INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

t. 19.502

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

recebido em 02/04/01

Epilide

NÃO LICAS

***Atividade Catalítica de Compostos Diimínicos de Cobre(II)
Frente a Oxidantes Biológicos: Espécies Mono-, Di- e
Tetranucleares***

WENDEL ANDRADE ALVES

Dissertação de Mestrado

Química Inorgânica

Profa. Dra. Ana Maria Da Costa Ferreira

Orientadora

São Paulo

15/02/2001

DEDALUS - Acervo - CQ

30100003569

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Alves, Wendel Andrade

A474a Atividade catalítica de compostos diimínicos de cobre (II)
frente a oxidantes biológicos : espécies mono-, di- e tetranucleares /
Wendel Andrade Alves. -- São Paulo, 2001.
133p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador : Ferreira, Ana Maria da Costa

1. Química bioinorgânica 2. Cobre : Análise química :
Inorgânica I. T. II. Ferreira, Ana Maria da Costa, orientador.

546.3 CDD

*“Atividade Catalítica de Compostos Diimínicos de
Cobre(II) Frente a Oxidantes Biológicos: Espécies
Mono-, Di- e Tetranucleares”.*

WENDEL ANDRADE ALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS - ÁREA: QUÍMICA INORGÂNICA

Aprovada por:

Profa. Dra. ANA MARIA DA COSTA FERREIRA
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. KOITI ARAKI
IQ - USP

Prof. Dr. ANTONIO EDUARDO MAURO
IQ – UNESP - Araraquara

SÃO PAULO
15 DE FEVEREIRO DE 2001.

ÍNDICE

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas

1. Estruturas dos Compostos de Cobre(II) Sintetizadosiii

2. Estruturas dos Principais Compostos Utilizadosvi

OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Estrutura e Reatividade de Proteínas de Cobre4

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e Soluções.....6

2.2. Síntese da N-benzil-1,3-propanodiamina7

2.3. Síntese de Compostos de Cobre tipo Base de Schiff8

2.3.1. Preparação dos Complexos Mononucleares8

2.3.2. Preparação dos Complexos Dinucleares e Tetranucleares10

2.4 Aparelhagens e Técnicas Experimentais12

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização25

3.1.1. Análise Elementar25

3.1.2. Espectros Eletrônicos26

3.1.3. Espectroscopia Vibracional37

3.1.4. Medidas de Susceptibilidade Magnética46

3.1.5. Condutividade Molar48

3.1.6. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica50

3.2. Estudos dos Equilíbrios em Solução63

3.2.1. Método através de EPR64

3.2.2. Método Espectrofotométrico68

3.2.3. Eletroforese Capilar73

3.3. Reatividade	78
3.3.1. Atividade Pró-Oxidante dos Compostos Mono-, Di- e Tetranuclear ..	78
3.3.2. Catálise da Decomposição do Peróxido de Hidrogênio.....	83
3.3.3. Catálise da Oxidação do 2,6-di- <i>terc</i> -butilfenol	104
3.3.4. Catálise da Oxidação da L-Dopa	119
4. CONCLUSÕES	125
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

*A meus pais, Manoel e Neuza,
e irmãos, Gislayne e Helder,
por compartilharem comigo
da realização deste sonho.*

*"Gostaria de agradecer sinceramente à Profa. Dra. Ana Maria Da Costa Ferreira,
não apenas pela orientação e dedicação, mas também pela amizade,
companheirismo e confiança depositados."*

AGRADECIMENTOS

Ao grupo de pesquisa do qual faço parte: Maria Amélia, Maria Lúcia e Marcos Damasceno, pela amizade, apoio, confiança e companheirismo crescentes que recebo.

Aos companheiros de laboratório: Christian, Melina, Adriana, André, Fátima e Mauro, pela amizade e conversas não científicas.

Aos Professores, amigos do B2T, Alzilene e Ivone pela convivência agradável.

À Cida, pelo companheirismo e colaboração constante.

Aos colegas, funcionários e professores do Instituto de Química da USP que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

À Professora Márcia L. A. Temperini pela possibilidade de realizar os experimentos no Raman e ao Antônio Carlos pela sua colaboração.

Ao José Soares, pela realização das análises no Espectrômetro de Emissão Atômica.

Ao Professor Jivaldo Mattos pela possibilidade de realizar os experimentos no IV.

À Professora Marina Tavares pela possibilidade de realizar os experimentos de eletroforese capilar, em especial ao Marcone pela sua colaboração nas análises.

Aos Professores Luiz Fernando Cappa “Pimenta” e Rosana Colombara, pelo esforço e incentivo constantes, e sobretudo pela amizade e pelos churrascos realizados na Mooca.

Ao Professor Mauro Vieira de Almeida pela amizade e colaboração.

Aos amigos da república “trem de doido”: Guilherme, Leonardo e Marcone, pelas idéias, amizade, companheirismo, incentivo, cerveja e pipoca.

Enfim, todos aqueles que, dentro e fora do Instituto de Química, colaboraram para o meu crescimento científico, intelectual e moral.

RESUMO

Diferentes complexos de cobre(II) contendo um ligante tridentado do tipo imínico e um grupo imidazol foram preparados, na forma de sais perclorato, e caracterizados através de diferentes técnicas espectroscópicas (UV/Vis, IR, Raman e EPR). Em solução aquosa, estes compostos estão em equilíbrio com as correspondentes espécies dinucleares, onde os centros de cobre estão ligados através de uma ponte imidazolato. Em meio alcalino, estes compostos dinucleares e uma espécie tetranuclear foram também isolados e caracterizados. Medidas espectroscópicas e por eletroforese capilar, a diferentes pHs, permitiram estimar o valor da constante de equilíbrio num dos casos.

A atividade catalítica desses complexos frente ao peróxido de hidrogênio e ao oxigênio molecular foi então comparada. A maioria dos compostos dinucleares e o tetranuclear mostraram ser eficientes catalisadores para a oxidação aeróbica de substratos fenólicos, com formação da correspondente difenoquinona, monitorada espectrofotometricamente, exibindo uma dependência de primeira ordem da velocidade de reação com a concentração do fenol e do complexo.

Por outro lado, o estudo cinético da decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio, monitorada manometricamente através do oxigênio liberado, indicou uma apreciável atividade dos compostos mononucleares, dependendo do pH. Neste caso, espécies reativas de oxigênio foram detectadas por EPR, utilizando o método do captador de spin.

Parâmetros espectroscópicos e características estruturais destes complexos mostraram ser determinantes para sua reatividade frente a ambos os oxidantes biológicos estudados.

ABSTRACT

Different copper(II) complexes containing an imidazole ligand, in addition to a discrete tridentate imine, were prepared as perchlorate salts, and characterised by spectroscopic techniques (UV/Vis, IR, Raman and EPR). In aqueous solution, these compounds are in equilibrium with the corresponding binuclear species, where the copper centres are bridged by an imidazolate ligand. In alkaline solutions, these binuclear species and a tetranuclear were also isolated, and characterised. Evidence of these equilibria in aqueous solution was obtained by spectroscopic measurements and capillary electrophoresis, at different pH. An equilibrium constant involving the mono- and binuclear species was estimated for one of the ligands.

The catalytic activity of the obtained complexes toward the usual biological oxidants, hydrogen peroxide and molecular oxygen, were then compared. Most of the binuclear and tetranuclear compounds showed to be efficient catalysts of the aerobic oxidation of phenolic substrates to the corresponding quinones or diphenoquinones, followed spectrophotometrically. Kinetic results indicated a first-order dependence of the reaction rate on both the complex and the phenol concentrations.

On the other hand, an appreciable activity of the mononuclear compounds was verified on the catalytic decomposition of hydrogen peroxide. This reaction was monitored manometrically by the oxygen released, and was shown to be very dependent on the pH. Additionally, in this case, very reactive oxygen radicals were detected at the first stages of the reaction, by spin trapping EPR.

Spectroscopic parameters and structural features in these complexes seem to be determinant of their reactivity toward the studied biological oxidants.

LISTA DE ABREVIATURAS

1. Estruturas dos Compostos de Cobre(II) Sintetizados

Compostos Mononucleares

→ [SECuImH]⁺

→ [Cu(apv-epy)ImH]²⁺

→ [Cu(apv-epy)OH]⁺

Compostos Dinucleares e Tetranuclear

2. Estrutura dos Principais Compostos Utilizados

Abreviatura	Fórmula	Nome
sal		Salicilaldeído
imH		Imidazol
en		1,2-diaminoetano
tea	$N(CH_2CH_3)_3$	Trietilamina
apy		2-acetilpiridina
epy		2-(2-aminoetilpiridina)
bz		N-benzil-1,3-propanodiamina
fen		1,2-fenilenodiamina

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Com tantas estruturas peculiares e reatividades tão diversificadas, as proteínas de cobre inspiram inúmeros estudos bioinorgânicos, visando investigar suas características estruturais e suas possíveis correlações com as funções desempenhadas. Particularmente, compostos dinucleares de cobre têm sido extensivamente descritos na literatura como sistemas miméticos da enzima tirosinase. No processo funcionam como monooxigenases, catalisando a hidroxilação de monofenóis para o-difenóis (atividade cresolase) e convertendo o-difenóis em o-quinonas (atividade catecolase).

Neste trabalho pretendeu-se preparar e caracterizar novos compostos de cobre(II), capazes de mimetizar o sítio ativo de monooxigenases de cobre, tanto no aspecto estrutural como funcional. Estes estudos visaram ainda a verificação de sua atividade catalítica frente aos oxidantes biológicos, oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, com a finalidade de avaliar características estéricas do ligante, diferenças na hidrofobicidade dos complexos, acessibilidade do agente oxidante ao centro metálico, como fatores determinantes desta reatividade. Investigações deste tipo permitem elucidar melhor mecanismos propostos para processos biológicos importantes.

1. INTRODUÇÃO

A importância do cobre como elemento essencial aos seres vivos pode ser avaliada pelo grande número de proteínas e enzimas dependentes desse metal, participantes de inúmeros processos biológicos, onde desempenham funções variadas (vide **Figura 1**). Estas funções incluem: transporte de oxigênio molecular; transporte de elétrons; absorção, armazenamento e transporte de cobre; oxidação de substratos, como aminas, fenóis e carboidratos; e ação antioxidante contra radicais livres. Para desempenhar tais funções, essas proteínas e enzimas de cobre exibem estruturas peculiares, com propriedades bastante interessantes e que vêm despertando o interesse de pesquisadores já há bastante tempo [1].

Figura 1 - Funções metabólicas de algumas proteínas contendo cobre [7]

Os átomos de cobre (II) presentes em metaloproteínas podem ser classificadas de acordo com suas propriedades espectroscópicas [2,3]. As do tipo-1, como as encontradas em proteínas azuis, apresentam um biosítio mononuclear de cobre, com absorção característica na região do visível a 600 nm, com $\epsilon > 3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e espectro EPR com $A_{//} < 95 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. As plastocianinas e as azurinas são exemplos deste tipo de proteínas.

As plastocianinas são encontradas em cloroplastos de plantas e em outros organismos fotossintéticos, sendo responsáveis pelo transporte de elétrons. Na plastocianina de álamo, o metal está coordenado através do nitrogênio a dois resíduos de histidina, e através do enxofre a um resíduo de cisteína e outro resíduo de metionina. A geometria ao redor do cobre é tetragonalmente distorcida [4].

As azurinas são encontradas em algumas bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* e também são transportadoras de elétrons. O cobre está coordenado através do nitrogênio a dois resíduos de histidina, através do enxofre a resíduos de cisteína e metionina e através do oxigênio a um resíduo de glicina. A geometria ao redor do metal neste caso é de uma bipirâmide trigonal distorcida [5].

Os centros de cobre do tipo-2 são mais simples, já que contêm um único átomo de cobre, coordenado de modo similar aos complexos monucleares de Cu (II) com ligantes inorgânicos usuais. Apresentam banda larga na região UV-Vis próxima a 700 nm e espectros EPR com $A_{//} > 140 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. As galactose-oxidases e as amino-oxidases são exemplos deste tipo de centro metálico.

As galactose-oxidases são encontradas em vários animais e também no homem, e estão entre as enzimas cuja função é de catalisar a oxidação de álcoois a aldeídos, através da redução de oxigênio a peróxido de hidrogênio.

As amino-oxidases são encontradas no organismo humano e catalisam a desaminação oxidativa de aminas e diaminas biológicas a aldeídos. Alguns estudos mostram que somente um dos sítios de cobre (II) é imprescindível para a catálise, evidenciando que o mecanismo de ação da enzima envolve a

coordenação da amina de uma forma muito similar àquela que ocorre nos complexos inorgânicos de cobre (II) com aminas bidentadas [6].

O centro do tipo-3 apresenta uma forte absorção na região UV próximo ($\lambda_{\text{máx.}} = 330 \text{ nm}$) e não apresenta sinal EPR, pois consiste de um par de íons Cu(II) acoplados antiferromagneticamente. As hemocianinas e as tirosinases são exemplos de proteínas de cobre dinucleares do tipo-3. As hemocianinas estão presentes em muitas espécies de moluscos e de artrópodos e são transportadoras de oxigênio [7].

As tirosinases são enzimas de cobre largamente disseminadas nos organismos vivos, responsáveis pelo escurecimento observado em frutas, vegetais e cogumelos, sendo importantes do ponto de vista prático e econômico na agricultura e na indústria de alimentos. Elas também apresentam dois átomos de cobre vizinhos, acoplados antiferromagneticamente e que são capazes de coordenar a molécula de oxigênio, ativando-a. No processo funcionam como monooxigenase, catalisando a *o*-hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois (atividade cresolase) e convertendo *o*-difenois em *o*-quinonas (atividade catecolase) [8].

Com tantas estruturas peculiares e reatividades tão diversificadas, as proteínas de cobre também inspiraram inúmeros estudos bioinorgânicos, visando investigar suas características estruturais e suas possíveis correlações com as funções desempenhadas.

