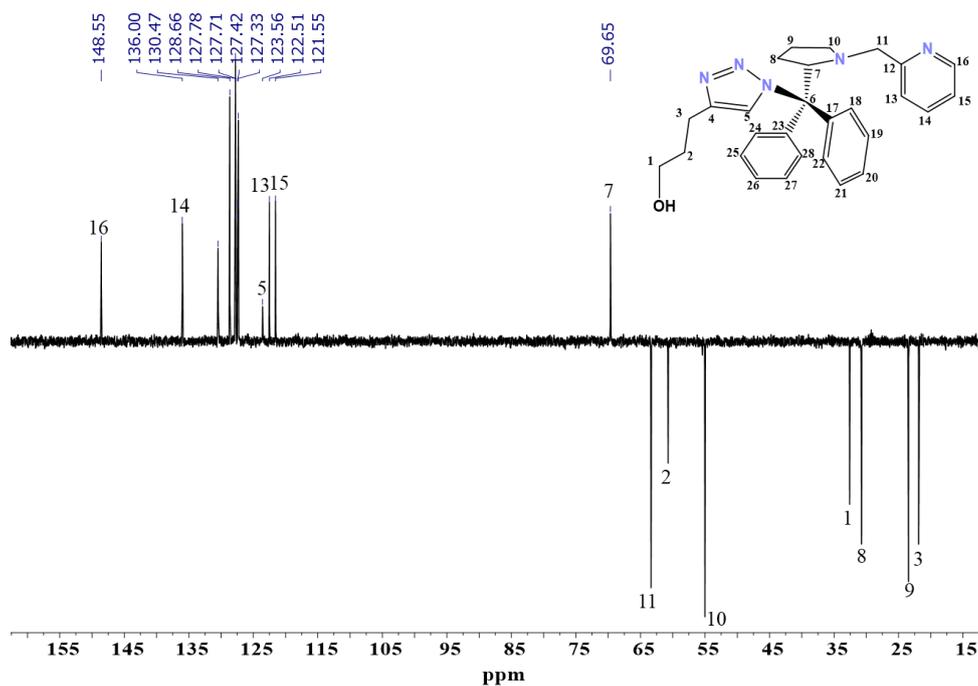


Fig. Apêndice 21- Espectro DEPT 135 do ligante PTP. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

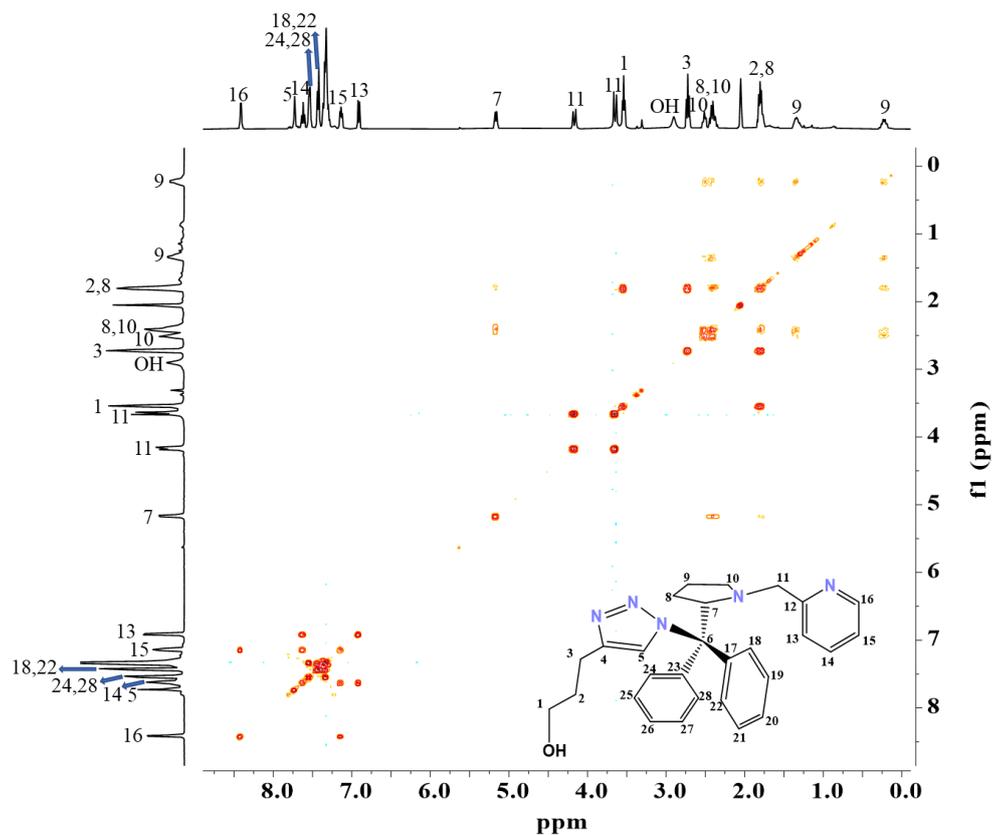


Fig. Apêndice 22- Espectro COSY do ligante PTP. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

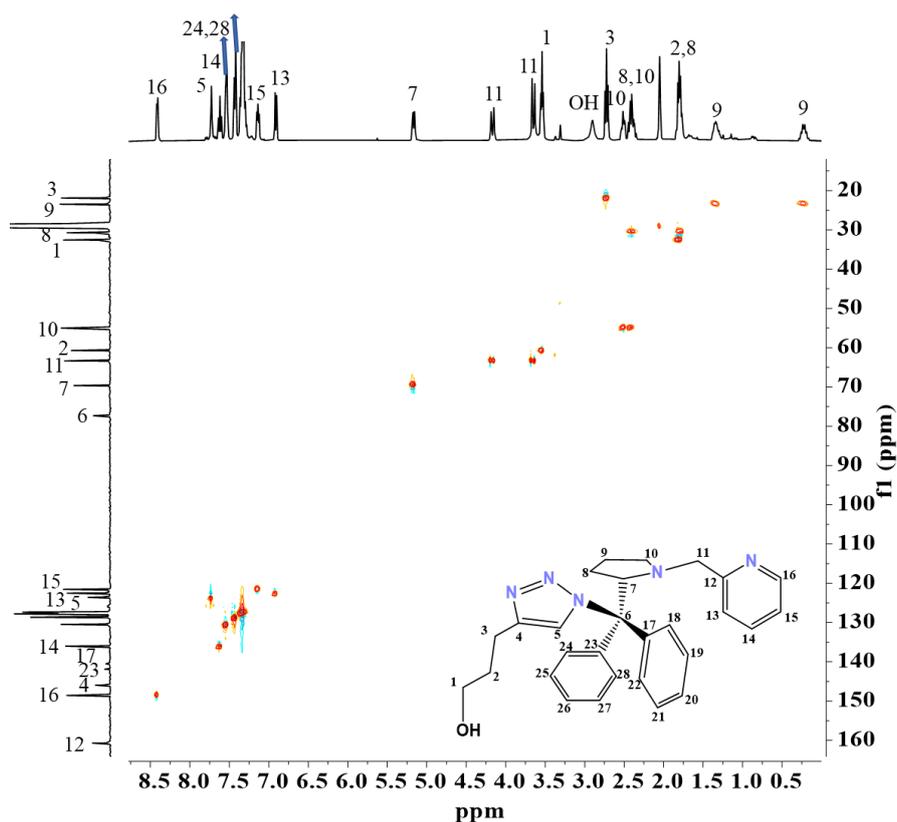


Fig. Apêndice 23- Espectro HSQC do ligante PTP. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

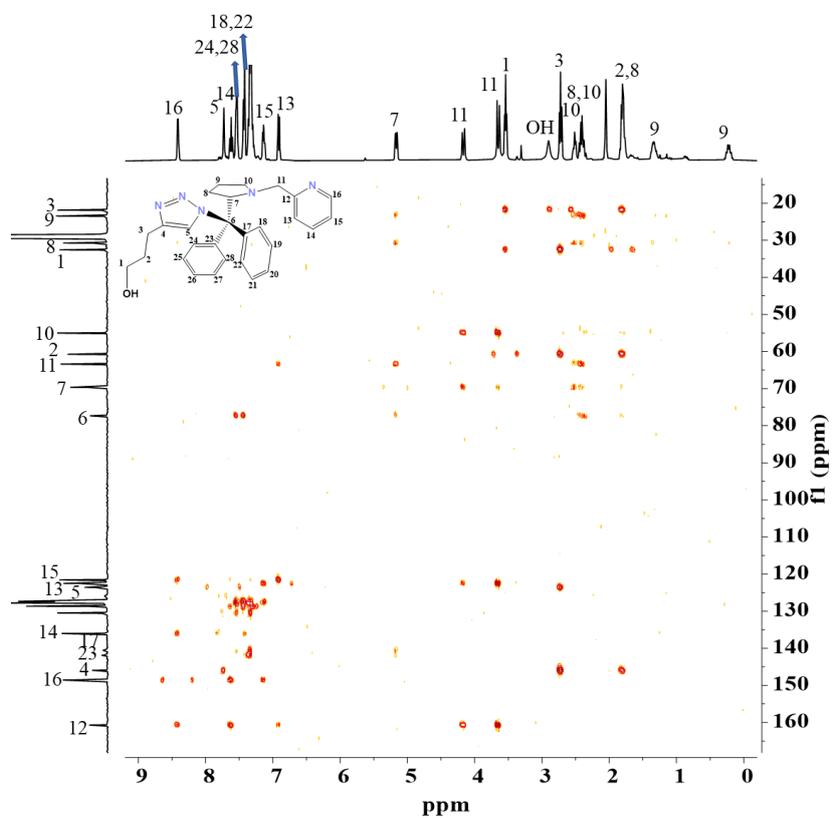


Fig. Apêndice 24- Espectro HMBC do ligante PTP. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

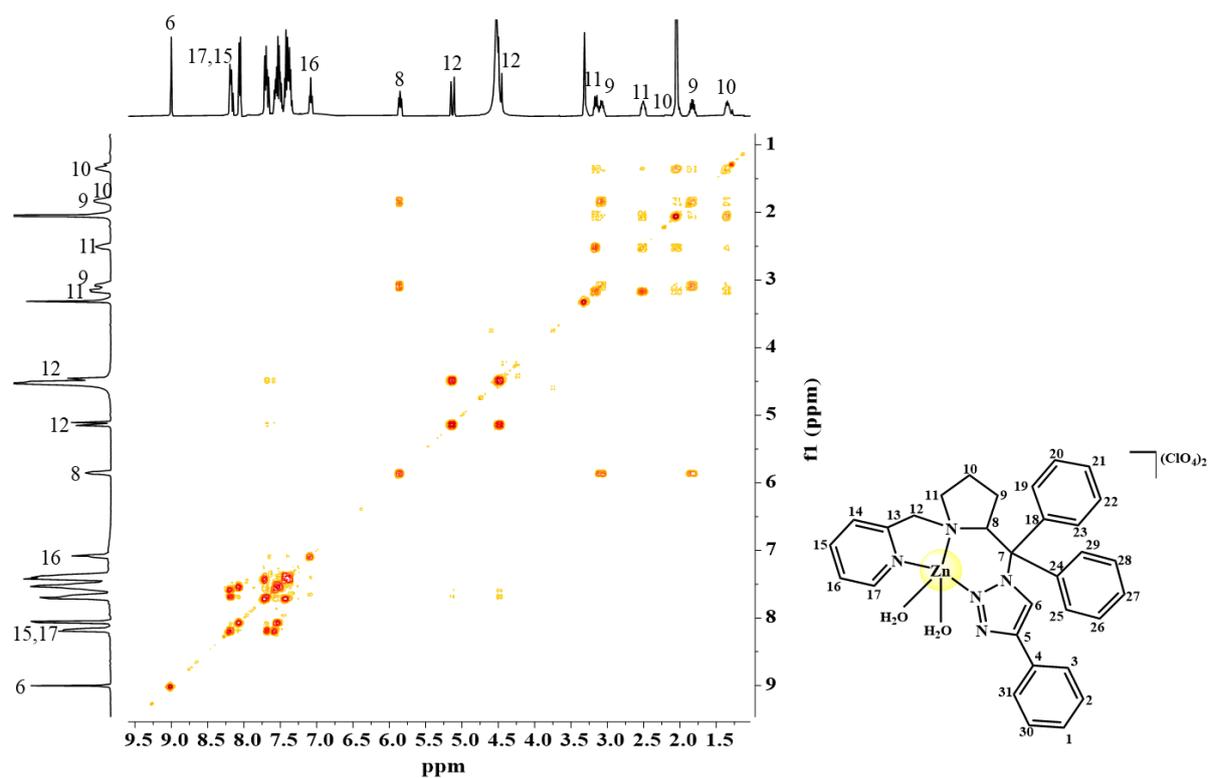


Fig. Apêndice 25- Espectro COSY do complexo ZnPTPh. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