Particularmente, compostos de cobre tipo base de Schiff, obtidos a partir da condensação de compostos carbonílicos com aminocompostos, são modelos potenciais do sítio ativo de diversas proteínas e enzimas de cobre, que desempenham papel fundamental, especialmente em reações do oxigênio e de suas espécies reativas [9,10]. Compostos deste tipo conseguem mimetizar tanto características estruturais como funcionais dessas proteínas e enzimas de cobre, auxiliando na elucidação de suas propriedades espectrais, redox e catalíticas. Por esta razão, preparamos compostos de cobre(II) mono- e dinucleares, com ligantes nitrogenados do tipo base de Schiff tridentada, e desenvolvemos estudos cinéticos e mecanísticos de reações de oxidação de alguns substratos catalisadas por estes

compostos, que servem como modelo para centros de cobre do tipo 3, usando oxigênio molecular como agente oxidante [11,12]. Por outro lado, verificamos também a atividade das espécies mononucleares na decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio, outro oxidante disseminado no meio biológico.

1.1. Estrutura e Reatividade de Proteínas de Cobre

Muitas das proteínas de cobre exibem características espectrais únicas, se comparadas às de complexos simples de cobre de alta simetria, com ligantes menores. Isto decorre das estruturas eletrônicas e geométricas peculiares que são impostas ao íon cobre num centro ativo de proteína. Essas estruturas peculiares serão determinantes para a reatividade destes centros em reações catalíticas [2,3].

A interação metal-ligante em complexos de cobre(II) tem freqüentemente caráter iônico e favorece a estabilização desse estado de oxidação através de uma distorção Jahn-Teller (tetragonal) acentuada, o que favorece a preferência por ligantes nitrogenados. Diferentes extensões do alongamento axial, numa geometria octaédrica, podem produzir diversas geometrias: bipirâmide tetragonal, piramidal de base quadrada ou quadrado planar. Desvios dessas estruturas de energia mínima, que são necessários para possibilitar mudanças rápidas no estado de oxidação em transferências eletrônicas eficientes, requerem conformações específicas do sítio ativo, numa arquitetura elaborada pelos ligantes, seja em proteínas ou em compostos-modelo especialmente planejados. A distorção verificada nos centros de cobre 1, característico das proteínas azuis transportadoras de elétrons, explica a flexibilidade da esfera de coordenação para acomodar o metal nos dois estados de oxidação, sem exigir variações drásticas de conformação da proteína, que demandariam muita energia [1].

Além disso, a comparação do potencial de redução $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ de proteínas de cobre com o de outros sistemas análogos, biologicamente relevantes, particularmente o par $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$, revela que usualmente os sistemas de cobre têm potenciais mais alto. Proteínas de cobre como a ceruloplasmina são capazes de catalisar a oxidação de $\text{Fe}(\text{II})$ a $\text{Fe}(\text{III})$, numa atividade ferroxidase. Na **Tabela 1**

são apresentados os potenciais redox de algumas proteínas de cobre, comparados ao potencial do complexo aquoso e dos compostos com os ligantes nitrogenados 2,2'-bipiridina (bipy) e o-fenantrolina (o-phen). Para os complexos com ligantes simples esse potencial varia de 120 a 170 mV, enquanto para as proteínas de cobre os valores são observados na faixa de 310 a 430 mV [1]

Tabela 1 – Alguns Potenciais Redox de Proteínas de Cobre, a pH = 7,0 [4].

Proteína ou composto	Potencial Redox, mV E° (Cu ^{II} /Cu ^I) vs. ENH
Azurina (Cobre tipo 1)	+308
Plastocianina (Cobre tipo 1)	+360
Lacase (Cobre tipo 1/tipo 2/tipo 3)	+394/+365/+434
Tirosinase (Cobre tipo 3)	+360
Dopamina β -monooxigenase (Cobre tipo 2)	+370
Cu ₂ Zn ₂ SOD (Cobre tipo 2)	+403 / +120
Citocromo c oxidase	
Cu _A	+190
Cu _B	+340
[Cu(bipy) ₂]	+120
[Cu(o-phen) ₂]	+170
[Cu(H ₂ O) ₄]	+160

A alta estabilidade das ligações Cu^{II} –N, freqüentemente inertes, torna desnecessário o uso de ligantes macrocíclicos tetrapirrólicos, comuns em sistemas biológicos contendo ferro ou cobalto, mas atípicos para cobre. Por outro lado, ligações de íons cobre com ligantes contendo O, S ou P como átomos ligantes são mais fracas e mais lábeis. A geometria e o número de coordenação do cobre(I) é mais flexível, devido à sua configuração d¹⁰ e também porque este íon não exibe efeitos de campo ligante. Neste caso, o uso de ligantes “moles” contendo P ou S estabiliza o estado de oxidação mais baixo [13].

Desta forma, a variedade de estruturas observadas em proteínas de cobre possibilita sua atuação em diferentes reações, tornando-o um elemento bastante versátil. A presença de dois centros próximos, como na hemocianina ou na tirosinase, permite coordenar a molécula O_2 , ora atuando como transportador do oxigênio molecular, ora como catalisador de transferências eletrônicas que levam à oxidação de substratos, através de hidroxilação ou da formação de quinonas [14].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e Soluções

Os reagentes: Salicilaldeído, 2-acetilpiridina, 5,5'-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), 2-(2-aminoetilpiridina) e o perclorato cúprico hexahidratado foram de procedência da Aldrich Chemical Co.

Os sais inorgânicos para preparação das soluções tampão, os reagentes: 1,2-diaminoetano, Imidazol e a Trietilamina; assim como os solventes utilizados, tais como: o álcool etílico e o álcool metílico absoluto, foram de procedência da Merck

O peróxido de hidrogênio utilizado foi uma solução 35% em peso, livre de estabilizantes, procedente da Peróxidos do Brasil Ltda. As soluções mais diluídas foram preparadas a partir desta solução por diluição apropriada e analisadas posteriormente por espectrofotometria, usando o método do vanadato (descrito em Aparelhagens e Técnicas Experimentais).

Os demais reagentes foram obtidos de diferentes fontes, com grau analítico.

A água para preparo de todas as soluções foi desionizada, em aparelho Barnstead, modelo D 4700. O sistema desionizador é formado por um conjunto em circuito de 4 filtros cilíndricos, contendo resina para captura de íons e carvão ativado para captura de material orgânico.

2.2. Síntese da N-benzil-1,3-propanodiamina

A uma solução de 1,3-propanodiamina (2,96 g; 40 mmol) em etanol (20 mL) foi adicionado, lentamente, durante o período de 8h, cloreto de benzila (1,27 g; 10 mmol). A solução foi agitada à temperatura ambiente por 48h, quando foi adicionada a solução saturada de NaOH em metanol, até atingir pH 14. O solvente foi evaporado e o resíduo foi então purificado por coluna cromatográfica (Diclorometano/ Metanol), obtendo-se 1,15 g (70% rendimento) de N-benzil-1,3-propanodiamina.

Este composto foi preparado e caracterizado, no laboratório do Prof. Mauro Vieira de Almeida, na Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.

Dados espectrais do composto

Fórmula molecular: $C_{10}H_{16}N_2$

Massa molar: 164,0 g/mol

PF: 305,5-307,5 °C

IV. ν KBr (cm^{-1}): 3238, 3025, 2982, 2907, 2763, 1599, 1438, 1176, 975, 745.

1H R.M.N. (200 MHz; TFA d^1) δ : 2,12 (m, 2H, $\underline{CH_2}$); 3,09 (m, 4H, $\underline{CH_2N}$); 4,06 (s, 2H, $\underline{CH_2Ph}$); 7,15 (m, 5H, Ph)

^{13}C R.M.N. (50 MHz, TFA d^1) δ : 26,17; 40,25; 47,06; 55,60 (CH_2); 108,50; 114,14; 120,77; 125,41 (Ph).

Discussão dos dados espectrais

Observam-se no espectro de infravermelho bandas de absorção atribuíveis à presença das ligações N-H a 3238 cm^{-1} , C-H aromático a 3025 cm^{-1} e C-H alifático a 2982 cm^{-1} .

No espectro de RMN 1H , observam-se sinais a δ 2,12; 3,09; 4,06 e 7,15 correspondentes, respectivamente, aos átomos de hidrogênio $\underline{CH_2}$, $\underline{CH_2N}$, $\underline{CH_2Ph}$ e Ph.

No espectro de RMN ^{13}C observa-se o aparecimento dos sinais a δ 26,17; 40,25; 47,06 e 55,66 correspondentes aos carbonos metilênicos, além daqueles correspondentes ao anel aromático δ 108,50; 114,14; 120,77 e 125,41.

Baseado nestes dados pode-se afirmar que o composto diamina foi preparado com alta pureza.

2.3. Síntese de Compostos de Cobre tipo Base de Schiff

A primeira etapa do projeto consistiu em preparar novos compostos de cobre(II) mono-, di- e tetranucleares com ligantes tridentados do tipo base de Schiff, obtidos a partir de compostos carbonílicos e aminas. Os compostos foram preparados de acordo com procedimentos descritos na literatura [15,16], introduzindo-se algumas modificações adequadas a cada caso, principalmente com relação à adição dos reagentes e controle do pH afim de obter melhores resultados. Em seguida, procedeu-se à sua caracterização química e estrutural, utilizando diferentes técnicas, a fim de obter-se parâmetros espectroscópicos e estruturais.

2.3.1. Preparação dos complexos mononucleares

a) [SECulmH]⁺

Este composto já havia sido preparado anteriormente, embora não bem caracterizado espectroscopicamente [16]. Em uma solução de 1,0 mL (10 mmol) de salicilaldeído dissolvido em 50 mL de metanol, sob agitação constante, à temperatura ambiente, foram adicionados, gota a gota, 10 mL de uma solução aquosa de perclorato de cobre (II) hexahidratado (10 mmol, 3,705 g). Em seguida, foram adicionados 1,4 g (20 mmol) de Imidazol. Após a homogeneização do sistema, adicionaram-se 10 mL de uma solução metanólica de 1,2-diaminoetano (10 mmol). Depois de decorridas 2 h, observou-se a formação de uma solução azul escuro. Resfriou-se então o sistema lentamente, em banho de gelo, por aproximadamente 30 minutos. Filtrou-se o precipitado obtido, de coloração azul escuro, lavou-se com metanol e éter dietílico gelados e finalmente procedeu-se à sua secagem, em dessecador a vácuo. O rendimento obtido foi de 84%.

b) $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$

Na preparação desse complexo adicionou-se sob agitação, gota a gota, 1,2 mL (10 mmol) de 2-(2-aminoetil)piridina a uma solução de 1,1 mL (10 mmol) de 2-acetilpiridina dissolvidos em 50 mL de metanol. Após a homogeneização do sistema, adicionaram-se lentamente, 10 mmol (3,705 g) de perclorato de cobre(II) dissolvidos em 10 mL de água desionizada, em seguida 1,4 g (20 mmol) de Imidazol. Esta solução foi deixada sob agitação constante, à temperatura ambiente, durante 8 h, quando se observou a formação de uma solução azul escuro. Resfriou-se o sistema lentamente, em banho de gelo, por aproximadamente 30 minutos. Filtrou-se o precipitado obtido, de coloração azul marinho escuro, lavou-se com metanol e éter dietílico gelados e finalmente secou-se em dessecador a vácuo. O rendimento obtido foi de 72%.

c) $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$

Adicionaram-se 480 μL (4 mmol) de 2-(2-aminoetilpiridina) a 740 mg (2 mmol) de perclorato de cobre(II) hexahidratado dissolvidos em 30 mL de metanol. Em seguida, foram adicionados gota à gota 224 μL de acetilpiridina previamente dissolvida em 15 mL de metanol, sob agitação e temperatura constante de 22 °C. A solução inicialmente de coloração azul escuro tornou-se esverdeada e um precipitado bem fino foi observado de início. Após ter sido mantido no freezer por 40 minutos, o precipitado de cor azul turquesa foi filtrado e lavado com água desionizada e metanol gelados, e depois, seco em dessecador a vácuo. O rendimento da reação foi de 74%.

2.3.2. Preparação dos complexos dinucleares e tetranuclear

a) $[\text{SECuImCuSE}]^+$

Este composto, que também já havia sido descrito, foi preparado utilizando a metodologia indicada [16].

Adicionaram-se 0,35 mL (2,54 mmol) de trietilamina a uma solução contendo 0,50 g (1,27 mmol) do composto $[\text{SECuImH}]^+$, parcialmente dissolvido em 15 mL de etanol. Este sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente, durante 30 min, produzindo um precipitado cinza escuro. Resfriou-se então o sistema lentamente, em banho de gelo. Após filtração, o sólido constituído de finos cristais foi lavado com etanol e éter etílico gelado, obtendo-se um rendimento de 94%.

b) $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$

Adicionou-se sob agitação, gota a gota, 0,36 mL (3,0 mmol) de 2(2-aminoetil)piridina, dissolvidos em 10 mL de metanol, a uma solução de 0,34 mL (3,0 mmol) de 2-acetilpiridina dissolvidos em 10 mL de metanol. Após a homogeneização do sistema, adicionaram-se lentamente, 3,0 mmol (1,111 g) de perclorato de cobre(II) dissolvidos em 10 mL de água desionizada, em seguida 0,102g (1,5 mmol) de imidazol. O pH desta reação foi controlado adicionando-se 1,5 mL de NaOH 1M (pH $\approx$ 9,40). Esta solução foi deixada sob agitação constante durante 8h à temperatura ambiente, quando se observou a formação de uma solução azul escuro. Resfriou-se o sistema lentamente, em banho de gelo, por aproximadamente 30 minutos. Filtrou-se o precipitado obtido, de coloração azul claro, lavou-se com metanol e éter dietílico gelados e finalmente secou-se em dessecador a vácuo. O rendimento obtido foi de 92%.

c) $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$

Na preparação desse complexo, adicionou-se sob agitação, gota à gota, 0,22 mL (2 mmol) de 2-acetilpiridina, dissolvidos em 10 mL de metanol, a uma solução de 0,216 g (2 mmol) de 1,2-fenilenodiamina dissolvidos em 10 mL de metanol. Após a homogenização do sistema, adicionou-se lentamente 2 mmol (0,741 g) de perclorato de cobre(II) dissolvidos em 10 mL de água desionizada, em seguida 0,068g (1 mmol) de imidazol. O pH desta reação foi controlada adicionando-se 1,5 mL de NaOH 1M (pH $\approx$ 9,40). Esta solução foi deixada sob agitação constante durante 8h à temperatura ambiente, quando se observou a formação de uma solução azul escuro e/ou negra. Resfriou-se o sistema lentamente, em banho de gelo, por aproximadamente 30 minutos. Filtrou-se o precipitado obtido, de coloração negra, lavou-se com metanol e éter dietílico gelados e finalmente secou-se em dessecador a vácuo. O rendimento obtido foi de 88%.

d) $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$

Adicionou-se sob agitação, 1,350g (5,7 mmol) do dicloridrato de N-benzil-1,3-propanodiamina a uma solução de 0,64 mL (5,7 mmol) de 2-acetilpiridina dissolvidos em 25 mL de metanol. Acertou-se o pH desta reação com adição de NaOH 1M (pH $\approx$ 9,80). Após a homogeneização do sistema, adicionou-se lentamente, 5,7 mmol (2,112 g) de perclorato de cobre(II) dissolvidos em 10 mL de água desionizada, em seguida 0,194g (2,85 mmol) de imidazol. Esta solução foi deixada sob agitação constante durante 15h à temperatura ambiente, quando se observou a formação de uma solução vermelho escuro. Resfriou-se o sistema lentamente, em banho de gelo, por aproximadamente 30 minutos. Filtrou-se o precipitado obtido, de coloração vermelho escuro, lavou-se com metanol e éter dietílico gelados e finalmente secou-se em dessecador a vácuo. O rendimento obtido foi de 68%.

e) $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$

Obteve-se este complexo tetranuclear realizando a reação segundo as mesmas condições descritas anteriormente para o composto $[\text{SECuImCuSE}]^+$, porém utilizando como material de partida o composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$. Obteve-se um rendimento de 87% e neste caso o complexo sintetizado apresentou uma coloração azul claro.

2.4 Aparelhagens e Técnicas Experimentais

2.4.1. Análise Elementar

As análises elementares foram realizadas pela Central Analítica do IQ-USP num ELEMENTAR ANALYZER CHN modelo 2400 da Perkin-Elmer, que permite a determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de 0,01%. A análise elementar do cobre foi realizada por espectrometria de emissão atômica, com fonte de plasma de argônio induzido, num instrumento ICP-AES-Spectroflame – Spectro, no laboratório da Profa. Elizabeth de Oliveira, no IQ-USP.

2.4.2. Medidas Potenciométricas

As medidas de pH foram efetuadas com um pHmetro Digimed, modelo DMPH-2, acoplado a um eletrodo de vidro combinado, da Analion ou da Ingold. Antes de qualquer medida de pH, o aparelho foi calibrado com soluções-tampão apropriadas.

2.4.3. Medidas de Susceptibilidade Magnética

As medidas de susceptibilidade magnética foram realizadas em uma balança CAHN, modelo DTL 7500, pelo método de Faraday e utilizando como padrão o composto tetra(tiocianato)cobaltato(II) de mercúrio, $[\text{HgCo}(\text{CNS})_4]$, com $\chi = 16,44 \times 10^{-6}$ unidades CGS/Gauss, a 20 °C e $\theta = +10^\circ$ [17]. Correções para o diamagnetismo foram feitas a partir de constantes de Pascal e o momento

magnético efetivo foi calculado a partir da equação: $\mu_{\text{ef}} = 2,828 (\chi_M \cdot T)^{1/2}$, onde χ_M é a susceptibilidade magnética por fórmula mínima.

2.4.4. Espectros de absorção na região do visível e do ultravioleta

As medidas de absorção na região do visível e do ultravioleta foram efetuadas num espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70, ou em um instrumento Hitachi, modelo U-2000. Foram empregadas celas usuais retangulares de quartzo de caminho óptico igual a 1,000 cm.

2.4.5. Espectros de absorção na região do infravermelho

As medidas na região do infravermelho foram realizadas em espectrômetro infravermelho BOMEM 3,0 com reflectância difusa, na região de 4000 a 200 cm^{-1} .

As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr anidro. O brometo de potássio foi previamente triturado e seco em estufa, à temperatura de 120 °C.

2.4.6. Espectros Raman

Os espectros Raman foram efetuadas num espectrômetro *Renishaw Ramascope* 3000 com detector CCD, equipado com um microscópio *Olympus BTH2* com objetiva de aumento de 80 vezes. Como radiação excitante utilizou-se a linha em 632,8 nm de um laser de He-Ne *Spectra Physic* modelo 127. Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Molecular do IQ – USP, em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Márcia A. Temperini.

2.4.7. Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Somente sistemas contendo eletrons isolados (desemparelhados) são ativos no espectro de EPR. Assim, radicais livres e íons de metais de transição são exemplos importantes de sistemas bioinorgânicos que podem ser estudados através desta técnica.

Os espectros EPR foram registrados em um espectrômetro EPR da BRUKER, modelo EMX, operando na banda X ($\nu=9,33$ GHz) com potência de 20 mW. Para registro dos espectros de adutos de radicais livres, através de uso do

captador de spin (DMPO), utilizou-se cela de quartzo achatada. Estas medidas foram feitas à temperatura ambiente, com amplitude de modulação de 1G, sendo a reação iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio à solução dos complexos de cobre, em tampão fosfato 50mM, a pH 8,00. As medidas referentes aos íons de cobre foram feitas tanto à temperatura ambiente (300K), como a baixa temperatura (77K), com amostras sólidas, em solução metanol / água (4:1, v/v) ou ainda em solução DMSO / H₂O 50%. Neste caso utilizou-se tubo de quartzo (Wilmad) de 4 mm de diâmetro interno, e ajustou-se a amplitude de modulação em 15G.

a) Método do Captador de Spin

A geração de radicais livres durante a reação dos compostos de cobre com peróxido de hidrogênio foi monitorada por ressonância paramagnética eletrônica que é uma técnica de espectroscopia para o estudo de moléculas e íons que contêm elétrons desemparelhados. O elétron está associado a dois estados de spin $\pm 1/2$, bem como o próton está associado a dois estados de spin nuclear, $I = \pm 1/2$. Em cada caso os dois estados de spin têm iguais energias, na ausência de um campo magnético. Se aplicada uma radiação eletromagnética adequada, ela será absorvida e usada para mudar o estado de energia do elétron devido ao desdobramento dos níveis de energia correspondentes ao momento magnético de spin, em presença de um campo magnético. A absorção de energia gera um espectro que normalmente é registrado na forma de 1ª. derivada. Uma absorção espectroscópica é obtida usualmente na região de microondas, no intervalo de 10^{12} a 10^{10} Hz. Este método é bastante sensível e pode, em condições favoráveis, detectar concentrações de radicais livres da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹, permitindo ainda a observação de espécies transitórias que não podem ser detectadas por outros processos.

A condição para a transição espectroscópica será dada pela equação:

$$h\nu = g \beta H$$

onde, h é a constante universal de Planck, ν a frequência da radiação, g é o fator giromagnético, β é a constante de magneton de Bohr e H o campo magnético estático.

Para interpretar os espectros EPR utilizam-se dois parâmetros. O fator g corresponde à absorção espectral de uma série magnética nas quais as linhas estão centradas e usualmente é 2,0023 para elétrons livres. A variação é muito pequena para radicais livres, íons dos metais de transição e outras espécies que contêm elétrons desemparelhados, mas não apresentam outros tipos de interação. O 2º parâmetro é o desdobramento hiperfino, que descreve a interação do elétron com núcleos magnéticos vizinhos. A constante magnética surge devido à mudança da força do campo magnético sofrida pelo elétron livre, resultante da influência magnética de núcleos nas proximidades. A complexidade do espectro EPR depende do nº e do tipo dos núcleos vizinhos. A unidade comumente usada para expressar o campo magnético em espectroscopia EPR é Gauss (G) ou Tesla (T) onde $10^{-4} \text{ T} = 1 \text{ G}$ ou $1 \text{ mT} = 10 \text{ G}$.

A maior limitação para a detecção e identificação direta de radicais livres é a baixa concentração dessas espécies e seu tempo de vida, em geral muito curto. Para obter espécies mais estáveis utiliza-se o método do captador de spin (spin trapping) [18]. Neste método, radicais livres com vida curta são quimicamente convertidos em radicais adutos mais estáveis. Esta é uma técnica indireta e portanto introduz uma perturbação no sistema em estudo. Não se detecta o radical primário e, muitas vezes, a estrutura deste não é facilmente deduzida a partir do espectro de EPR do radical aduto formado.

Os captadores mais usados pertencem em geral à função nitróxido, e formam adutos radicalares cujo elétron desemparelhado ocupa um orbital π^* entre o nitrogênio e o oxigênio, geralmente representado por um híbrido, indicado abaixo, sendo a delocalização eletrônica responsável pela estabilidade desses radicais:

O espectro EPR de nitróxidos é caracterizado por um largo desdobramento hiperfino devido ao nitrogênio (a_N), que é o resultado da interação do elétron livre com o momento magnético nuclear do nitrogênio ($I = 1$).

Os captadores também podem ser do tipo nitrona, representada abaixo, como por exemplo o fenil-terc-butil nitrona (PBN) e o 5, 5' dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), adequados para identificar radicais $RO^\bullet$ ($t\text{-BuO}^\bullet$, $\text{EtO}^\bullet$, $\text{MeO}^\bullet$, $\text{HO}^\bullet$).

Uma outra classe pode ser do tipo nitroso: como 2-metil-2-nitrosopropano (MNP), adequado para identificação do grupo $R^\bullet$ ($\text{Et}^\bullet$, $\text{Me}^\bullet$, fenil $^\bullet$, benzil $^\bullet$) cuja adição do radical se dá diretamente ao nitrogênio.

Entretanto, para obter um resultado significativo, o captador deve apresentar as seguintes características: ser inerte com todos os reagentes do sistema, exceto com o radical livre; a reação do captador de spin com o radical deve ser rápida para que sejam minimizados os efeitos de reações competitivas; os captadores de spin devem ter vida mais longa que as dos radicais livres iniciais, para que possam se facilmente detectados e, finalmente, os parâmetros EPR dos captadores devem ser sensíveis à natureza dos radicais a serem capturados.

A atividade *pró-oxidante* dos complexos de cobre em estudo foi investigada pela geração de radicais livres durante a reação com peróxido de hidrogênio. Estas espécies reativas foram monitoradas por ressonância paramagnética eletrônica (EPR), usando o 5,5'-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) como captador de radicais livres.

b) Espectroscopia EPR de Íons Metálicos

Medidas de EPR foram também realizadas com o composto sólido e em soluções congeladas metanol / água (4:1, v/v) ou DMSO / H_2O 50%, à temperatura de 77K (nitrogênio líquido). No caso dos metais de transição, a interpretação dos valores do parâmetro g , das constantes de interação hiperfina

(A), das constantes hiperfinas isotrópicas e da anisotropia espectral permite obter informações valiosas sobre a configuração eletrônica desses íons, seu estado de oxidação e suas características estruturais (distorções ao redor do íon) [19].

Os espectros de radicais livres em solução são isotrópicos, isto é, todas as interações anisotrópicas não são explicitadas, o espectro registrado corresponde a um espectro médio. Ao contrário, o espectro de um íon metálico pode refletir, especialmente a baixa temperatura, a anisotropia de sua estrutura com relação à orientação do campo magnético, dando informações sobre a simetria da ligação metal-ligante ou definindo a orientação de um dado ligante com relação ao resto da molécula ou íon complexo.

Desdobramento hiperfino

As linhas observadas num espectro EPR podem ser desdobradas pela interação do elétron paramagnético com núcleos vizinhos que apresentem momento magnético. Na **Tabela 1** têm-se alguns núcleos com momento magnético, de interesse bioinorgânico.

Tabela 1 - Principais núcleos com seus momentos magnéticos

Núcleos	Spin	Nº de linhas	Desdobramento (gauss)
^1H	$\frac{1}{2}$	2	0 - 6
^{14}N	1	3	0 - 20
^{19}F	$\frac{1}{2}$	2	0 - 30
^{63}Cu	$\frac{3}{2}$	4	20 - 200
^{65}Cu	$\frac{3}{2}$	4	20 - 200
^{95}Mo	$\frac{5}{2}$	6	40
^{97}Mo	$\frac{5}{2}$	6	40
^{55}Mn	$\frac{5}{2}$	6	95

Para os íons metálicos paramagnéticos, o desdobramento hiperfino dominante vem do núcleo do próprio íon metálico, sendo a chamada estrutura super-hiperfina, proveniente dos ligantes (especialmente com átomos N) muito

pequena. O espectro é usualmente complicado, porque ambos os valores de g e das constantes hiperfinas são anisotrópicos, isto é, valores diferentes, dependendo do eixo de simetria. Por exemplo, para o íon cobre ($I=3/2$) os sinais serão desdobrados em: $n = 2I + 1 = 4$ linhas; para o manganês (II), com $I=5/2$ em 6 linhas.

$$h\nu = g \beta H \pm 1/2 A m_l$$

onde: A = constante de desdobramento hiperfino

m_l = são vários valores de l (+1, 0, -1)

Anisotropia Espectral

Em muitos casos, as posições e os desdobramentos das linhas (especificados pelos valores de g e das constantes hiperfinas A) dependem da direção do campo magnético com relação aos eixos moleculares, isto é, da simetria molecular.