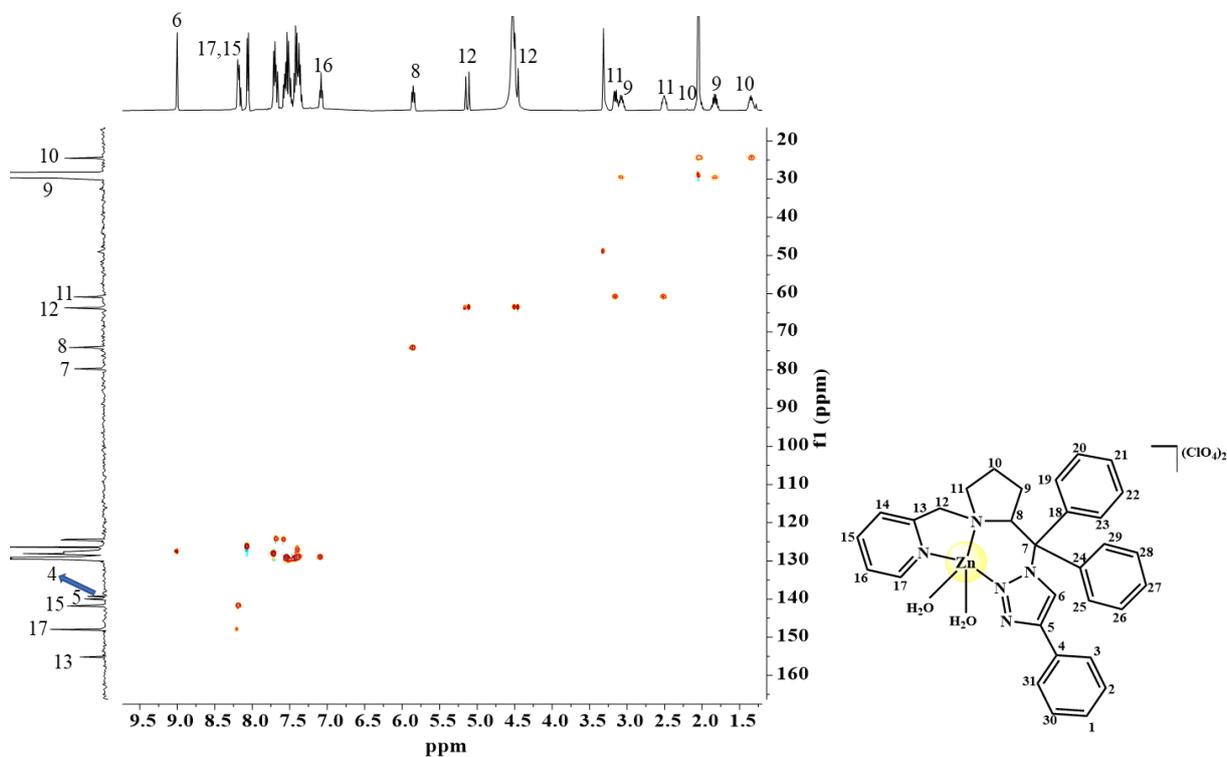


Fig. Apêndice 26- Espectro HSQC do complexo ZnPTPh. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

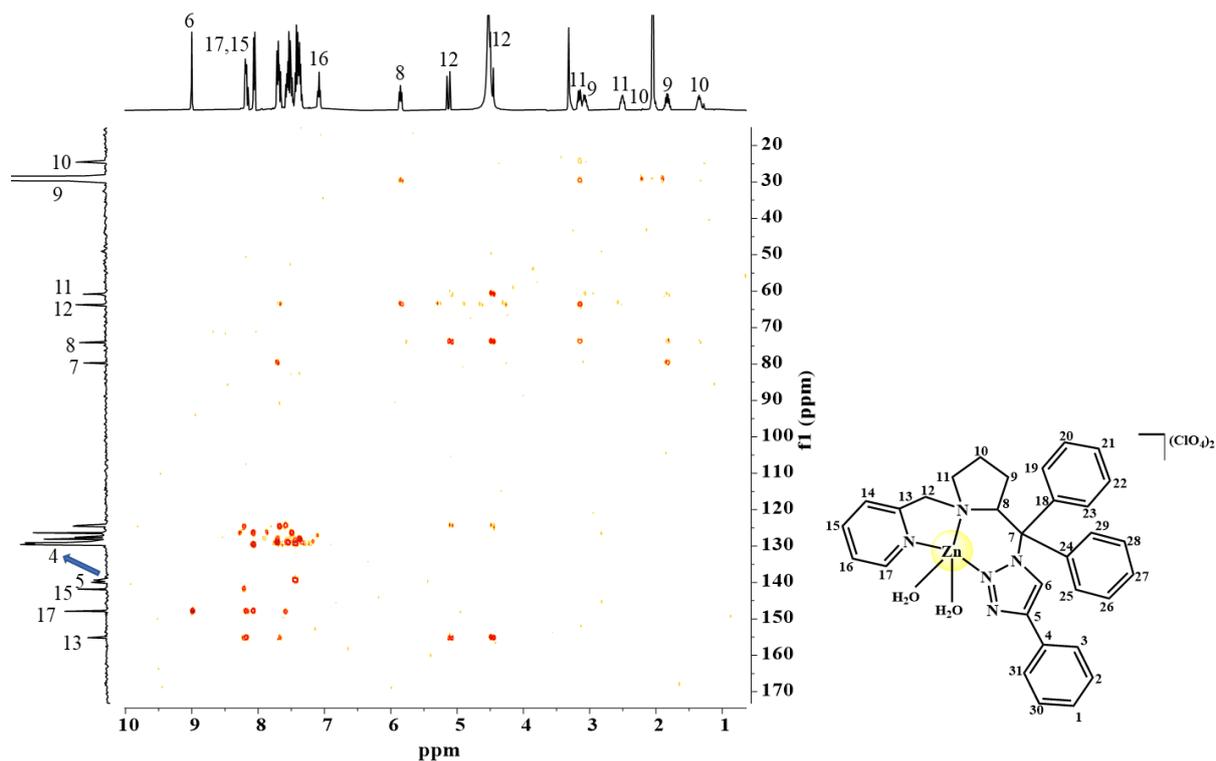


Fig. Apêndice 27- Espectro HMBC do complexo ZnPTPh. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

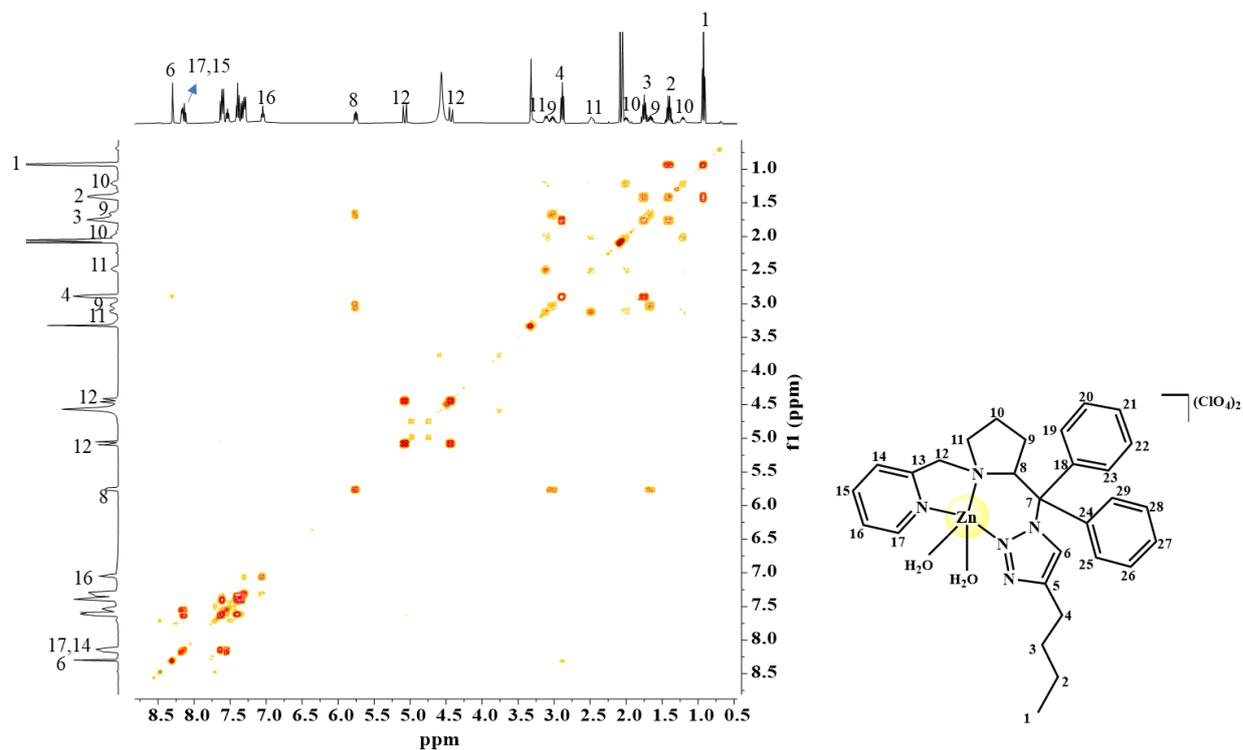


Fig. Apêndice 28- Espectro COSY do complexo ZnPTB. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

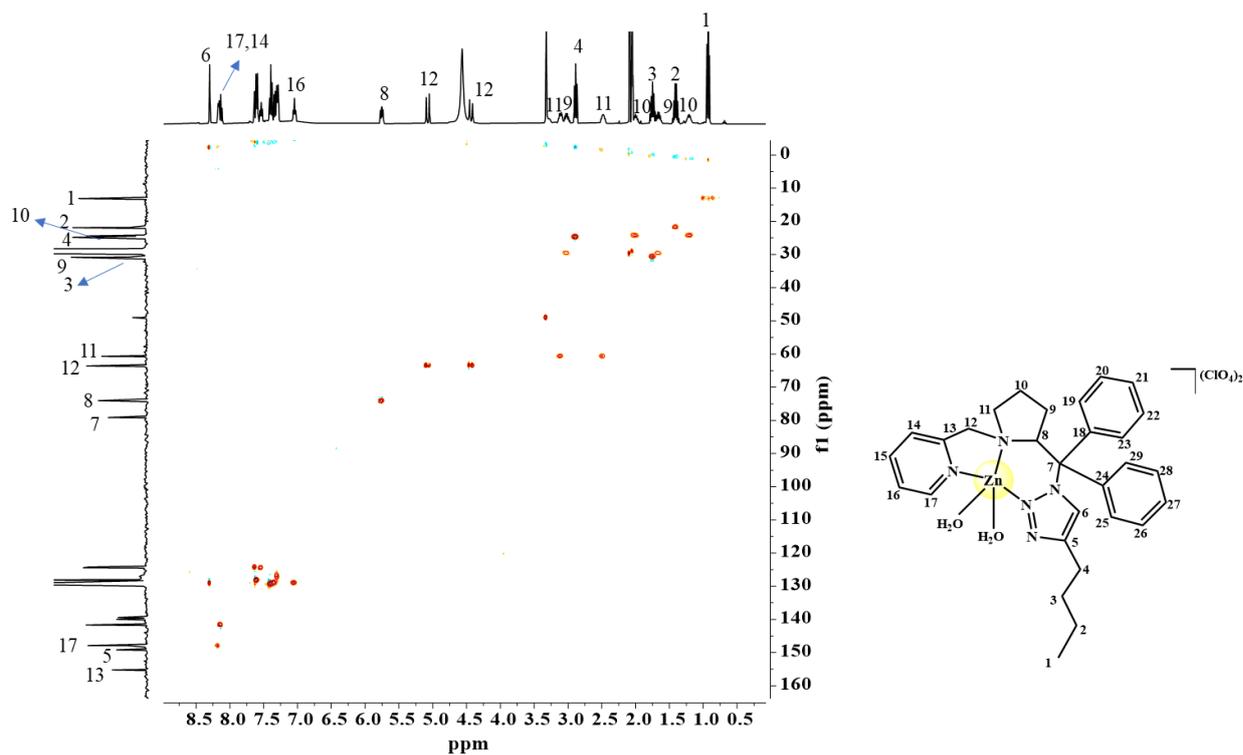


Fig. Apêndice 29- Espectro HSQC do complexo ZnPTB. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

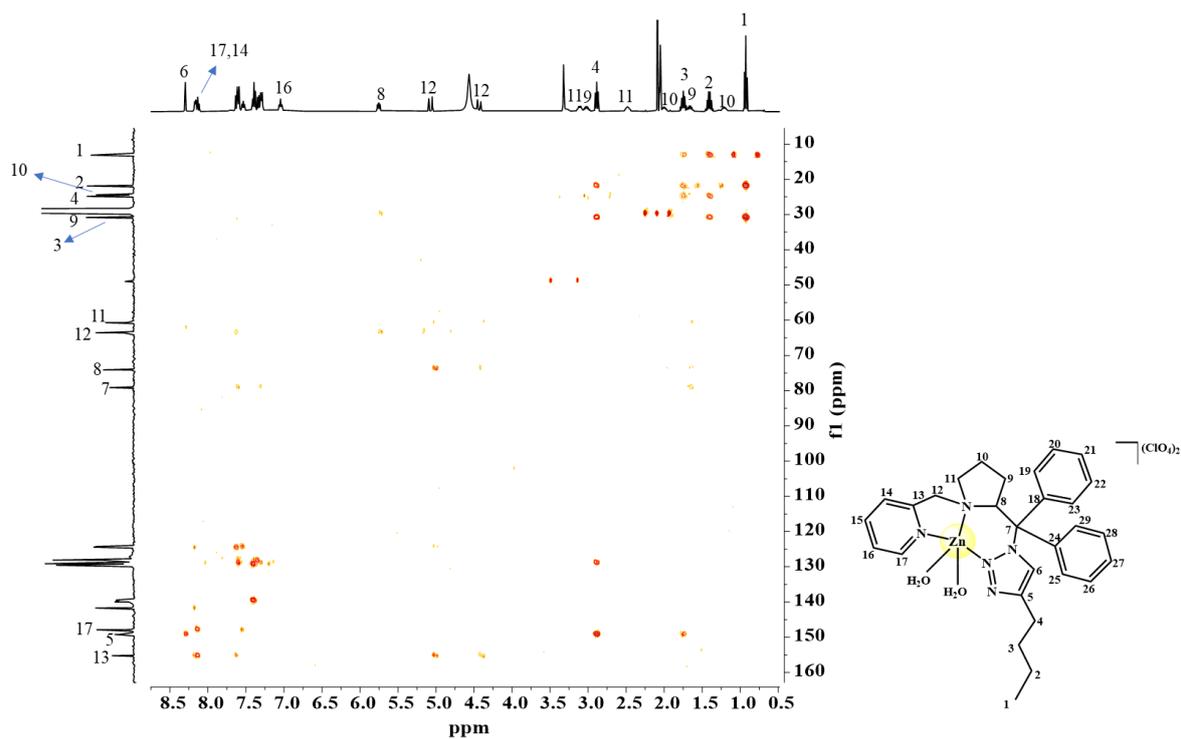


Fig. Apêndice 28- Espectro HMBC do complexo ZnPTB. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

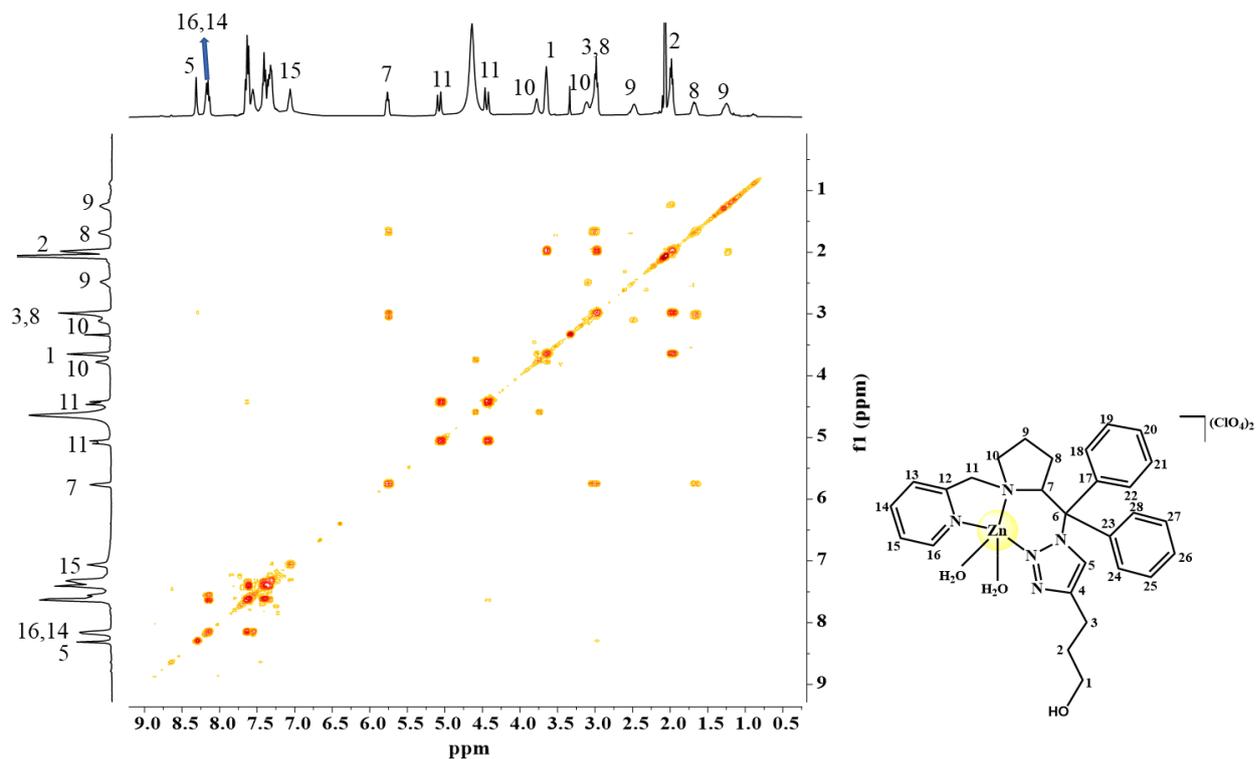


Fig. Apêndice 29- Espectro COSY do complexo ZnPTP. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

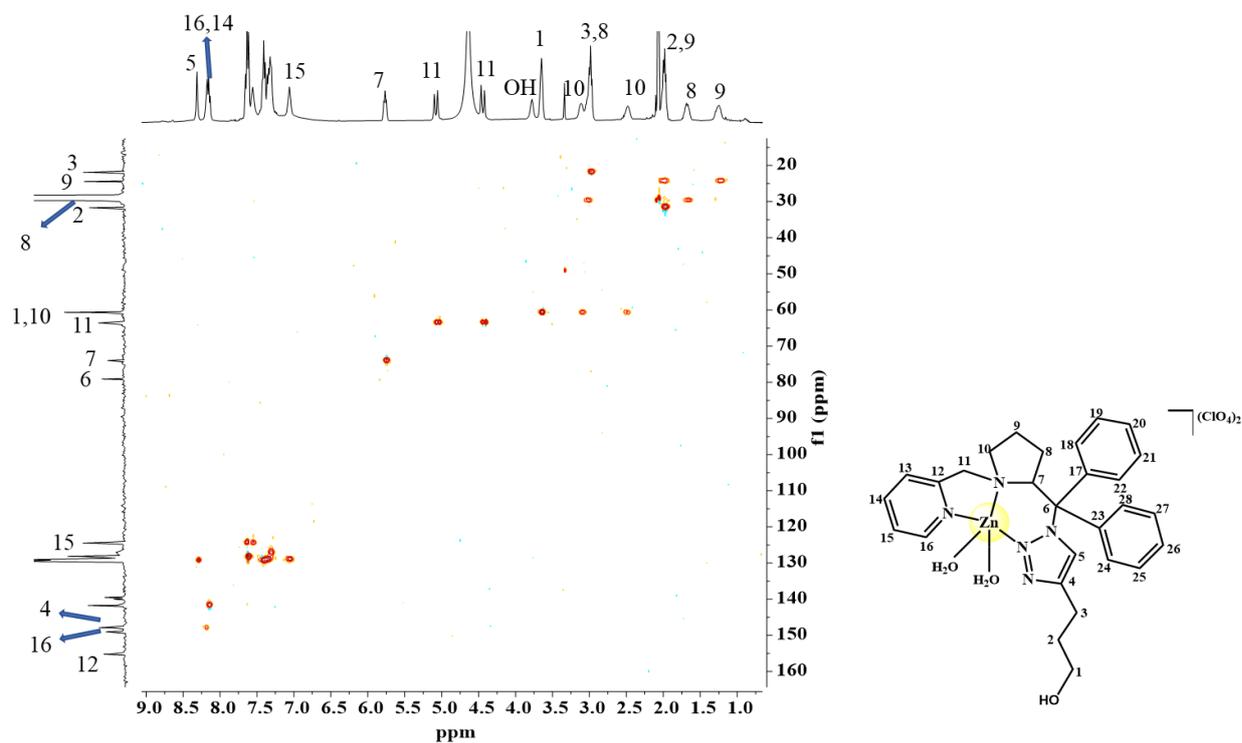


Fig. Apêndice 30- Espectro HSQC do complexo ZnPTP. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