A anisotropia espectral é muito importante na interpretação dos espectros de íons dos metais de transição e usualmente é especificada por três valores de g e de A : A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} , g_{zz} , g_{xx} e g_{yy} . Em alguns casos o sistema molecular apresenta simetria axial e os valores são designados: $A_{||} = A_{zz}$ e $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$, e analogamente, $g_{||} = g_{zz}$ e $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$.

Para orientações intermediárias, os valores de g e de A dependem do ângulo que o campo magnético faz com os principais eixos. Se amostras de mono-cristais são disponíveis, estudos de orientação angular podem dar informações valiosas. Porém o mais usual é obter-se o espectro de pó policristalino. Neste caso o espectro apresenta todas as diferentes direções superpostas e um espectro complicado é observado, com linhas mais largas e distorcidas.

Muitas vezes, fatores empíricos são usados para determinar distorções das estruturas de compostos de coordenação. Por exemplo, a relação $g_{||} / A_{||}$ tem sido usada para caracterizar compostos miméticos da SOD (Superóxido Dismutase), como indicativos de distorções estruturais. Um valor entre 105 e 135 é atribuído a

uma estrutura próxima ao quadrado planar, enquanto um valor mais elevado, até 250, é indicativo de distorção tetraédrica apreciável numa estrutura tetragonal [20].

2.4.8. Método Manométrico - Atividade Catalásica

A cinética da reação de decomposição do H_2O_2 , catalisada por compostos de cobre, foi investigada através de medidas do oxigênio liberado, utilizando-se a técnica manométrica [21], visando estudar os equilíbrios do sistema. Para isso foi utilizado um aparelho respirômetro Warburg da B. Braun, modelo V85, com um agitador para garantir a perfeita e rápida troca entre gás e solução (135 oscilações por minuto). O frasco de reação acoplado a um manômetro capilar, conforme mostrado nas **Figuras 2 e 3**, foi mantido à temperatura de $(30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, num banho termostatzado.

Figura 2 - Respirômetro Warburg

Figura 3 - Esquema do sistema de reação: manômetro e frasco de reação

M - manômetro

R- frasco de reação

H - torneira

S - junta cônica pela qual o frasco é conectado ao manômetro

Utilizaram-se 0,30 mL de solução de H_2O_2 no braço lateral e 2,70 mL de solução do catalisador, no recipiente principal. Cada experimento foi efetuado pelo menos em duplicata, usualmente em tampão fosfato (50 mM) em vários pHs. O frasco de reação foi conectado ao manômetro e colocado por 10 minutos no banho termostatizado. O início da reação foi dado com a mistura dos dois reagentes, já saturados com oxigênio na temperatura de reação, e as leituras realizadas a intervalos de tempo adequados. A reação foi usualmente monitorada por um tempo total de 2 a 3 horas, medindo-se a pressão a volume e temperatura constantes. O funcionamento do sistema é bastante simples. Após o início da reação começa a ocorrer liberação de oxigênio no interior do frasco de reação, elevando o nível do líquido do manômetro. Para fazermos a leitura a volume constante retornamos o nível do líquido à sua posição original, com o auxílio de um parafuso conectado ao reservatório na parte de baixo do manômetro. Assim, a certos intervalos de tempo podemos ler a pressão interna do frasco em um dos capilares, sempre mantendo o volume constante, a partir da diferença de altura (h).

A partir desses resultados foi possível calcular a quantidade de oxigênio liberado, baseado na lei universal dos gases. Estes valores foram então representados em um gráfico de O_2 liberado ($\mu\text{mols O}_2/\text{L}$) versus tempo de reação (min). A partir dessas curvas foram obtidas as velocidades iniciais de reação [22], por métodos computacionais, verificando-se sua dependência com relação à concentração de cada um dos reagentes em um determinado pH. Este método leva a constantes de velocidades com precisão estimada de $\pm 3\%$ [23].

Análise do Peróxido de Hidrogênio

As soluções de peróxido de hidrogênio foram analisadas pelo método do vanadato, que é um método indireto e consiste na obtenção de um peroxo-complexo estável [24] de Vanádio (V), do tipo $\text{VO}(\text{O}_2)^+$, de coloração avermelhada. Esta espécie é resultante da adição de soluções de peróxido de hidrogênio a uma solução de Vanádio (V) (0,04 M) em meio fortemente ácido (H_2SO_4 - 0,5 M):

A análise é feita espectrofotometricamente, com $\lambda_{\text{Máx.}}$ entre 450 e 460 nm e $\varepsilon = 360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O espectro característico desta espécie é apresentado na figura abaixo:

Figura 4 - Espectro de absorção da espécie $[\text{VO}(\text{O}_2)^+]$

$\lambda_{\text{Máx.}} = 453 \text{ nm}$ e $\varepsilon = 360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.4.9. Eletroforese Capilar

A análise do perfil eletroforético do composto mononuclear $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, foi feita utilizando um equipamento para eletroforese capilar, modelo P/ACE 5510 da Beckman Instruments, equipado com fonte de alta tensão (0-30 kV), detector do tipo *diode array*, para obtenção do espectro UV em tempo real. O sistema possui controlador de temperatura e programa de aquisição e tratamento de dados System Gold software. Capilar de sílica fundida foi utilizado na análise, com dimensões de 75 μm de diâmetro interno, 375 μm de diâmetro externo e 50

cm de comprimento (até o detector), sendo montado em um cartucho. Durante a eletroforese, o capilar foi mantido à temperatura de 25 °C, com a circulação de um líquido (refrigerante) ao redor do capilar. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente com pressão de 0,5 Psi. A injeção eletrocinética foi feita utilizando voltagem de 20 kV. A detecção foi realizada espectrofotometricamente a 214 nm. Estas medidas foram realizadas no laboratório da Prof^a. Marina Maggi Tavares, no IQ-USP.

2.4.10. Condutividade Molar

As medidas de condutividade foram realizadas num condutivímetro da marca Digimed, modelo DM 31. Utilizou-se a solução de cloreto de potássio 10 mM como solução padrão de referência, com condutância específica de 1412,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a 25 °C. As soluções contendo as amostras apresentavam concentração de $1,00 \times 10^{-3}$ M.

A condutância de uma solução resulta da soma das contribuições de todos os íons presentes. Embora todos os íons presentes contribuam para a condução da corrente, a fração da corrente transportada por uma dada espécie iônica depende de sua concentração relativa e da facilidade com que se movimenta no meio. Portanto, a condutância específica de um eletrólito varia com a concentração. No caso de um eletrólito forte, a condutância específica aumenta marcadamente com a concentração. Em contrapartida, as condutâncias específicas de eletrólitos fracos aumentam muito gradualmente. Em ambos os casos, o aumento da condutância é devido ao incremento do número de íons por unidade de volume da solução.

Portanto, a medida de condutividade é utilizada na determinação da quantidade e/ou proporção de espécies iônicas presentes em solução [51].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização

3.1.1. Análise Elementar

Os compostos de cobre(II) sintetizados foram caracterizados através da análise elementar do C, H, N e análise de cobre, cujos resultados estão listados na **Tabela 2**:

Tabela 2 – Resultados da Análise Elementar para os Compostos de Cobre(II)

Compostos (na forma de sais percloratos)	%C	%H	%N	%Cu
$[\text{SECuImH}](\text{ClO}_4)$ $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{OCu}(\text{ClO}_4)$; MM= 394,27 g/mol	37,58 36,56*	3,85 3,83*	13,92 14,21*	16,13 16,10*
$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}](\text{ClO}_4)_2$ $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$; MM= 555,81 g/mol	36,82 36,73*	3,45 3,44*	12,50 12,60*	11,85 11,43*
$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}](\text{ClO}_4)$ $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{OCu}(\text{ClO}_4)$; MM= 405,33 g/mol	41,13 41,48*	3,95 3,99*	11,43 10,37*	15,47 15,68*
$[\text{SECuImCuSE}](\text{ClO}_4)$ $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_2\text{Cu}_2(\text{ClO}_4)$; MM= 620,01 g/mol	39,69 40,68*	3,73 4,06*	13,63 13,55*	20,56 20,50*
$[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}](\text{ClO}_4)_3$ • H_2O $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{OCu}_2(\text{ClO}_4)_3$; MM= 961,12 g/mol	38,28 38,74*	3,75 3,67*	11,37 11,65*	12,76 13,21*
$[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4](\text{ClO}_4)_4$ • 2 H_2O $\text{C}_{68}\text{H}_{76}\text{N}_{20}\text{O}_2\text{Cu}_4(\text{ClO}_4)_4$; MM= 1857,44 g/mol	41,43 43,97*	3,87 4,12*	13,42 15,08*	13,45 13,68*
$[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}](\text{ClO}_4)_3$ $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{N}_8\text{Cu}_2(\text{ClO}_4)_3$; MM= 1027,27 g/mol	45,03 43,26*	4,16 4,41*	11,23 10,90*	----- 12,36*
$[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}](\text{ClO}_4)_3$ $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_8\text{Cu}_2(\text{ClO}_4)_3$; MM= 915,05 g/mol	39,27 38,06*	3,78 3,19*	11,82 12,24*	----- 13,88*

valores calculados (teórico)

Analisando-se os dados contidos na **Tabela 2**, observa-se que os valores experimentais são bem próximos dos valores calculados, indicando que os complexos sintetizados correspondem às estruturas propostas.

Os compostos $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+} \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$ são pouco solúveis em água, porém são solúveis em dimetilsulfóxido, dimetilformamida e metanol. Os demais são bem solúveis em água e metanol.

3.1.2. Espectros Eletrônicos

Os espectros na região do ultravioleta-visível dos complexos mono-, di- e tetranucleares de cobre foram registrados em solução aquosa, DMSO / água (1:1, v/v) e/ou DMF, na mesma faixa de concentração para fins comparativos, nas regiões entre 190 - 800 nm. As **Figuras 5 a 20** mostram os espectros eletrônicos dos complexos sintetizados, na região do ultravioleta e do visível. Os parâmetros espectrais bem como as atribuições das bandas de absorção encontram-se na **Tabela 3**.

As bandas de absorção mais intensas, situadas na região do ultravioleta, estão relacionadas com as transições internas dos ligantes, IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$). As bandas que aparecem na região do UV-próximo/ Visível, estão relacionadas às transições de transferência de carga do ligante para o metal, LMCT ($\pi \rightarrow d\pi$) e uma outra transição, porém menos intensa, na região do visível, é atribuída à transição d-d.

As transições internas nos ligantes N-heterocíclicos são aquelas que envolvem o par de elétrons do nitrogênio para o orbital π antiligante (π^*) de energia mais baixa ($n \rightarrow \pi^*$) e as transições do orbital ligante preenchido de energia mais alta para o orbital π^* ($\pi \rightarrow \pi^*$). As transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ são de baixa intensidade e freqüentemente aparecem encobertas [25]. As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ que ocorrem nos anéis heteroaromáticos, como por exemplo na piridina, imidazol, são pouco afetadas nos complexos e aparecem na mesma região do ligante livre [26-27].

As transições do tipo LMCT envolvem uma transição $\pi \rightarrow d\pi$ na qual elétrons de um orbital ocupado predominantemente localizado no ligante, π , são

excitados para um orbital vazio, de caráter $d\pi$, localizado no metal. A excitação LMCT resulta então numa oxidação virtual do ligante com uma concomitante redução do átomo metálico, conforme o esquema representado a seguir, em que A_n é um ligante não envolvido diretamente no processo de transferência de carga.

As transições eletrônicas do tipo LMCT são comumente encontradas na maioria dos metais com alto estado de oxidação e ligantes doadores de elétrons. Essas bandas são totalmente permitidas e se caracterizam por intensas absorções na região espectral do visível e UV próximo [26].

A banda de absorção que aparece na região do visível (em torno de 630 nm), menos intensa, é atribuída à transição d-d. Os complexos de cobre(II) cuja configuração é d^9 apresentam invariavelmente uma geometria octaédrica com distorção tetragonal. Esse fato é consequência do princípio de Jahn Teller [28], que prevê a perda de degenerescência para sistemas não lineares, sempre que ocorrer ganho de energia. Em virtude do efeito de Jahn Teller, os complexos de cobre(II) apresentam os ligantes axiais bastante afastados, convertendo-se com facilidade em estruturas planares. A distorção axial dificulta, por outro lado, a entrada de um terceiro ligante quelato em complexos com anéis de 5 membros, por exemplo. No entanto, a estabilização proporcionada pelo efeito Jahn Teller favorece, a coordenação no plano xy [29].

Tabela 3 – Parâmetros Espectrais na Região do UV-Visível para os Complexos de Cobre(II) em Solução Aquosa, DMSO / H₂O (1:1, v/v) e/ou ***DMF.

Compostos	$\lambda_{M\acute{a}x.}(nm)$ (ϵ , $10^3 M^{-1} cm^{-1}$)		$\lambda_{M\acute{a}x.}(nm)$ (ϵ , $M^{-1} cm^{-1}$)	$\lambda_{M\acute{a}x.}(nm)$ (ϵ , $M^{-1} cm^{-1}$)
	$n \rightarrow \pi$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (H ₂ O)		$\pi \rightarrow d\pi$ (LMCT) (H ₂ O)	$d \rightarrow d$ DMSO / H ₂ O (1:1, v/v)
[SECuImH] ⁺	196 (17,3); 216 (21,2); 235 (21,2); 263 (11,1)		350 (4,4)	613 (100)
[Cu(apy-epy)ImH] ²⁺	203 (29,8); 254 (8,6); 282 (7,8)		No	636 (68)
[Cu(apy-epy)OH] ⁺	202 (18,2); 264 (5,45); 284 (3,80)		No	650 (56)
[SECuImCuSE] ⁺	196 (30,0); 216 (33,0); 235 (37,5); 263 (20,3)		350 (7,9)	605 (189)
[Cu ₂ (apy-epy) ₂ Im] ³⁺	200 (59,6); 254 (17,5); 282 (15,5)		No	630 (137)
[Cu ₄ (apy-epy) ₄ (Im) ₄] ³⁺	200 (59,7); 254 (17,4); 282 (15,2)		No	624 (158)
[Cu ₂ (apy-bz) ₂ Im] ³⁺	*** 268 (22,7)		*** 382 (5,9)	No
[Cu ₂ (apy-fen) ₂ Im] ³⁺	*** 268 (29,4); 334 (19,1)		*** 430 (8,7)	No

Sendo: No – Não observada

Figura 5- Espectros no Intervalo 190-400 nm do composto [SECulmH]⁺ em meio aquoso, a variadas concentrações. [CuL] (10⁻⁴ M) = A) 1,000; B) 0,800; C) 0,600; D) 0,400.