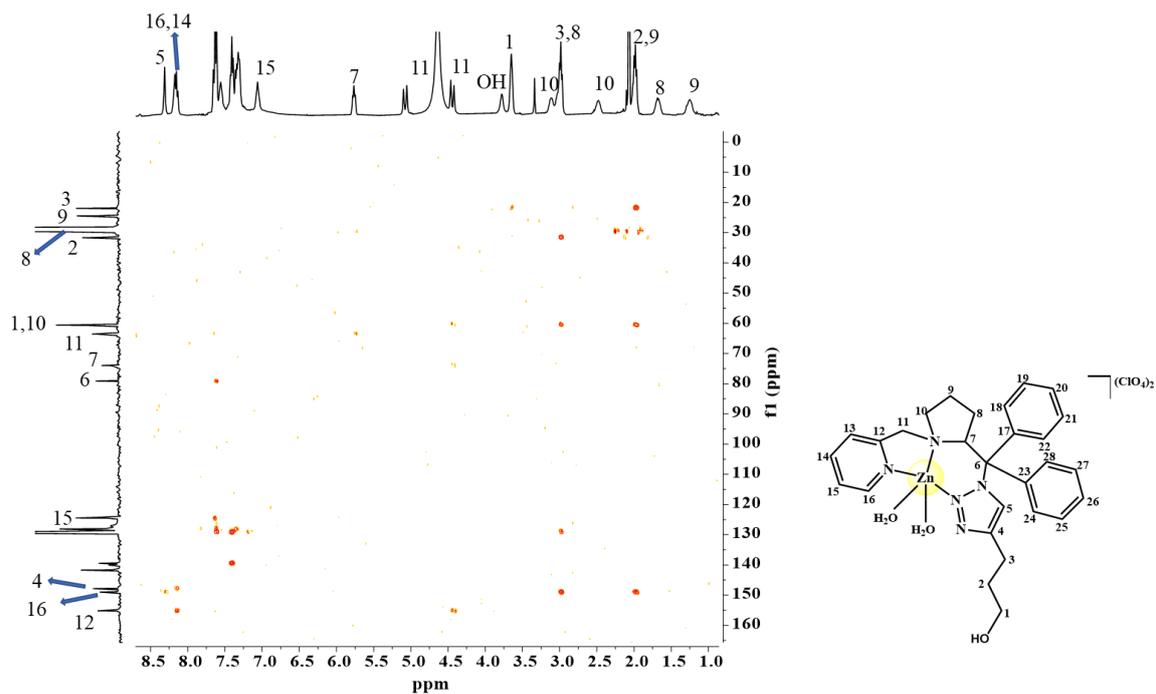
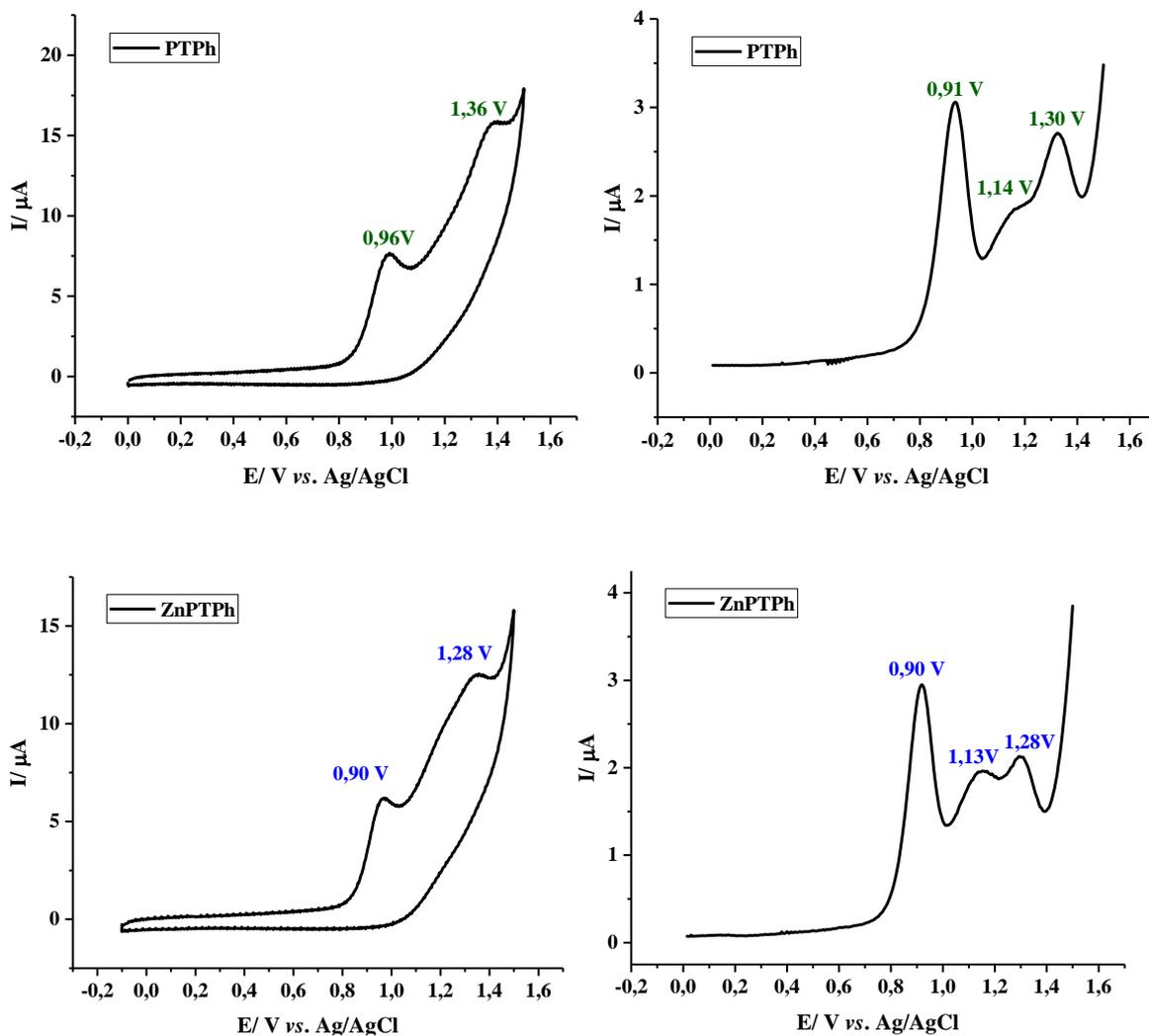
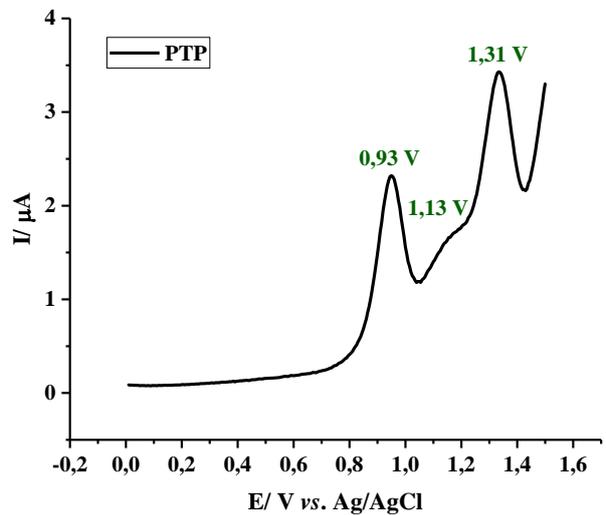
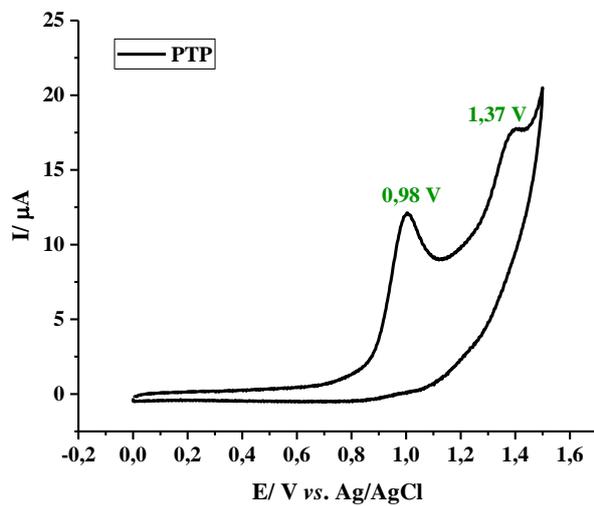
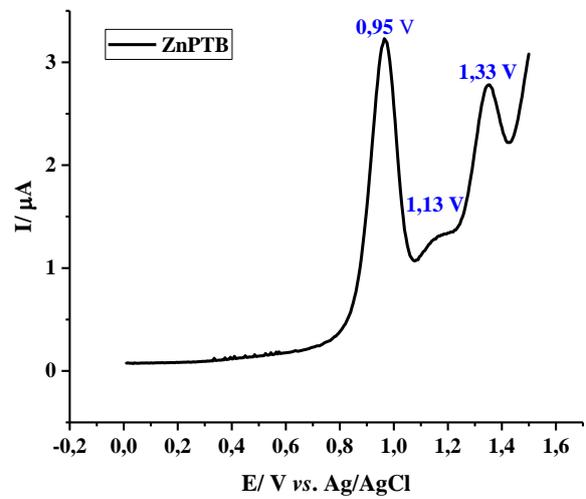
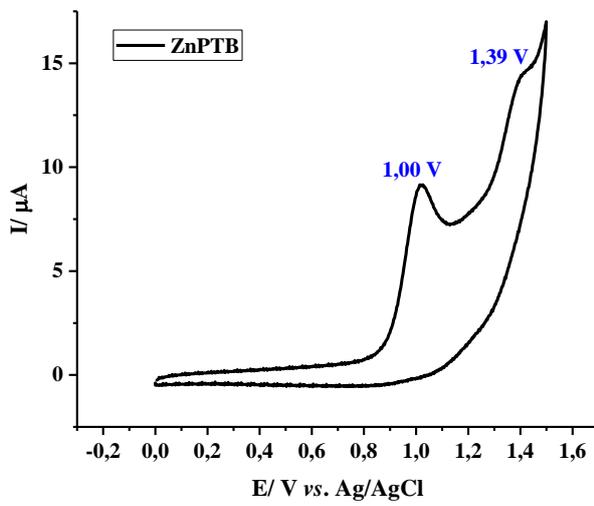
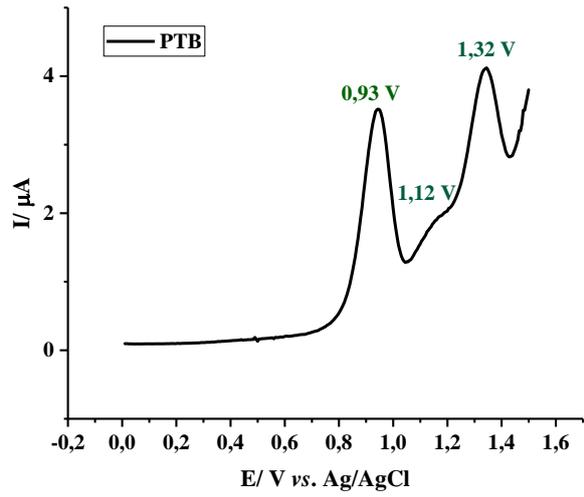
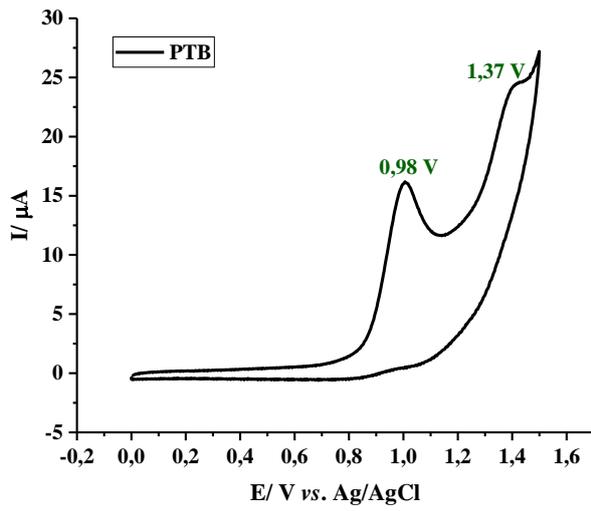


Fig. Apêndice 31- Espectro HMBC do complexo ZnPTP. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.





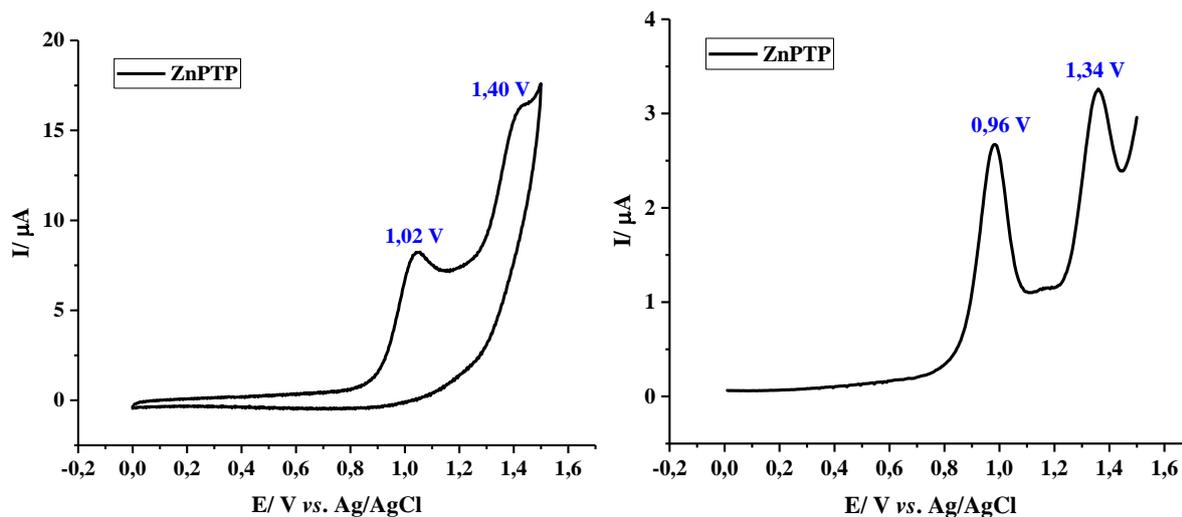


Fig. Apêndice 32- Voltamogramas cíclicos (esquerda) e pulso diferencial (direita) dos ligantes e complexos de zinco em metanol contendo PTBA 0,1 M.

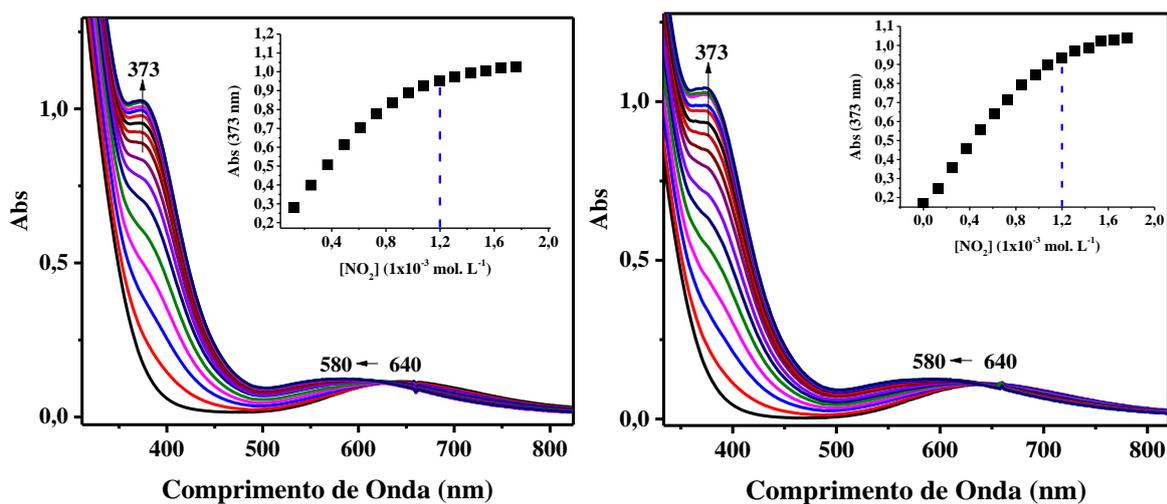


Fig. Apêndice 33- Mudanças espectrais durante a titulação do complexo CuPTB (esquerda) e CuPTP (direita) 1,2 mM ($\mu=0,1$ mol.L⁻¹ PTBA) com nitrito em metanol e os respectivos gráficos da concentração do nitrito vs absorbância em 373nm.

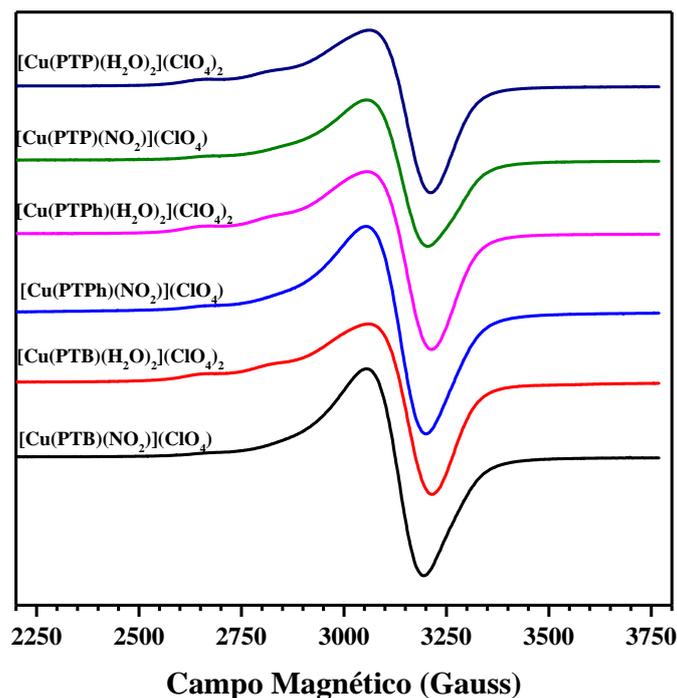


Fig. Apêndice 34- Espectro de EPR dos complexos no estado sólido na ausência e na presença do nitrito.

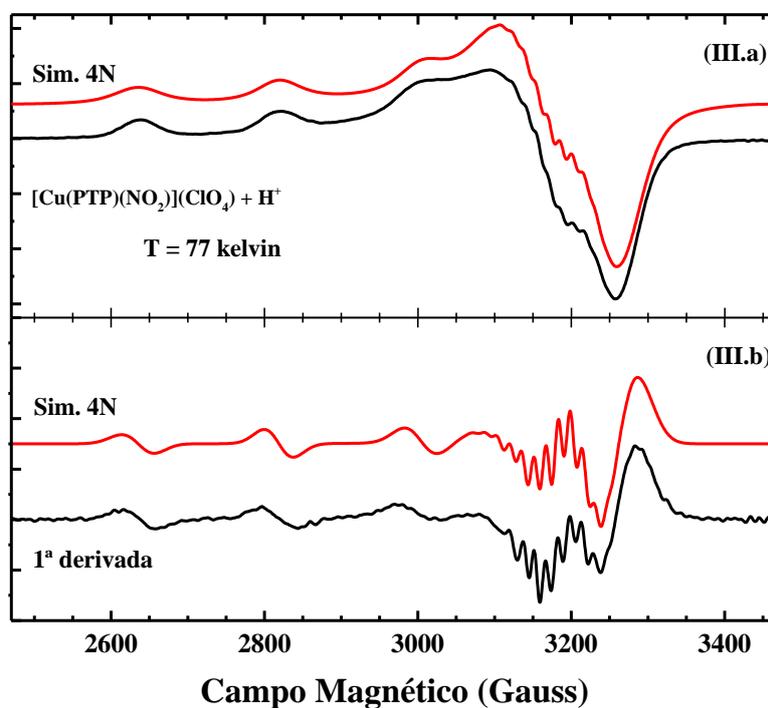


Fig. Apêndice 35- Espectro EPR e primeira derivada do complexo $[\text{Cu}(\text{PTP})(\text{NO}_2)]^{2+}$ + ácido benzoico (preto) em metanol, medidos em temperatura de nitrogênio líquido (77 K). As linhas vermelhas são simulações usando 4 nitrogênios ligados ao íon Cu^{2+} .

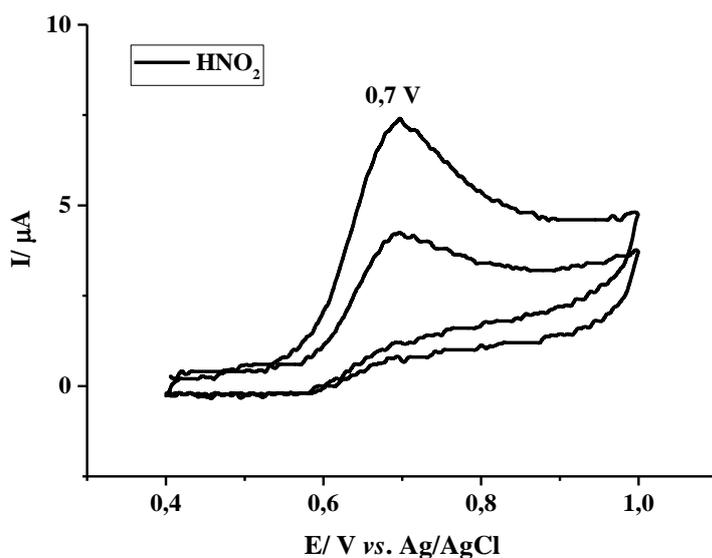


Fig. Apêndice 36- Voltamograma cíclico do HNO_2 em metanol contendo PTBA $0,1\text{M. L}^{-1}$