Figura 6- Espectros no Intervalo 400-800 nm do composto [SECulmH]⁺ em meio aquoso, a variadas concentrações. [CuL] (10⁻³ M) = A) 1,000; B) 0,800; C) 0,600; D) 0,400

Figura 7- Espectros no Intervalo 190-400 nm do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ em meio aquoso, a variadas concentrações. $[\text{CuL}]$ (10^{-4} M) = A) 0,600; B) 0,500; C) 0,400; D) 0,300; E) 0,200.

Figura 8- Espectros no Intervalo 320-800 nm do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ em meio aquoso, a variadas concentrações. $[\text{CuL}]$ (10^{-3} M) = A) 1,000; B) 0,800; C) 0,600; D) 0,400; E) 0,200.

Figura 9 – Espectros no Intervalo 190-400 nm do composto $[Cu(apv-epy)OH]^+$ em meio aquoso, a variadas concentrações. $[CuL]$ (10^{-4} M) = A) 0,600; B) 0,498; C) 0,402; D) 0,300; E) 0,198.

Figura 10 – Espectros no Intervalo 400-800 nm do composto $[Cu(apv-epy)OH]^+$ em meio aquoso, a variadas concentrações. $[CuL]$ (10^{-3} M) = A) 1,000; B) 0,800; C) 0,600; D) 0,400; E) 0,200.

Figura 11- Espectros no Intervalo 190-400 nm do composto $[\text{SECulmCuSE}]^+$ em meio aquoso, a variadas concentrações. $[\text{CuL}]$ (10^{-4} M) = A) 0,800; B) 0,600; C) 0,400; D) 0,300; E) 0,200.

Figura 12- Espectros no Intervalo 400-800 nm do composto $[\text{SECulmCuSE}]^+$ em meio aquoso, a variadas concentrações. $[\text{CuL}]$ (10^{-3} M) = A) 1,000; B) 0,800; C) 0,600; D) 0,400; E) 0,200.

Figura 13 – Espectros no Intervalo 190-320 nm do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{lm}]^{3+}$ em meio aquoso, a variadas concentrações. $[\text{CuL}] (10^{-4} \text{ M}) = \text{A}) 0,400; \text{B}) 0,300; \text{C}) 0,200; \text{D}) 0,100$.

Figura 14 – Espectros no Intervalo 320-800 nm do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{lm}]^{3+}$ em meio aquoso, a variadas concentrações. $[\text{CuL}] (10^{-3} \text{ M}) = \text{A}) 1,000; \text{B}) 0,800; \text{C}) 0,600; \text{D}) 0,400$.

Figura 15- Espectros no Intervalo 190-320 nm do composto $[\text{Cu}_4(\text{apv-epy})_4(\text{lm})_4]^{4+}$ em meio aquoso, a variadas concentrações. $[\text{CuL}] (10^{-4} \text{ M}) = \text{A}) 0,300; \text{B}) 0,200; \text{C}) 0,180; \text{D}) 0,120; \text{E}) 0,040$.

Figura 16- Espectros no Intervalo 320-800 nm do composto $[\text{Cu}_4(\text{apv-epy})_4(\text{lm})_4]^{4+}$ em meio aquoso, a variadas concentrações. $[\text{CuL}] (10^{-3} \text{ M}) = \text{A}) 1,000; \text{B}) 0,800; \text{C}) 0,600; \text{D}) 0,400; \text{E}) 0,200$.

Figura 17 – Espectros no Intervalo 190-800 nm do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$ em DMF, a variadas concentrações. $[\text{CuL}]$ (10^{-4} M) = A) 0,800; B) 0,600; C) 0,400; D) 0,200.

Figura 18 – Espectros no Intervalo 290-800 nm do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$ em DMF, a variadas concentrações. $[\text{CuL}]$ (10^{-3} M) = A) 0,200; B) 0,160; C) 0,120; D) 0,080.

Figura 19 – Espectros no Intervalo 190-800 nm do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$ em DMF, a variadas concentrações. $[\text{CuL}] (10^{-4} \text{ M}) = \text{A}) 0,50; \text{B}) 0,400; \text{C}) 0,300; \text{D}) 0,200; \text{E}) 0,100$.

Em solução aquosa os complexos mononucleares e os correspondentes dinucleares e tetranuclear, apresentaram, espectros eletrônicos similares, embora a banda d-d para os mononucleares ocorra a comprimentos de onda cerca de 10 nm maiores.

Tais complexos monoméricos apresentam o ligante imidazol na forma de espécie protonada sob condições ácidas, enquanto que em condições básicas, com deprotonação no átomo de nitrogênio, o imidazol pode funcionar como um ligante ponte e se coordenar a um outro íon de cobre(II), desde que este complexo tenha uma vacância ou um ligante lábil [30-32].

3.1.3. Espectroscopia Vibracional

a) Análise de Espectros na Região do Infravermelho

Os espectros vibracionais dos compostos sintetizados foram registrados num intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , a partir de pastilhas preparadas por homogeneização e prensagem do composto de cobre(II) (~1,5 mg) com brometo de potássio anidro (~200 mg). As atribuições foram realizadas de maneira comparativa, com compostos semelhantes descritos na literatura, e estão listadas na **Tabela 4**.

Tabela 4- Principais bandas no IV (cm^{-1}) dos compostos mononucleares e dinucleares de cobre (II)

Compostos	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$ + $\nu(\text{C}=\text{C})$ (anel)	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{ClO}_4^-)$ $\delta(\text{ClO}_4^-)$	$\nu(\text{NH}_2)$ ou $\nu(\text{N-H})$
$[\text{SECuImH}]^+$	3432 (w)	1480 (s)	1642 (s)	1088 (s) 630 (m)	3319 (w) 3268 (w)
$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$	3490 (w)	1490 (s)	1636 (m)	1094 (s) 624 (m)	3425 (w)
$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$	3443 (s)	1480 (s)	1642 (m)	1088 (s) 630 (m)	-----
$[\text{SECuImCuSE}]^+$	3439 (w)	1480 (s)	1642 (s)	1088 (s) 630 (m)	3319 (w) 3272 (w)
$[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$	3443 (s)	1485 (m)	1643 (m)	1091 (s) 626 (m)	-----
$[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{3+}$	3441 (s)	1490 (s)	1636 (m)	1094 (s) 624 (m)	-----
$[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$	3440 (s)	1454 (m)	1625 (m)	1091 (s) 626 (m)	3135 (w)
$[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$	-----	1489 (m)	1625 (m)	1088 (s) 631 (m)	3429 (s) 3250 (w)

ν = estiramento, δ = deformação no plano.
Intensidades: (s) forte; (m) médio; (w) fraco.

Para alguns complexos mononucleares, dinucleares e tetranuclear sintetizados (vide **Tabela 4**), observou-se uma banda em torno de 3440 cm^{-1} de intensidade forte, atribuída ao estiramento do grupo -OH.

Em todos os complexos de cobre sintetizados foram observadas diversas bandas referentes aos estiramentos C-H de CH, CH₂ e CH₃ alifáticos e CH aromáticos na região de $3070 - 2921\text{ cm}^{-1}$.

Entre $1672 - 1600\text{ cm}^{-1}$, bandas referentes aos estiramentos do grupo C=N nos complexos podem aparecer deslocadas para frequências menores, com relação ao ligante livre [33]. Esse deslocamento pode ser atribuído ao fato de haver ocorrido uma diminuição na ordem da ligação carbono – nitrogênio. Esses deslocamentos variam de $30 - 40\text{ cm}^{-1}$, com relação aos ligantes livres. A diminuição pode também ser atribuída, pelo fato do nitrogênio ser um dos pontos coordenantes [34-35].

Entre $1565 - 1526\text{ cm}^{-1}$, foram observadas bandas referentes as vibrações de estiramento C=C aromáticos, que podem aparecer nos complexos deslocadas para frequências maiores ou menores, com relação ao ligante livre [36].

Na região de $1398 - 1319\text{ cm}^{-1}$, aparecem bandas associadas aos estiramentos C-N, que nos respectivos complexos, podem apresentar um pequeno deslocamento, o que mostra mais uma vez que o nitrogênio é um dos pontos coordenantes.

As bandas situadas em torno de 1090 cm^{-1} e 630 cm^{-1} podem ser atribuídas ao ânion perclorato, revelando que este não está coordenado ao Cu(II), indicando portanto seu caráter iônico nos compostos estudados [37-38].

Entre $993 - 738\text{ cm}^{-1}$ são encontradas várias bandas que podem ser atribuídas às deformações angulares de C-H das ligações alifáticas e deformação angular fora do plano de C-H aromático.

As bandas referentes as ligações Cu-N_{alifática} aparecem na região de $460 - 440\text{ cm}^{-1}$; e as bandas atribuídas as ligações Cu-N_{anel} aparecem na região de $280 - 208\text{ cm}^{-1}$ [38-41]. Cabe ressaltar que na região abaixo de 400 cm^{-1} por limitação do aparelho, estes valores não podem ser atribuídos precisamente. Para os

estudos realizados nesta região recorreu-se a técnica Raman que permitiu observar os estiramentos Cu-N_{anel} mais precisamente.

Entre 597 – 543 cm⁻¹ aparecem bandas que podem ser atribuídas a deformação angular C-H no plano, e as bandas relacionadas à deformação angular fora do plano aparecem na região de 486 – 405 cm⁻¹.

Realizou-se uma comparação dos espectros na região do infravermelho, das espécies: [Cu(apv-epy)OH]⁺, [Cu(apv-epy)ImH]²⁺, [Cu₂(apv-epy)₂Im]³⁺ e [Cu₄(apv-epy)₄(Im)₄]⁴⁺ com o intuito de complementar a caracterização dos mesmos (vide **Figura 20**).

Figura 20 – Espectros comparativos na região do infravermelho. Compostos: [Cu(apv-epy)OH]⁺, [Cu(apv-epy)ImH]²⁺, [Cu₂(apv-epy)₂Im]³⁺ e [Cu₄(apv-epy)₄(Im)₄]⁴⁺.

Os heteroaromáticos contendo um grupo N-H apresentam deformação axial de N-H na região de 3220 – 3500 cm⁻¹ [42].

Para o complexo sintetizado [Cu(apv-epy)ImH]²⁺, observou-se bandas em torno de 3300 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento N-H característico do anel imidazol

[43], porém aparece parcialmente encoberta devido ao estiramento –OH presente nessa região. As demais bandas relacionadas na **Figura 20** são características dos compostos tipo base de Schiff (vide **Tabela 4**), sendo que as bandas em torno de 3440 cm^{-1} podem ser atribuídas ao íon hidroxila e à molécula de água presentes nos complexos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$, $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$, na primeira e/ou segunda esfera de coordenação.

Por outro lado, para os complexos mononucleares (vide **Figuras 20 e 21**), observou-se uma banda a 1143 cm^{-1} atribuída a deformação angular N-H no plano característica do anel imidazol [44]. Nas espécies dinucleares e tetranuclear esta banda tem intensidade substancialmente diminuída (intensidades relativas menores).

Realizou-se também uma comparação dos espectros na região do infravermelho, dos complexos: $[\text{SECuImH}]^+$ e $[\text{SECuImCuSE}]^+$ (vide a **Figura 21**).

Figura 21 – Espectro comparativo na região do infravermelho. Compostos: $[\text{SECuImH}]^+$ e $[\text{SECuImCuSE}]^+$.

Estes compostos $[\text{SECuImH}]^+$ e $[\text{SECuImCuSE}]^+$, apresentam nesta mesma região de $3220 - 3500 \text{ cm}^{-1}$, banda característica N-H de heteroaromáticos, estiramento simétrico e assimétrico da ligação NH_2 da cadeia alifática, dificultando assim a caracterização dos compostos mono- e dinuclear.

As demais bandas relacionadas na **Figura 21** foram atribuídas também de maneira comparativa, com compostos semelhantes descritos na literatura.

b) Espectros Raman

Os espectros vibracionais dos complexos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$, $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ foram obtidos através de cela rotatória de teflon, para evitar decomposição, utilizando um tempo de aquisição de 5 segundos com diferentes acumulações. Como radiação excitante utilizou-se a linha em $632,8 \text{ nm}$ de um laser de He-Ne com filtro 0,3. Os espectros Raman são mostrados nas **Figuras 22 a 24**.

Figura 22 – Espectros vibracionais Raman dos complexos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$.

Os espectros vibracionais dos complexos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ são aparentemente análogos no que diz respeito às frequências e intensidades relativas. Como podemos observar, o que diferencia os três complexos são bandas atribuídas aos estiramentos vibracionais Cu-ligante. No espectro Raman do complexo $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, **Figura 22**, os modos encontrados em torno de 215 (*) e 265 cm^{-1} são atribuídos ao estiramento Cu- N_{ImH} e Cu- N_{py} [38], respectivamente.

Figura 22A – Espectros vibracionais Raman dos complexos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$.

Duas bandas de absorção na região característica do estiramento Cu- N_{ImH} , em 195 e 215 cm^{-1} , são observadas nos espectros Raman dos complexos $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$, vide **Figura 22A**. Essas duas bandas estão relacionados ao tipo de nitrogênio, do anel imidazólico, coordenado ao Cu(II). A

Na região de 2000 – 4000 cm^{-1} , foram observadas bandas significativas para o complexo mononuclear $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, **Figuras 23 e 24**.