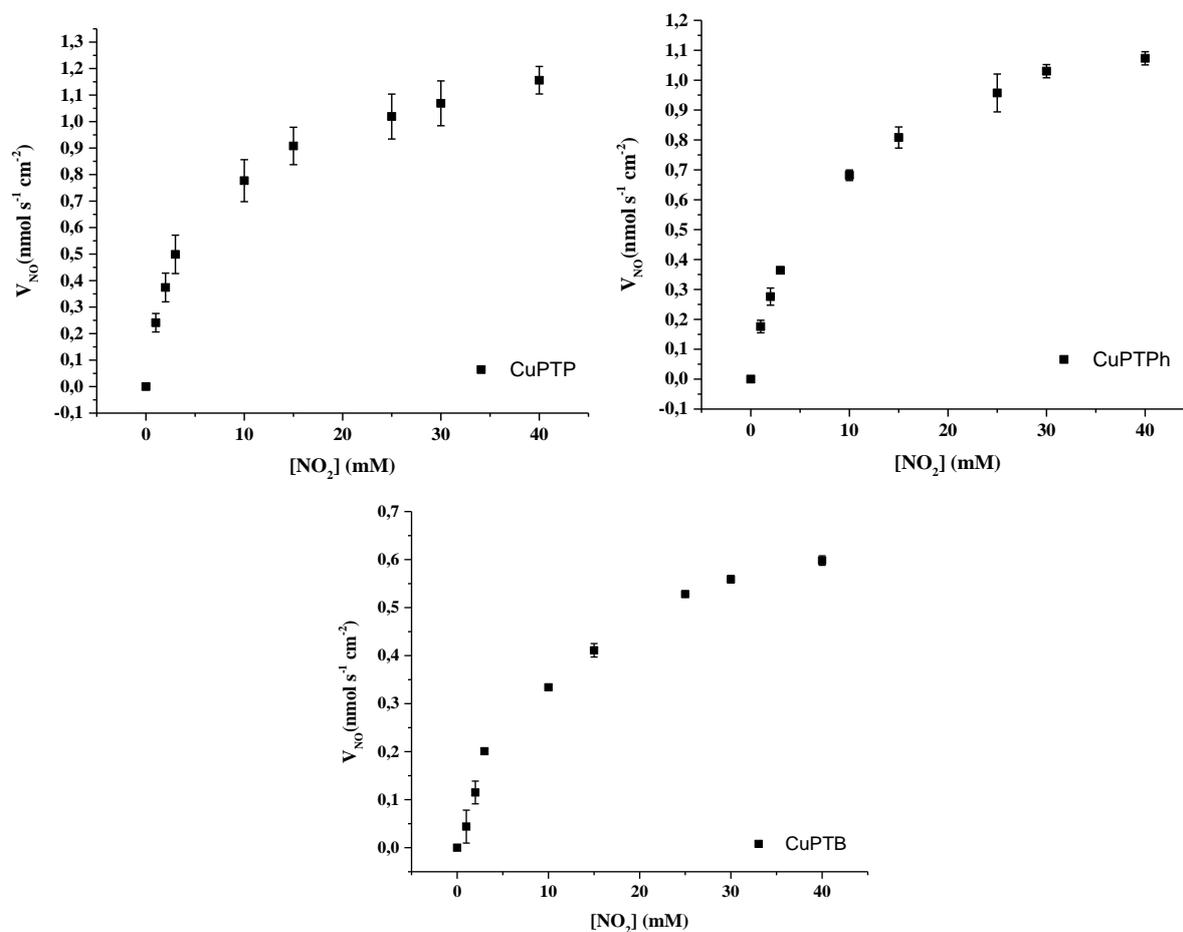


Fig. Apêndice 37 – Gráfico da concentração de NO_2^- vs V_{NO} dos complexos

DADOS CRISTALOGRAFICOS DO LIGANTE PTB

Tabela Apêndice 1- Dados de cristal e refinamento da estrutura para o ligante PTB.

Identification code	2113820
Empirical formula	C ₂₉ H ₃₃ N ₅
Formula weight	451.60
Temperature/K	293(2)
Crystal system	Monoclinic
Space group	P21
a/Å	9.8878(7)
b/Å	8.4324(7)
c/Å	15.4023(12)
α/°	90
β/°	98.845(7)
γ/°	90
Volume/Å ³	1268.94(17)
Z	2
ρ _{calc} /cm ³	1.182
μ/mm ⁻¹	0.071
F(000)	484.0
Crystal size/mm ³	0.427 × 0.291 × 0.24
Radiation	Mo Kα (λ = 0.71073)
2θ range for data collection/°	5.29 to 52.74
Index ranges	-12 ≤ h ≤ 12, -10 ≤ k ≤ 10, -19 ≤ l ≤ 19
Reflections collected	26267
Independent reflections	5199 [R _{int} = 0.0296, R _{sigma} = 0.0209]
Data/restraints/parameters	5199/1/335
Goodness-of-fit on F ²	1.044
Final R indexes [I ≥ 2σ (I)]	R1 = 0.0369, wR2 = 0.0935
Final R indexes [all data]	R1 = 0.0435, wR2 = 0.0996
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.13/-0.13
Flack parameter	-0.3(6)

Tabela Apêndice 2- Comprimentos de Ligação para o ligante PTB

Átomo		Comprimento/Å	Átomo		Comprimento/Å
N1	N2	1.309(3)	C9	C10A	1.517(9)
N1	C5	1.349(3)	C9	C10B	1.532(7)
N2	N3	1.334(2)	C10A	C11	1.394(10)
N3	C6	1.345(3)	C10B	C11	1.460(8)
N3	C7	1.488(2)	C12	C13	1.506(3)
N4	C8	1.485(3)	C13	C14	1.371(4)
N4	C11	1.460(4)	C14	C15	1.367(4)
N4	C12	1.441(3)	C15	C16	1.354(5)
N5	C13	1.322(3)	C16	C17	1.357(5)
N5	C17	1.335(4)	C18	C19	1.393(3)
C1	C2A	1.488(6)	C18	C23	1.380(3)
C1	C2B	1.590(12)	C19	C20	1.374(3)
C2A	C3A	1.485(6)	C20	C21	1.375(4)
C2B	C3B	1.546(16)	C21	C22	1.368(4)
C3A	C4	1.571(5)	C22	C23	1.382(3)
C3B	C4	1.457(13)	C24	C25	1.390(3)
C4	C5	1.495(4)	C24	C29	1.391(3)
C5	C6	1.356(3)	C25	C26	1.388(3)
C7	C8	1.569(3)	C26	C27	1.361(4)
C7	C18	1.540(3)	C27	C28	1.374(4)
C7	C24	1.533(3)	C28	C29	1.374(3)
C8	C9	1.543(3)			

Tabela Apêndice 3- Ângulos de Ligação para o ligante PTB

Átomos	Ângulo/°	Átomos	Ângulo/°
N2 N1 C5	109.50(18)	C10B C9 C8	103.7(3)
N1 N2 N3	107.55(17)	C11 C10A C9	106.7(6)
N2 N3 C6	109.48(17)	C11 C10B C9	102.6(4)
N2 N3 C7	122.65(16)	C10A C11 N4	108.5(4)
C6 N3 C7	127.23(16)	C10B C11 N4	109.6(3)
C11 N4 C8	107.3(2)	N4 C12 C13	111.9(2)
C12 N4 C8	115.85(19)	N5 C13 C12	116.7(2)
C12 N4 C11	110.8(3)	N5 C13 C14	121.6(2)
C13 N5 C17	117.1(3)	C14 C13 C12	121.7(2)
C3A C2A C1	112.4(4)	C15 C14 C13	120.2(3)
C3B C2B C1	113.3(8)	C16 C15 C14	118.6(3)
C2A C3A C4	112.8(4)	C15 C16 C17	118.1(3)
C4 C3B C2B	109.4(8)	N5 C17 C16	124.4(3)
C3B C4 C5	111.3(5)	C19 C18 C7	118.95(16)
C5 C4 C3A	113.7(3)	C23 C18 C7	123.29(18)
N1 C5 C4	122.0(2)	C23 C18 C19	117.72(19)
N1 C5 C6	107.2(2)	C20 C19 C18	121.0(2)
C6 C5 C4	130.8(2)	C19 C20 C21	120.2(2)
N3 C6 C5	106.28(19)	C22 C21 C20	119.7(2)
N3 C7 C8	107.89(14)	C21 C22 C23	120.2(2)
N3 C7 C18	104.60(16)	C18 C23 C22	121.1(2)
N3 C7 C24	108.32(15)	C25 C24 C7	122.25(18)
C18 C7 C8	110.79(15)	C25 C24 C29	117.30(19)
C24 C7 C8	111.26(16)	C29 C24 C7	120.44(18)
C24 C7 C18	113.59(14)	C26 C25 C24	120.9(2)
N4 C8 C7	110.42(15)	C27 C26 C25	120.6(2)
N4 C8 C9	105.34(18)	C26 C27 C28	119.3(2)
C9 C8 C7	114.75(18)	C27 C28 C29	120.7(3)
C10A C9 C8	104.0(4)	C28 C29 C24	121.1(2)

DADOS CRISTALOGRAFICOS DO COMPLEXO DE COBRE

Tabela Apêndice 4- Dados de cristal e refinamento da estrutura para o complexo CuPTPh

Identification code	2113821
Empirical formula	$C_{31}H_{37}Cl_2CuN_5O_{12}$
Formula weight	806.09
Temperature/K	293(2)
Crystal system	tetragonal
Space group	$P4_3$
a/Å	9.0835(5)
b/Å	9.0835(5)
c/Å	42.651(4)
$\alpha/^\circ$	90
$\beta/^\circ$	90
$\gamma/^\circ$	90
Volume/Å ³	3519.2(5)
Z	4
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.521
μ/mm^{-1}	0.842
F(000)	1668.0
Crystal size/mm ³	$0.182 \times 0.137 \times 0.117$
Radiation	Mo K α ($\lambda = 0.71073$)
2 Θ range for data collection/ $^\circ$	4.874 to 51.348
Index ranges	$-11 \leq h \leq 9, -11 \leq k \leq 11, -45 \leq l \leq 52$
Reflections collected	17810
Independent reflections	5928 [$R_{\text{int}} = 0.0414, R_{\text{sigma}} = 0.0491$]
Data/restraints/parameters	5928/10/478
Goodness-of-fit on F^2	1.045
Final R indexes [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R1 = 0.0384, wR2 = 0.0838$
Final R indexes [all data]	$R1 = 0.0484, wR2 = 0.0887$
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.33/-0.22
Flack parameter	-0.002(9)

Tabela Apêndice 5- Comprimento de ligação para o complexo CuPTPh

Átomos	Comprimento/Å	Átomos	Comprimento/Å
Cu1-O1	2.360(3)	C10-C11	1.495(6)
Cu1-O2	2.013(3)	C12-C13	1.499(5)
Cu1-N2	1.952(3)	C13-C14	1.372(6)
Cu1-N4	2.068(3)	C14-C15	1.370(6)
Cu1-N5	1.957(3)	C15-C16	1.381(6)
N1-N2	1.305(4)	C16-C17	1.375(6)
N1-C5	1.363(5)	C18-C19	1.391(5)
N2-N3	1.354(4)	C18-C23	1.385(6)
N3-C6	1.353(5)	C19-C20	1.370(6)
N3-C7	1.505(4)	C20-C21	1.389(7)
N4-C8	1.535(4)	C21-C22	1.359(7)
N4-C11	1.503(5)	C22-C23	1.387(6)
N4-C12	1.501(4)	C24-C25	1.394(5)
N5-C13	1.355(5)	C24-C29	1.389(5)
N5-C17	1.347(5)	C25-C26	1.388(6)
C1-C2	1.360(7)	C26-C27	1.375(7)
C1-C30	1.374(7)	C27-C28	1.365(7)
C2-C3	1.388(6)	C28-C29	1.389(5)
C3-C4	1.380(5)	C30-C31	1.379(6)
C4-C5	1.479(5)	C11-O3	1.421(4)
C4-C31	1.383(5)	C11-O4	1.428(4)
C5-C6	1.373(5)	C11-O5	1.428(3)
C7-C8	1.557(5)	C11-O6	1.435(4)
C7-C18	1.536(5)	C12-O7	1.362(5)
C7-C24	1.541(5)	C12-O8	1.388(5)
C8-C9	1.537(5)	C12-O9	1.360(5)
C9-C10	1.523(6)	C12-O10	1.410(4)