Figura 23 – Espectros vibracionais Raman dos complexos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$, $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$.

Figura 24 – Espectros vibracionais Raman dos complexos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2(\text{Im})]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$.

Para o complexo mononuclear $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ (vide **Figuras 23 e 24**), observou-se bandas em 2914, 2950, 3000, 3091, 3152 e 3175 cm^{-1} , referentes aos estiramentos N-H, CH_2 e CH_3 alifáticos e C-H aromáticos. Particularmente, bandas fortes na região em torno de 3152 e 3175 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento vibracional da ligação N-H característica do anel imidazol [46], que pode ser monitorada na formação dos complexos di- e tetranuclear. Esta técnica permitiu avaliar com maior precisão o estiramento N-H, uma vez que o estiramento –OH apresenta-se fraca nesta região, contrariamente à técnica do infravermelho, anteriormente descrita.

Utilizou-se o complexo mononuclear $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$, cuja estrutura não apresenta o anel imidazólico, para ajudar na caracterização desta série em estudo (**Figura 23**). O seu comportamento espectral nesta região pode ser considerado análogo ao di- e ao tetranuclear, em virtude da ausência do estiramento N-H,

correspondente ao anel imidazólico, corroborando na existência destas espécies estudadas.

Alguns compostos com ligantes imínicos similares aos dos complexos estudados, citados na literatura [38], forneceram os seguintes conjuntos de dados correspondentes as ligações visíveis no espectro Raman: $\nu(\text{Cu-NH}_{2(\text{alifático})})$, 485, 404 cm^{-1} ; $\nu(\text{Cu-O})$, 350 cm^{-1} ; $\nu(\text{Cu-N}_{\text{imH}})$, 210-250 cm^{-1} ; $\nu(\text{Cu-N}_{\text{Shiff}})$, 480-520 cm^{-1} , $\nu(\text{Cu-N}_{\text{py}})$, 268 cm^{-1} ; $\nu(\text{ClO}_4^-)$, 459, 625, 928 cm^{-1} .

3.1.4. Medidas de Susceptibilidade Magnética

Medidas da susceptibilidade magnética dos compostos de cobre(II) sintetizados foram realizadas utilizando-se o método de Faraday, visando determinar o número de elétrons desemparelhados e obter informações sobre a estrutura mais provável dos complexos. As medidas foram feitas utilizando o composto $[\text{HgCo}(\text{CNS})_4]$ como padrão, à temperatura de $(22,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ ($T = 295\text{ K}$) [47].

Uma vez determinada a susceptibilidade magnética por unidade de massa, calculou-se a susceptibilidade magnética molar (K) de cada composto estudado. Em seguida, determinou-se o valor da susceptibilidade paramagnética do íon metálico central (κ), considerando-se as contribuições diamagnéticas de todas as espécies presentes nos compostos, como ligantes, contra-íons, água de hidratação e/ou solvente na segunda esfera de coordenação.

A partir desse valor calculado para κ , calculou-se o momento magnético efetivo (μ_{ef}) e através deste determinou-se o número de elétrons desemparelhados (n), considerando-se apenas a contribuição de spin, conforme a expressão abaixo:

$$\mu_{\text{ef}} = 2,84 \cdot (\kappa \cdot T)^{1/2} = [n(n+2)]^{1/2}$$

Os resultados obtidos para todos complexos mono- , di- e tetranuclear estão listados na **Tabela 5** abaixo:

Tabela 5 – Valores do μ_{ef} e n à 295 K para os complexos mononucleares e dinucleares

Compostos	μ_{ef} (M.B.)	n
$[\text{SECuImH}]^+$	1,78	1,05
$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$	1,90	1,14
$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$	2,10	1,30
$[\text{SECuImCuSE}]^+$	1,35	0,70
$[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$	1,88	1,13
$[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$	1,59	0,88
$[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$	1,85	1,10
$[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$	1,80	1,05

Através dos dados da **Tabela 5** verifica-se que as espécies di- e tetranuclear apresentam μ_{ef} menores do que os correspondentes mononucleares.

Na literatura o valor esperado para um composto mononuclear de cobre(II) com configuração d^9 , numa estrutura tetraédrica perfeita é de 1,73 M.B. [48] e para um composto numa estrutura tetragonal perfeita é de 2,83 M.B. [17], considerando apenas o spin. A espécie tetranuclear $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ possui número de coordenação igual a 5, conseqüentemente a geometria esperada para este composto corresponde a uma pirâmide de base quadrada ou uma bipirâmide trigonal. Logo, podemos observar através dos dados da **Tabela 5**, que as medidas de susceptibilidade magnética, indicam um pequeno acoplamento antiferromagnético entre os compostos di- e tetranuclear de cobre(II), favorecida pela proximidade entre os dois íons metálicos. Cálculos estimativos, feitos com o programa Hyperchem indicaram uma distância Cu-Cu de 5,4 Å ou 54 pm nestes compostos estudados. Na tirosinase essa distância é de 3,4 Å ou 34 pm [3].

Dados na literatura mostram que alguns compostos similares, apresentam o momento magnético efetivo próximos aos valores obtidos para os compostos em estudo, como o complexo $[(\text{TMDT})_2\text{Cu}_2(\text{Im})(\text{ClO}_4)_2](\text{ClO}_4)$, onde TMDT é o ligante 1,1,7,7-tetrametildietilenotriamino, com $\mu_{\text{ef}} = 1,78$ M.B. [49] e o $[\text{Cu}(\text{L}^2)]_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, onde L^2 é o ligante N, N' – bis (2-metil-imidazol-4-metilideno)-1,4-diaminobutano, com $\mu_{\text{ef}} = 1,58$ M.B [46].

3.1.5. Condutividade Molar

As medidas de condutividade molar são utilizadas na determinação da quantidade e/ou proporção de espécies iônicas, contra-íons, presentes em solução.

Medida da condutividade: Para medir a condutividade de uma solução, ela é colocada numa célula que dispõe de um par de eletrodos de platina firmemente fixados numa posição. Em geral, é muito difícil medir com precisão a área dos eletrodos e o afastamento entre eles, de modo que quando se desejam valores exatos da condutividade, é necessário determinar a constante da célula mediante a calibração com uma solução cuja condutividade seja conhecida com exatidão; por exemplo, soluções de cloreto de potássio.

As medições se fazem pela ligação da célula a um medidor de condutividade que fornece à célula uma corrente alternada com a frequência da ordem de 1000 Hz. Com a corrente alternada fica reduzida a possibilidade de eletrólise, que provocaria a polarização dos eletrodos; a corrente alternada, porém introduz a complicação de a célula ter uma capacitância além da resistência. Os condutímetro modernos têm um circuito eletrônico apropriado que elimina os efeitos da capacitância e podem medir um intervalo amplo de condutividade (p. ex., de $0,001 \mu\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a $1300 \text{ m}\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$), com dispositivo de escolha automática do intervalo de medida. Mediante a operação de um dispositivo de calibração, o instrumento é ajustado de modo que o valor da constante da célula usada aparece no painel digital que registra os valores da condutividade. Ao medidor também fica acoplado um sensor de temperatura; este sensor corrige, automaticamente, as medições de condutividade, efetuadas num certo intervalo de temperatura, ao valor a 25°C , que é a temperatura na qual o aparelho está calibrado. A célula de condutividade limpa é lavada com a própria solução e depois cheia com a solução; o resultado da medida é imediatamente registrado no painel [50].

Utilizou-se a solução de cloreto de potássio 10 mM como solução padrão de referência; esta apresentou uma condutância específica de $1412,0 \mu\text{S/cm}$ a 25°C .

Logo, a constante da célula determinada era igual a $1,32 \text{ cm}^{-1}$. Em seguida, preparou-se soluções contendo as amostras de concentração de $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$.

A condutividade molar (Λ_M) de um eletrólito se define como a condutividade devida a um mol e é dada por:

$$\Lambda_M = 1000 k / c = k 1000 V$$

onde c é a concentração da solução em mol.L^{-1} e V é a diluição em L (i.e, o número de litros que contêm um mol). Evidentemente, uma vez que k tem as dimensões $\text{S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$, ou em unidades SI, $\text{S.m}^2.\text{mol}^{-1}$.

Os resultados obtidos para todos complexos mono-, di- e tetranuclear estão listados na **Tabela 6** abaixo:

Tabela 6 – Valores obtidos para a condutividade molar à 25 °C.

Compostos	$\Lambda_M (\text{S.cm}^2.\text{mol}^{-1})$
$[\text{SECuImH}]^+$	109,2
$[\text{SECuImCuSE}]^+$	138,1
$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$	129,4
$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$	238,0
$[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$	339,0
$[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$	558,0
$[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$	172,0*
$[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$	198,1*

* Solubilizado em DMF.

Dados na literatura mostram que alguns compostos similares, apresentam condutividade molar próximo aos valores obtidos para os compostos em estudo, como o complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^1)](\text{NO}_3)_2$ (**1:2**), onde L^1 é o ligante N, N' – bis (imidazol-4-metilideno)-1,4-diaminobutano, cuja estrutura encontra-se abaixo representado, com $\Lambda_M(\text{H}_2\text{O}) = 207 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$ e o $[\text{Cu}(\text{L}^2)]_4 (\text{NO}_3)_2\text{Cl}_2 \cdot 1,25\text{H}_2\text{O}$ (**1:4**), onde L^2 é o ligante N, N' – bis (2-metil-imidazol-4- metilideno)-1,4-diaminobutano, com $\Lambda_M(\text{H}_2\text{O}) = 109 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$ por íons de cobre(II) [46].

Devido ao fato destes dois últimos complexos: $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$, serem pouco solúveis em solução aquosa, realizamos as medidas de condutividade em solvente orgânico, tal como DMF. Os valores obtidos foram comparados com os da literatura [51], verificando-se que também nestes casos houve uma correlação entre a proporção dos eletrólitos envolvidos na solução (**1:3**) com a estrutura proposta para estes compostos.

3.1.6. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica

A ressonância do spin do elétron (ESR), ou ressonância paramagnética do elétron (EPR), permite a investigação de moléculas ou íons com elétrons não-emparelhados, feita pela observação dos campos magnéticos que propiciam a ressonância na presença de radiação eletromagnética monocromática. Os campos magnéticos usados são da ordem de $0,3 \times 10^4$ G (0,3 T) e correspondem a ressonâncias com campos eletromagnéticos de frequência de 10 GHz (10^{10} Hz) e comprimento de onda de 3 cm. Como esta radiação de 3 cm está na banda X da região de microondas, o EPR é uma técnica de microondas. O espectro de EPR é obtido pelo registro da absorção das microondas em função do campo. A amostra deve ter elétrons com spins não-emparelhados. A espectroscopia EPR é adequada para investigar radicais livres formados durante reações químicas ou por efeito de radiação, para estudar muitos complexos dos metais de transição *d* e moléculas nos estados de tripleto. A técnica é insensível a moléculas normais, com spins emparelhados [52].

No caso dos metais de transição, a interpretação dos valores do parâmetro *g*, das constantes de interação hiperfina (*A*), das constantes hiperfinas isotrópicas

e a anisotropia espectral, permitem obter informações valiosas sobre a configuração eletrônica desses íons, seu estado de oxidação e suas características estruturais, como distorções ao redor do íon, por exemplo [53].

Visando obter maiores informações sobre a simetria ao redor do cobre, prepararam-se soluções dos complexos em DMSO / água (1:1, v/v), DMF ou MeOH / água (4:1, v/v), registrando os respectivos espectros, à temperatura de 77 K. Neste caso, tanto os compostos mono-, di- e tetranuclear apresentaram estruturas hiperfinas, devido ao acoplamento spin eletrônico – spin nuclear do próprio cobre(II) ($I = 3/2$) na região ~ 3100 G ($g = 2$, $\Delta M_s = \pm 1$) (vide **Figuras 25 a 33**).

Todos estes compostos apresentaram também, nesta mesma região, estruturas super-hiperfinas devido aos N coordenados, relacionados aos ligantes imínicos ou amínicos e o próprio imidazol [54-55], conforme mostrado mais precisamente nas **Figuras 34 a 38**.

Por outro lado, através de medidas de susceptibilidade magnética (vide **Tabela 5**) foi observado um pequeno acoplamento antiferromagnético entre os compostos di- e tetranuclear de cobre(II), sendo também caracterizado por EPR através da existência de desdobramentos hiperfinos na região ~ 1500 G ($g \sim 4$, $\Delta M_s = \pm 2$) [49]. As transições $\Delta M_s = \pm 2$ são de baixa probabilidade, devido a transições proibidas por spin. Nestes sistemas era de se esperar 16 linhas [$(2I_1 + 1)(2I_2 + 1)$], onde $I_1 = I_2 = 3/2$ para os núcleos de cobre]. Entretanto, essas interações hiperfinas podem ser usualmente simplificadas para 7 linhas [$2(I_1 + I_2) + 1$], com intensidades relativas na razão 1:2:3:4:3:2:1 [56-59]. As transições $\Delta M_s = \pm 2$ ocorreram a ~ 1530 G com o surgimento de aproximadamente 7 linhas e com desdobramento hiperfino na ordem de 75 G, vide **Figuras 25 a 33**. Este sinal indica indubitavelmente o acoplamento magnético entre 2 centros de cobre, já evidenciado nas medidas de μ_{ef} .

Através desses espectros calculou-se os parâmetros de EPR em solução de metanol / água (4:1), DMF e DMSO (1:1) para os compostos cujo espectro registrado foi bem resolvido. Os valores destes parâmetros estão relacionados nas **Tabelas 7 e 8**.

Tabela 7 – Valores do $g_{\perp}$, $g_{\parallel}$, $A_{\perp}$ e $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ para os complexos Mono-, Di- e Tetranuclear em solução: Metanol / água (4:1) ou DMF^(***), Temperatura = 77 K.