Tabela Apêndice 6- Ângulos de ligação para o complexo CuPTPh

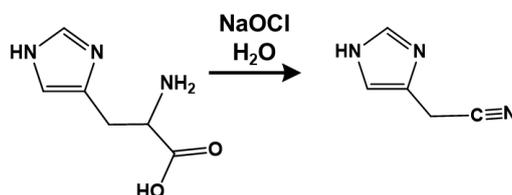
Átomos			Ângulo/°	Átomos			Ângulo/°
O2	Cu1	O1	85.26(12)	C9	C8	N4	104.9(3)
N2	Cu1	O1	93.01(12)	C9	C8	C7	114.1(3)
N2	Cu1	O2	92.51(12)	C10	C9	C8	106.1(3)
N4	Cu1	O1	102.68(12)	C11	C10	C9	102.8(3)
N4	Cu1	O2	171.45(12)	C10	C11	N4	104.0(3)
N4	Cu1	N2	90.26(12)	C13	C12	N4	109.8(3)
N5	Cu1	O1	91.81(13)	C12	C13	N5	114.6(3)
N5	Cu1	O2	93.10(12)	C14	C13	N5	120.8(4)
N5	Cu1	N2	172.88(13)	C14	C13	C12	124.6(4)
N5	Cu1	N4	83.57(13)	C15	C14	C13	120.1(4)
C5	N1	N2	107.5(3)	C16	C15	C14	119.4(4)
N1	N2	Cu1	124.3(2)	C17	C16	C15	118.6(4)
N3	N2	Cu1	125.3(2)	C16	C17	N5	122.1(4)
N3	N2	N1	110.1(3)	C19	C18	C7	117.6(3)
C6	N3	N2	107.9(3)	C23	C18	C7	124.3(4)
C7	N3	N2	120.6(3)	C23	C18	C19	118.1(4)
C7	N3	C6	130.9(3)	C20	C19	C18	122.0(4)
C8	N4	Cu1	118.3(2)	C21	C20	C19	119.4(5)
C11	N4	Cu1	107.5(2)	C22	C21	C20	118.9(4)
C11	N4	C8	104.8(3)	C23	C22	C21	122.3(5)
C12	N4	Cu1	103.8(2)	C22	C23	C18	119.3(5)
C12	N4	C8	113.2(3)	C25	C24	C7	124.9(3)
C12	N4	C11	109.1(3)	C29	C24	C7	116.5(3)
C13	N5	Cu1	114.5(3)	C29	C24	C25	118.6(4)
C17	N5	Cu1	125.9(3)	C26	C25	C24	119.8(4)
C17	N5	C13	119.0(3)	C27	C26	C25	121.3(5)
C30	C1	C2	120.4(4)	C28	C27	C26	118.8(5)
C3	C2	C1	120.6(5)	C29	C28	C27	121.3(4)
C4	C3	C2	119.6(4)	C28	C29	C24	120.1(4)
C5	C4	C3	121.4(4)	C31	C30	C1	119.3(5)
C31	C4	C3	119.1(4)	C30	C31	C4	120.9(4)
C31	C4	C5	119.6(4)	O4	C11	O3	109.2(3)

C4	C5	N1	121.8(3)	O5	C11	O3	109.1(3)
C6	C5	N1	108.4(3)	O5	C11	O4	110.5(3)
C6	C5	C4	129.8(4)	O6	C11	O3	109.0(3)
C5	C6	N3	106.1(3)	O6	C11	O4	108.7(2)
C8	C7	N3	106.0(3)	O6	C11	O5	110.4(2)
C18	C7	N3	106.9(3)	O8	C12	O7	105.4(4)
C18	C7	C8	112.8(3)	O9	C12	O7	107.9(4)
C24	C7	N3	111.9(3)	O9	C12	O8	112.7(4)
C24	C7	C8	110.2(3)	O10	C12	O7	109.3(4)
C24	C7	C18	109.1(3)	O10	C12	O8	107.4(3)
C7	C8	N4	114.7(3)	O10	C12	O9	113.7(4)

SÍNTESES ORGÂNICAS

Algumas sínteses orgânicas que foram realizadas serão registradas neste documento:

Síntese e caracterização do 2-(1H-imidazol-4-il)acetonitrila.



Uma suspensão de 20,9 g (0,1 mol) de monohidrato de monohidrocloreto de L- histidina em 60 mL de água foi resfriada para 7°C. Em seguida foi adicionado 308 mL (0,2 mol) de hipoclorito de sódio comercial (5,25%) gota a gota com agitação constante, mantendo sempre a temperatura entre 7°C e 15°C. A solução foi deixada em agitação por 3h nessa temperatura, e em seguida por 18h em temperatura ambiente. Carbonato de sódio sólido foi adicionado à mistura até o pH chegar a 8.0. A solução foi evaporada e o resíduo obtido foi refluxado em um *soxhlet* com 200mL de acetato de etila por 24h. O solvente foi removido sobre pressão reduzida para obter um sólido de cor castanho, que foi caracterizado por Infravermelho, RMN ¹H e ¹³C. Rendimento 60%. FTIR (pastilha de KBr): 2252 cm⁻¹ ν(C≡N).

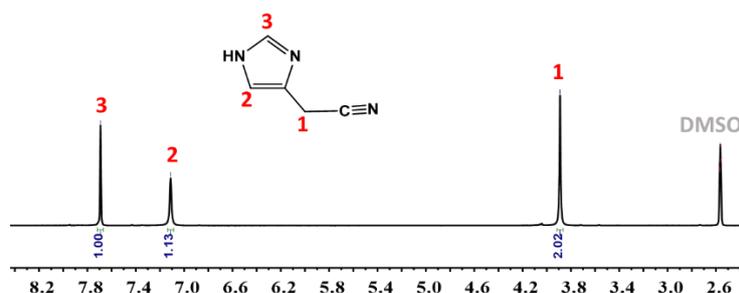
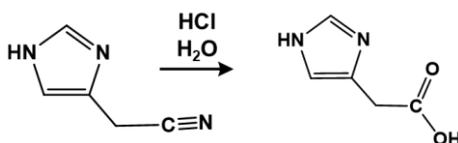


Fig. Apêndice 1.1- Espectro de RMN ^1H do 2-(1H-imidazol-4-il)acetonitrila em DMSO-D_6 .

Síntese e caracterização do 2-(1H-imidazol-4-il)ácido acético.



5g de 2-(1H-imidazol-4-il)acetonitrila foi dissolvido em 75 mL de solução aquosa de HCl (6 mol L^{-1}) e deixado em refluxo a 110°C por 4 h. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Em seguida foi adicionado água e rotavaporado novamente. O sólido obtido foi dissolvido em metanol quente e deixado na geladeira por 18h para a obtenção de um precipitado amarelo claro. O precipitado foi filtrado e seco sobre vácuo. Rendimento 53%. FTIR: 3200 cm^{-1} $\nu(\text{O-H})$; 1700 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$.

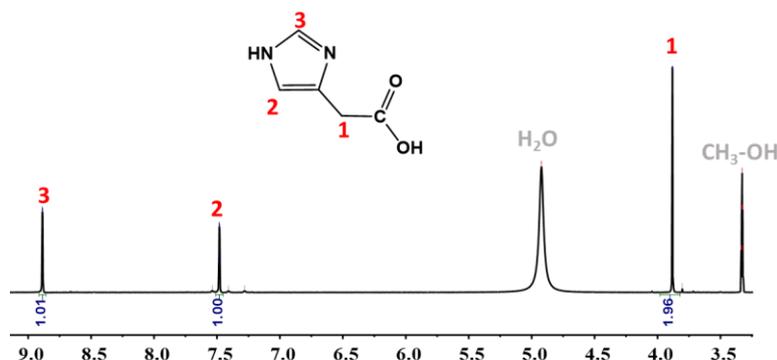
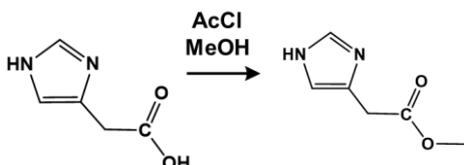


Fig. Apêndice 1.2- Espectro de RMN ^1H do 2-(1H-imidazol-4-il) ácido acético em CDCl_3

Síntese e caracterização do metil 2-(1H-imidazol-4-il)acetato.



Sob uma atmosfera de nitrogênio, uma suspensão de 2-(1H-imidazol-4-il)ácido acético (0,5 g 3,0 mmol) em metanol seco (10 mL) foi resfriado para 0°C e adicionado

AcCl (838 μ L, 11,5 mmol) gota a gota. A solução foi deixada em agitação sobre um banho de gelo a 0°C por 1h e em seguida por mais 3h em temperatura ambiente. O solvente foi evaporado para se obter um sólido branco. Rendimento ~100%.

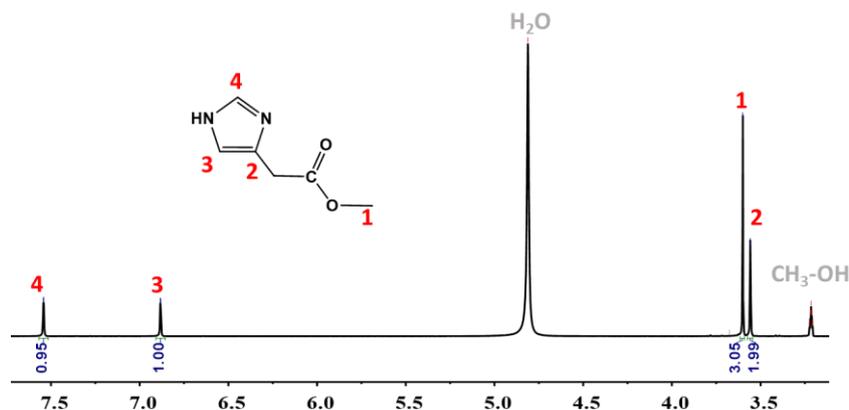
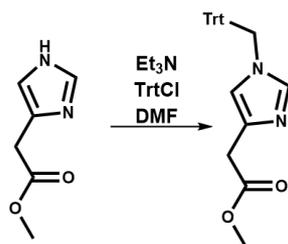


Fig. Apêndice 1.3- Espectro de RMN ^1H do 2-(1H-imidazol-4-il) ácido acético em CD_3OD

Síntese e caracterização do metil 2-(1-tritilo-1H-imidazol-4-il) acetato



Uma solução de metil 2-(1H-imidazol-4-il)acetato (545 mg, 3,00 mmol) e trietilamina (1,2 mL, 8,60 mmol) em 3,6 mL de clorofórmio seco foi adicionada à uma solução de cloreto de trifenilmetilo (0,949 g, 3,41 mmol) em 3,6 mL de clorofórmio seco resfriada sobre um banho de gelo. A mistura da reação foi agitada for 1h em temperatura ambiente, e foi então lavada 2 vezes com porções de 3,6 mL de uma solução de $0,5\text{mol L}^{-1}$ de HCl e uma vez com 3,6 mL de uma solução saturada da NaHCO_3 . A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e evaporada em vácuo. O sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (EtOAc/Hexano, 1:1) para produzir um sólido branco. Rendimento 46,5%.