Compostos	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (G)	$A_{\parallel}$ (10^{-4} cm^{-1})	$g_{\parallel} / A_{\parallel}$ (cm)
[SECuImH] ⁺	2,052	2,225	191,6	199	111
[SECuImCuSE] ⁺	2,053	2,224	189,4	196	113
***[Cu(apv-epy)OH] ⁺	2,056	2,253	174,2	183	123
[Cu(apv-epy)ImH] ²⁺	2,051	2,243	176,1	184	122
[Cu ₂ (apv-epy) ₂ Im] ³⁺	2,052	2,237	177,6	185	121
[Cu ₄ (apv-epy) ₄ (Im) ₄] ⁴⁺	2,054	2,239	177,6	185	121
[Cu ₂ (apv-bz) ₂ Im] ³⁺	2,058	2,242	186,4	195	115
[Cu ₂ (apv-fen) ₂ Im] ³⁺	2,059	2,232	184,6	192	116

Obs.: $A_{\parallel} (\text{cm}^{-1}) = A_{\parallel} (\text{G}) \times g_{\parallel} \times 0,46686 \times 10^{-4}$

Tabela 8 – Valores do g_L , $g_{//}$, $A_{//}$ e $g_{//} / A_{//}$ para os complexos Mono-, Dinucleares e Tetranucleares em solução: DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K.

Compostos	g_L	$g_{//}$	$A_{//}$ (G)	$A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$g_{//} / A_{//}$ (cm)
[SECuImH] ⁺	2,056	2,229	191,6	199	112
[SECuImCuSE] ⁺	2,059	2,228	189,8	197	113
[Cu(apv-epy)OH] ⁺	2,057	2,288	123,6	132	173
[Cu(apv-epy)ImH] ²⁺	2,053	2,248	175,9	184	122
[Cu ₂ (apv-epy) ₂ Im] ³⁺	2,056	2,245	177,6	186	120
[Cu ₄ (apv-epy) ₄ (Im) ₄] ⁴⁺	2,060	2,240	177,6	186	120
[Cu ₂ (apv-bz) ₂ Im] ³⁺	2,062	2,244	186,3	195	115
[Cu ₂ (apv-fen) ₂ Im] ³⁺	2,062	2,234	184,6	192	116

Obs.: $A_{//}(\text{cm}^{-1}) = A_{//}(\text{G}) \times g_{//} \times 0,46686 \times 10^{-4}$

Não se observou nenhuma diferença marcante em relação aos parâmetros espectrais com a mudança de solvente, exceto para o composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ onde se observa mudança na geometria de coordenação quando se utiliza uma mistura de solvente, DMSO / água (1:1, v/v). Neste caso, provavelmente ocorre uma adição do solvente DMSO na 5ª posição de coordenação do cobre mudando a sua geometria. Através dos dados das **Tabelas 7 e 8** verifica-se que os compostos apresentam uma simetria axial, com valores distintos de $g_{\parallel}$ e $g_{\perp}$ ($g_{\parallel} > g_{\perp}$), indicativo de distorção tetragonal [60]. A relação de $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ tem sido utilizada como indicativo de distorções estruturais. Em geral, um valor entre 105 e 135 é atribuído a uma estrutura predominantemente quadrado planar ligeiramente distorcida, enquanto um valor mais elevado até 250 é indicativo de uma distorção tetraédrica mais acentuada numa estrutura tetragonal [61]. Os complexos estudados possuem um valor de $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ entre 105 a 125, mais consistente com uma estrutura quadrado planar ligeiramente distorcida. No complexo $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ observa-se um valor de $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ igual a 173, quando se utiliza uma mistura de DMSO / água como solvente, cujo valor é indicativo de uma maior distorção tetraédrica, quando comparado com os demais compostos.

Figura 25 - Espectro EPR do composto $[\text{SECuImH}]^+$ (5,0 mM) em solução: DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $1,42 \times 10^4$.

Figura 26 - Espectro EPR do composto $[\text{SECulmCuSE}]^+$ (5,0 mM) em solução: DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $2,24 \times 10^3$.

Figura 27 – Espectro EPR do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ (~1,0 mM) dissolvido em DMF. Temperatura = 77 K, ganho = $3,17 \times 10^4$.

Figura 28 - Espectro EPR do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ (5,0 mM) em solução: DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $1,10 \times 10^4$.

Figura 29 - Espectro EPR do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ (5,0 mM) em solução: DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $3,99 \times 10^3$.

Figura 30 - Espectro EPR do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2(\text{lm})]^{3+}$ (5,0 mM) em solução: DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $1,12 \times 10^4$.

Figura 31 - Espectro EPR do composto $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{lm})_4]^{4+}$ (5,0 mM) em solução: DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $7,10 \times 10^3$.

Figura 32 - Espectro EPR do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$ (5,0 mM) em solução: DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $4,48 \times 10^3$.

Figura 33 - Espectro EPR do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$ (5,0 mM) em solução: DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $5,64 \times 10^3$.

Os complexos mono-, di- e tetranuclear apresentaram algumas diferenças marcantes com relação aos seus espectros de EPR na região de $\Delta M_s = \pm 1$. Porém, na região de $g \sim 4$, atribuída as transições $\Delta M_s = \pm 2$, observa-se o aparecimento de aproximadamente 7 linhas referentes a interação magnética entre os íons $\text{Cu}^{\text{II}} \dots \text{Cu}^{\text{II}}$, frequentemente observado em compostos dinucleares de cobre(II) contendo grupamento imidazol em ponte [56-59].

Com relação aos compostos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$, $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ em solução metanol / água (4:1, v/v), foram observados um aumento na resolução da estrutura super-hiperfina, proveniente da ligação do átomo ^{14}N com o íon Cu^{2+} ($A_{\text{N}\perp} = 14,7 \text{ G}$), na região de $g = 2$. Resultados semelhantes foram observadas com complexos imidazólicos, com estruturas octaédricas distorcidas. Para comparação, os compostos $[\text{Cu}(\text{Hbimam})\text{Cl}_3]_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ e $[\text{Cu}(\text{Hbimam})_2\text{Cl}_2] \text{Cl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ apresentaram $g_{\perp} = 2,07$, $g_{\parallel} = 2,29$ e $A_{\parallel} = 162 \text{ G}$, com $A_{\text{N}\perp} = 14,8/15,0 \text{ G}$ [54].

Para alguns de nossos compostos foram observadas 9 linhas, correspondentes à coordenação de pelo menos 4 N, conforme mostrado nas **Figuras 34 a 37** [54, 62]. Estas estruturas super-hiperfinas também puderam ser observadas quando se utiliza uma solução DMSO / água (1:1, v/v). Isto implica numa possível correlação com a geometria desses compostos de cobre(II) sintetizados.

Figura 34 – Comparação dos espectros EPR dos compostos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ (ganho = $3,17 \times 10^4$), $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{lmH}]^{2+}$ (ganho = $3,17 \times 10^4$), $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{lm}]^{3+}$ (ganho = $4,48 \times 10^4$) e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{lm})_4]^{4+}$ (ganho = $4,48 \times 10^4$). Solução: Metanol / água (4:1), Temperatura = 77 K, ganho = $3,56 \times 10^4$.

Figura 35 – Espectro EPR do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ (5,0 mM) em solução DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $7,10 \times 10^3$.

Figura 36 – Espectro EPR do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$ (5,0 mM) em solução DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $4,48 \times 10^3$.

Figura 37 – Espectro EPR do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$ (5,0 mM) em solução DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K, ganho = $1,12 \times 10^4$.

No caso do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$ verificou-se uma menor resolução da estrutura super-hiperfina, provavelmente devido à menor flexibilidade das ligações Cu-N diminuindo a resolução (vide **Figura 37**).

Por outro lado, nos espectros dos compostos $[\text{SECuImH}]^+$ e $[\text{SECuImCuSE}]^+$, com 3 N coordenados, esperava-se a ocorrência de pelo menos 5 linhas, que foram realmente observadas e apresentaram $A_{\text{N}\perp} = 14,3 \text{ G}$ (vide **Figura 38**) [54].

Figura 38 – Comparação dos espectros EPR dos compostos $[\text{SECulmH}]^+$ (ganho = $4,48 \times 10^4$) e $[\text{SECulmCuSE}]^+$ (ganho = $2,24 \times 10^3$). Solução: DMSO / água (1:1), Temperatura = 77 K.

3.2. Estudo do Equilíbrio em Solução

Os complexos monoméricos estudados apresentam o ligante imidazol na forma de espécie protonada sob condições ácidas, enquanto que em condições básicas, com deprotonação no átomo de nitrogênio não coordenado, o imidazol pode funcionar como um ligante ponte e se coordenar a um outro íon de cobre(II), desde que este complexo tenha uma vacância ou um ligante lábil. Portanto, em solução aquosa, dependendo do pH estes compostos estudados estão em equilíbrio com a correspondente espécie dinuclear. Evidências deste equilíbrio em solução aquosa foram observadas através de medidas espectroscópicas (UV/Vis, EPR) e através da separação dos mesmos por eletroforese capilar, em diferentes pHs.

3.2.1. Método através de EPR

Realizou-se um estudo dos espectros de EPR em função de variações do pH, com os compostos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$, visando obter informações sobre mudanças na simetria ao redor do cobre. Prepararam-se soluções dos respectivos complexos em metanol / água (4:1, v/v) e/ou DMSO / água (1:1, v/v), registrando os espectros, a 77 K, após adições de alíquotas de 10 μL de NaOH (0,1M) e/ou 10 μL de HCl (0,1M), a fim de obter diferentes pHs.

Partindo-se do composto mononuclear, em solução metanol / água (4:1, v/v), foi possível detectar um aumento na resolução das estruturas super-hiperfinas, proveniente da ligação de átomos ^{14}N com o íon Cu^{2+} (com valor observado $A_{\text{N}\perp} = 14,7 \text{ G}$), com o aumento do pH (vide **Figura 39 e 40**).

Ao contrário, partindo-se de uma solução do composto dinuclear, observou-se uma perda na resolução da estrutura super-hiperfina, com a adição de ácido, isto é, com diminuição do pH, na faixa 9,95 a 3,30. Estes resultados monitoram a deprotonação do ligante imidazólico ponte na formação do composto dinuclear (ou sua protonação, na obtenção da espécie mononuclear) [46].

Figura 39 – Espectros de EPR do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ em solução Metanol / água ($\sim 1 \text{ mM}$), Temperatura = 77 K, em funções de diferentes pHs. pHs = 6,97 (ganho = $2,24 \times 10^4$); 8,25 ($2,00 \times 10^4$); 9,40 ($2,00 \times 10^4$); 10,40 ($2,00 \times 10^4$); 11,10 ($2,00 \times 10^4$).

Figura 40 – Espectros de EPR do composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ em solução Metanol / água ($\sim 1 \text{ mM}$), Temperatura = 77 K, em funções de diferentes pHs. pHs = 3,30 (ganho = $5,02 \times 10^3$); 5,48 ($5,02 \times 10^3$); 6,87 ($5,02 \times 10^3$); 7,96 ($1,00 \times 10^4$); 8,80 ($2,00 \times 10^4$); 9,95 ($1,00 \times 10^4$); 11,45 ($1,00 \times 10^4$); 11,90 ($1,00 \times 10^4$).

Figura 41 – Espectros de EPR do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ em solução DMSO / água ($\sim 5 \text{ mM}$), Temperatura = 77 K, em funções de diferentes pHs. pHs = 6,95 (ganho = $2,00 \times 10^3$); 8,30 ($3,56 \times 10^3$); 8,93 ($5,02 \times 10^3$); 9,72 ($1,78 \times 10^4$); 10,35 ($4,48 \times 10^3$); 11,55 ($1,00 \times 10^4$).

Figura 42 – Espectros de EPR do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ em solução DMSO / água ($\sim 5 \text{ mM}$), Temperatura = 77 K, em funções de diferentes pHs. pHs = 6,95 (ganho = $5,02 \times 10^5$); 8,30 ($2,83 \times 10^5$); 8,93 ($7,10 \times 10^5$); 9,72 ($5,64 \times 10^5$); 10,35 ($4,48 \times 10^5$); 11,55 ($6,32 \times 10^5$).

Verificaram-se também mudanças no comportamento espectral, na região de $g = 2$ e $g \sim 4$, conforme mostrado nas **Figuras 41 e 42**. Alguns espectros de EPR obtidos através da variação do pH, apresentaram o mesmo comportamento quando comparado com os respectivos espectros de EPR dos compostos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ em solução metanol / água (4:1, v/v) e/ou DMSO / água (1:1, v/v), anteriormente descritos.

Analizando os espectros de EPR do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ em solução DMSO / água (1:1, v/v) em funções de diferentes pHs (vide **Figuras 41 e 42**), dois tipos de sinais são visíveis na região $g = 2$ e $g \sim 4$, respectivamente. Este último sinal na região de $\sim 1500 \text{ G}$ ($\Delta M_s = 2$), revela uma forte interação magnética entre os íons de cobre(II) [56], corroborando na existência de um equilíbrio entre estes compostos em virtude da intensificação do sinal a medida em que se aumenta o pH. Acima de pH $\sim 11,55$ observa-se uma diminuição na intensificação do sinal, provavelmente devido a quebra da ponte imidazolato pelo grupamento OH^- , favorecendo a formação da espécie mononuclear $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$.

Nestas **Figuras 41 e 42**, verifica-se ainda que na região de pH = 6,95 tanto os parâmetros ($g_{\parallel}$, $g_{\perp}$, $A_{\parallel}$) quanto o seu comportamento espectral, são semelhantes ao do composto mononuclear (vide **Figura 29**). Enquanto que em condições básicas a pH 9,76, com deprotonação no átomo de nitrogênio, o imidazol pode funcionar como um ligante ponte e se coordenar a um outro íon de cobre(II), dando origem à espécie $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ ($\sim \text{pH} = 9,72$), cujo espectro bastante semelhante a este foi mostrado na **Figura 30**. Acima deste pH, verifica-se a formação da espécie tetranuclear ($\sim \text{pH} = 10,35$), cujo espectro obtido pode ser comparado com o da **Figura 31**.