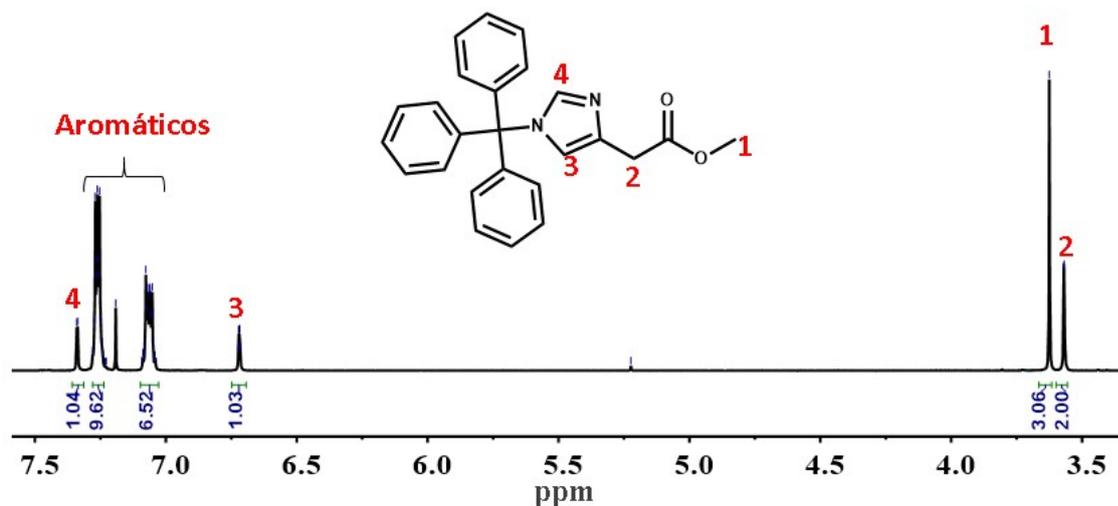
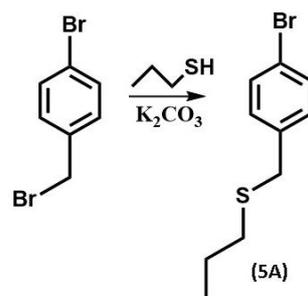


Fig. Apêndice 1.4- Espectro de RMN ¹H do metil 2-(1-tritilo-1H-imidazol-4-il) acetato em CDCl₃

Síntese e caracterização do (4-bromobenzil)(propil)sulfano



2,0 g de 1-bromo-4-(bromometil)benzeno (8,0 mmol), 0,73 mL de 1-propanotiol (8,0 mmol) e 1,34 g de K₂CO₄ (9,7 mmol) foram adicionados em 20 mL de acetonitrila. A solução foi deixada em agitação a temperatura ambiente por 72h. Após esse tempo foi adicionado água e extraído com diclorometano. A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi removido sobre pressão reduzida, para se obter um óleo amarelo claro. Rendimento 83,1%.

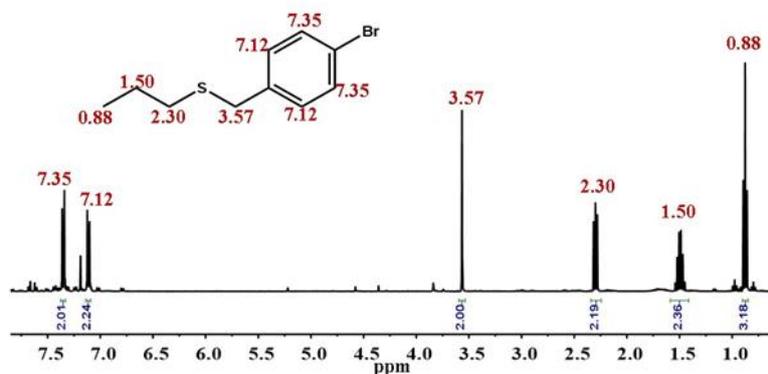
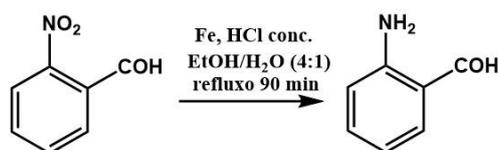


Fig. Apêndice 1.5- Espectro de RMN ¹H (4-bromobenzil)(propil)sulfano em CDCl₃

Síntese do 2-aminobenzaldeído



Para uma solução de 2-nitrobenzaldeído (1,51g, 10 mmol) em etanol (30m) e água (7,5 mL) e sob atmosfera inerte, foi adicionado pó de ferro (5,6 g, 100 mmol) e HCl concentrado (0,1 mL). A mistura de reação foi refluxada por 90 min. Após esse tempo a solução foi diluída com acetato de etila e foi adicionado MgSO_4 anidro. A mistura foi filtrada em celite e o filtrado rotavaporado para reduzir o volume para 5 mL. O resíduo foi purificado em coluna de cromatografia em sílica gel (EtOAc/hexane, 20:80) para formar 2-aminobenzaldeído como um sólido amarelo pálido. Obs: a purificação em coluna foi feita rapidamente pois o produto é instável a temperatura ambiente. Rendimento 85 %. O produto foi armazenado a -5°C em um balão sob atmosfera de argônio e na ausência de luz.

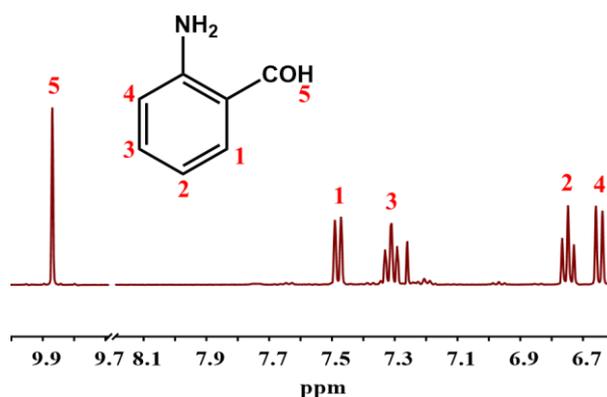
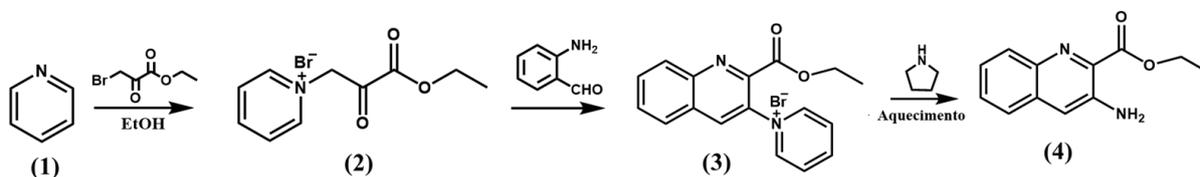


Fig. Apêndice 1.6- Espectro de RMN ^1H do 2-aminobenzaldeído em CDCl_3

Síntese do etil 3-aminoquinolina-2-carboxilato



Para uma solução de piridina (685 mg, 8,68 mmol) em etanol (24 mL) foi adicionado uma solução de etilbromopiruvato (1,69 g, 8,68 mmol) em etanol (16 mL) gota a gota. A mistura resultante foi aquecida a 60°C por 1h e então seguido ao resfriamento para a temperatura ambiente. 2-Aminobenzaldeído (1,0 g, 8,26 mmol) e piridina (1,6 mL) foram adicionados a mistura de reação, o qual foi então refluxado por 5h. Após esse tempo, pirrolidina (1,41 g, 19,8 mmol) foi adicionada, e então a reação foi aquecida a 70°C por 2h. A mistura foi

resfriada para a temperatura ambiente e o solvente foi removido sb pressão reduzida para se obter um óleo castanho-escuro. O produto foi purificado em coluna de cromatografia de sílica gel (50% EtOAc/Hexano) e foi obtido um sólido amarelo. Rendimento 6%.

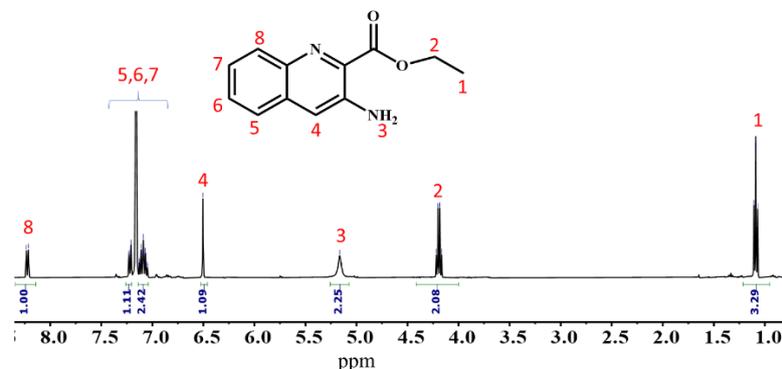
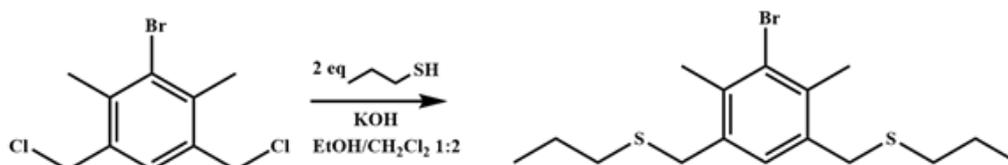


Fig. Apêndice 1.7- RMN ¹H do 3-aminoquinolina-2-carboxilato em Hexano-D

Síntese do ((5-bromo-4,6-dimetil-1,3fenileno)bis(metileno))bis(propilsulfano)



Em uma solução de 39,7 mg de KOH em 1 mL de etanol foi adicionado 64,3 μL de propanotiol. Imediatamente foi adicionado uma solução de 100 mg do 3-bromo-1,5-bis(clorometil)-2,4-dimetilbenzo solubilizado em 2 mL de diclorometano foi deixado em agitação por 1 h. Após esse tempo, 6 mL de água foram adicionados e foi extraído 3 vezes com 10 mL de diclorometano. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e o solvente foi removido sob pressão reduzida para se obter 130 mg de um óleo amarelo.

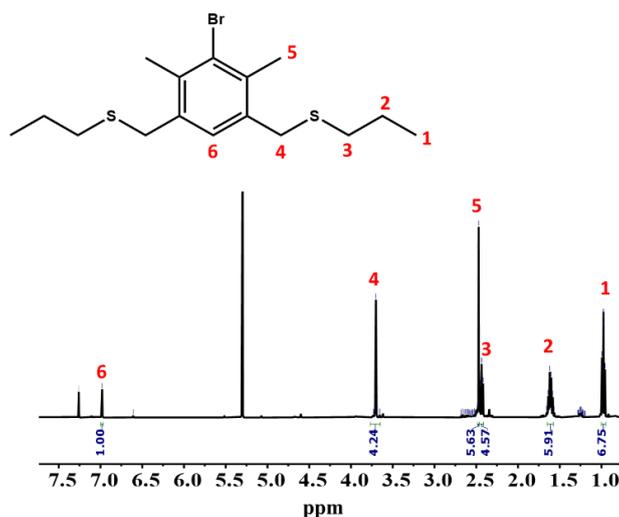


Fig. Apêndice 1.8- RMN ¹H do composto (B) em CDCl₃