3.2.2. Método Espectrofotométrico

Semelhante ao descrito anteriormente, foram preparadas soluções de DMSO / água (1:1, v/v) dos complexos $[\text{SECuImH}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ (3 mM), e os seus espectros eletrônicos foram obtidos após adições de alíquotas de $10 \mu\text{L}$ de NaOH (0,1M) e/ou $10 \mu\text{L}$ de HCl (0,1M), a fim de obter diferentes pHs (vide **Tabela 9 e Figuras 43, 44**).

A absorptividade molar (ϵ), em relação à banda d-d, para os complexos dinucleares são maiores e os seus comprimentos de onda são menores, em comparação aos respectivos compostos mononucleares. Observa-se ainda um deslocamento da banda d-d para a região de maior energia à medida que deslocamos o equilíbrio para a formação do composto dinuclear e/ou tetranuclear, ou seja, aumentamos o pH [32].

Para o sistema $[\text{SECuImH}]^+$, verificou-se um aumento da absorbância com aumento de pH. Os valores determinados de $\lambda_{\text{máx}}$, para a banda d-d, são 605 e 596 nm, para as espécies mono- e dinuclear isoladas, respectivamente.

Figura 43 – Espectros eletrônicos do composto $[\text{SECuImH}]^+$ (3 mM), solução DMSO / água (1:1, v/v), em função de diferentes pHs. pHs = A) 6,25; B) 6,41; C) 6,55; D) 6,77; E) 7,02; F) 7,31; G) 7,55; H) 8,39; I) 9,00; J) 9,43; K) 10,07; L) 10,52.

Resultados análogos foram observados no sistema $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ (**Figura 44**). Ocorreu aumento acentuado da absorbância com aumento do pH, na faixa de 6,44 a 11,67. Neste caso, os valores determinados de $\lambda_{\text{máx}}$ foram 653 e 632 nm, para as espécies mono- e dinuclear isoladas, respectivamente.

Figura 44 – Espectros eletrônicos do composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ (3 mM), solução DMSO / água (1:1, v/v), em funções de diferentes pHs. pHs = A) 6,44; B) 7,35; C) 8,00; D) 8,80; E) 9,25; F) 9,41; G) 9,72; H) 9,97; I) 10,39; J) 10,58; K) 10,90; L) 11,17; M) 11,67.

Através dos espectros de EPR obtidos com variação de pH para o composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ (vide **Figuras 41 e 42**), verificou-se que a região de maior probabilidade de se encontrar somente uma das espécies mono- ou dinuclear em solução de DMSO / água (1:1, v/v) está na região próxima a pH 6,95 e 9,72, respectivamente. Logo, com o objetivo de calcular a constante de equilíbrio, determinou-se os valores de absorbância e absortividade molar no mesmo comprimento de onda ($\lambda = 653 \text{ nm}$), referente aos pHs 6,44 e 9,97 (vide **Figura 44**) [63].

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{Dinuclear}] \cdot [\text{ImH}]}{[\text{Mononuclear}]^2 \cdot [\text{OH}^-]} ; \quad 2 \log \frac{[\text{Dinuclear}]}{[\text{Mononuclear}]} = \log K_{\text{eq}} + \log[\text{OH}^-]$$

onde: $[\text{Dinuclear}] = [\text{ImH}]$

$$2 \log \frac{[\text{Dinuclear}]}{[\text{Mononuclear}]} = \log K_{\text{eq}} - 14 + \text{pH} \quad (1)$$

Na região do visível ou mais precisamente no $\lambda = 653 \text{ nm}$, somente as espécies mono- e dinuclear absorvem luz. Logo, podemos obter a relação abaixo, onde:

A corresponde à absorbância da solução, A_0 absorbância do mononuclear ($\text{pH} = 6,64$), A_∞ absorbância do dinuclear ($\text{pH} = 9,97$) e A_+ valores intermediários;

C_1 e C_2 correspondem às concentrações do mono- e dinuclear, respectivamente; e

ε_1 e ε_2 correspondem às absorvidades molares dos compostos mono- e dinuclear. Considerou-se o caminho óptico igual a 1,00 cm.

$$C_{\text{total}} = C_1 + 2C_2 = 2C_{2\infty}$$

$$A_+ = \varepsilon_1 C_1 + \varepsilon_2 C_2 \quad A_0 = \varepsilon_1 C_{\text{total}} \quad A_\infty = \varepsilon_2 C_{2\infty}$$

$$A_0 - A_+ = \varepsilon_1 C_1 + 2\varepsilon_1 C_2 - \varepsilon_1 C_1 - \varepsilon_2 C_2 = C_2 (2\varepsilon_1 - \varepsilon_2)$$

$$A_+ - A_\infty = \varepsilon_1 C_1 + \varepsilon_2 C_2 - \varepsilon_2 C_{2\infty} = C_1 (\varepsilon_1 - \varepsilon_2 / 2)$$

$$\frac{(A_0 - A_+)}{(A_+ - A_\infty)} = \frac{2C_2[\varepsilon_1 - \varepsilon_2 / 2]}{C_1 [\varepsilon_1 - \varepsilon_2 / 2]} = \frac{2 C_2}{C_1}$$

$$\frac{(A_0 - A_+)}{(A_+ - A_\infty)} = \frac{2 C_2}{C_1} \quad (2)$$

Substituindo (2) em (1), temos:

$$2 \log \frac{1}{2} \frac{(A_0 - A_+)}{(A_+ - A_\infty)} = \log K_{\text{eq}} - 14 + \text{pH}$$

O valor da K_{eq} pode ser obtido através de um gráfico do $2 \log (1/2) (A_0 - A_+) / (A_+ - A_\infty)$ em função do pH.

Figura 45 – Gráfico $\log [\text{Dinuclear}] / [\text{Mononuclear}]^2$ em função do pH

Portanto,

$$\log K_{\text{eq}} - 14 = -7,9296$$

$$K_{\text{eq}} = (0,11 \pm 0,01) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$$

O alto valor desta constante, indica que o equilíbrio está significativamente deslocado para a formação da espécie dinuclear.

3.2.3. Eletroforese Capilar

Eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, em um campo elétrico. Vários modos de separação, com mecanismos singulares e seletividade característica, são possíveis: fronteira móvel, zona, isotacoforese e focalização isoelétrica [64]. Em nosso trabalho, utilizamos a técnica de separação por zona.

A eletroforese de zona, em princípio, é também uma técnica de fronteira móvel, em que a amostra é introduzida no meio tamponado, como uma banda de pequena espessura. Quando o potencial é aplicado, cada zona migra independentemente, com velocidade constante mas diferenciada, característica de sua própria mobilidade.

Entre os vários materiais utilizados na fabricação de capilares, a sílica fundida, uma forma pura de dióxido de silício amorfo, tem encontrado maior uso. Este material confere aos capilares muitas propriedades interessantes, como dimensões precisas, alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica, maleabilidade, resistência ao ataque químico e, particularmente, alta transmitância óptica para um intervalo apreciável de comprimento de onda (190 a 900 nm). No entanto, o uso de capilares de sílica é também responsável por um importante fenômeno em eletroforese capilar: o fluxo eletroosmótico.

Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de vários tipos de grupos silanol, os quais, em média, apresentam um caráter ácido. Em contato com o meio aquoso, alguns desses grupos são ionizados e, com a ionização, a superfície do capilar se torna negativamente carregada. Outra possibilidade para a presença de carga na superfície do capilar é a absorção de espécies iônicas. Em ambos os casos o resultado é o mesmo: surge na solução, em proximidade à superfície, uma distribuição espacial não-homogênea de carga, conhecida como dupla camada elétrica.

A **Figura 46** ilustra a separação de alguns solutos com aproximadamente o mesmo tamanho, mas cargas distintas, na situação de velocidade eletroosmótica maior, em magnitude, que a velocidade eletroforética de qualquer um dos solutos

presentes. Na prática, esta situação é conseguida quando o eletrólito é uma solução de pH elevado e baixa concentração. Note que o detector é fixo em uma posição conveniente, perto do final do capilar. O soluto catiônico migra com uma velocidade maior que a que migraria na ausência de fluxo, e portanto chega ao detector em um tempo menor. O soluto neutro (velocidade eletroforética nula) migra exclusivamente pela ação do fluxo eletroosmótico. Se a amostra contém vários solutos neutros, com tamanhos aproximadamente iguais, estes passariam pelo detector ao mesmo tempo, como uma banda única, não resolvida. O soluto aniônico é arrastado pelo fluxo eletroosmótico para o pólo de carga similar, e migra com uma velocidade menor que a do soluto neutro [64].

Figura 46 – Separação de solutos de tamanho similar e cargas distintas por eletroforese capilar de zona em solução livre. Detalhe mostrando a superfície interna do capilar, carregada negativamente, e a organização da solução nas imediações da superfície. A composição vetorial das velocidades eletroosmótica (V_{osm}) e eletroforética (V_{ep}) resulta na velocidade aparente (v_i) de migração do soluto [64].

→ **Composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$**

Prepararam-se soluções de tampão fosfato do complexo $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ ($[\text{Complexo}] = 1,0 \text{ mM}$; $[\text{Tampão}] = 5,0 \text{ mM}$) em diferentes pHs. Durante a eletroforese, o capilar foi mantido à temperatura de 25°C com a circulação de um líquido (refrigerante) ao redor do capilar. As amostras foram injetadas com pressão negativa (reservatório de saída) de $0,5 \text{ Psi}$. A injeção eletrocinética foi feita utilizando voltagem de 20 kV . A detecção foi realizada a 214 nm (vide **Figura 47**).

Figura 47 – Eletroferogramas das soluções de tampão fosfato do complexo $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ ($[\text{Complexo}] = 1,0 \text{ mM}$; $[\text{Tampão}] = 5,0 \text{ mM}$) em diferentes pHs. A detecção espectrofotométrica foi feita a 214 nm e $T = 25^\circ\text{C}$.

Para o sistema $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, verificou-se a separação de dois compostos em $\text{pH} < 8,0$, evidenciando o equilíbrio em solução tamponada, com a correspondente espécie dinuclear:

Comparando-se os resultados obtidos da condutividade molar (Λ_M) e da análise por eletroforese capilar (**Figura 47**), observa-se que o composto dinuclear $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$, possui maior condutividade ($\Lambda_M = 339 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$), que a respectiva espécie mononuclear ($\Lambda_M = 238 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$). Logo, verifica-se um menor tempo de análise na coluna capilar para o complexo $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$.

Calculou-se a constante de equilíbrio (K_{eq}) através da seguinte equação geral:

$$K_{eq} = \frac{[\text{Dinuclear}] \cdot [\text{ImH}]}{[\text{Mononuclear}]^2 \cdot [\text{OH}^-]} = (0,8 \pm 0,3) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$$

A concentração de espécie $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ foi calculada através da integração das áreas, considerando nos pHs 8,08, 8,97 e 10,25, como sendo igual a 100% [65]. A quantidade de espécie mononuclear foi calculada por diferença, a partir da área da espécie dinuclear. Em virtude do alargamento das bandas, que está relacionado à difusão longitudinal, proveniente da interação soluto / capilar, e as diferenças de condutividade entre a solução e a amostra [64] (vide **Figuras 47 e 48**)

Figura 48 – Curva de distribuição das espécies no sistema $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ ([Complexo] = 1,0 mM; [Tampão] = 5,0 mM) em diferentes pHs. A detecção das análises foram realizadas a 214 nm e T = 25 °C.

Em pHs acima de 8,0, tem-se somente uma espécie em solução tamponada, correspondendo à espécie dinuclear. A velocidade eletroosmótica é bastante elevada em meio básico, decresce rapidamente entre pH 8,0 e 4,0 e, praticamente, estabiliza-se em meio ácido. Quando se eleva o pH ocorre aumento da velocidade eletroosmótica, caracterizando um menor tempo de análise.

Observa-se também que acima de pH 8,0, ocorre uma diminuição pela metade na concentração das espécies envolvidas neste processo, corroborando a predominância da espécie $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$, nesta faixa de pH.

Em valores de pH mais elevados ($\text{pH} > 12,0$), ocorre provavelmente a formação da espécie mononuclear $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$, proveniente da quebra da ponte imidazolato pelo grupamento OH^- [49, 66]. Esta conclusão está relacionada com a área de integração neste pH, no qual se observa um aumento da concentração de espécies envolvidas em virtude do aumento da área, correspondendo aproximadamente ao somatório inicial no $\text{pH} \sim 5,05$. Por outro lado, apesar do fluxo eletroosmótico ser de grande magnitude, observa-se um aumento do tempo de análise (quando comparado com o $\text{pH} = 10,25$), corroborando a provável formação do complexo mononuclear $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$, cuja condutividade molar é igual a $\Lambda_M = 129,4 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$, menor quando comparado com a espécie dinuclear e/ou tetranuclear.

3.3. Reatividade

Foram realizados estudos cinéticos de reações de peróxido de hidrogênio e do oxigênio molecular catalisadas por estes compostos de cobre, objetivando comparar suas propriedades antioxidantes (atividade catalásica) e pró-oxidantes (formação do radical hidroxil), interrelacionando-as com parâmetros estruturais, especialmente a geometria de coordenação ao redor do cobre [67, 68], e a disponibilidade do metal ao agente oxidante [69].

Compostos do tipo estudado têm sido, de um lado, descritos como miméticos da enzima antioxidante superóxido dismutase SOD [70] e, de outro, como modelos de oxidases (oxidação de substratos por transferência de elétrons) [71] ou oxigenases (oxidação por inserção de oxigênio) [72, 73]. Devido a suas características estruturais, acomodando o metal tanto no estado reduzido como oxidado, e às propriedades químicas decorrentes, estes compostos podem catalisar tanto a dismutação de espécies reativas de oxigênio como a sua geração, em presença de oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio.

3.3.1. Atividade Pró-Oxidante dos Compostos Mono-, Di- e Tetranucleares

Nos organismos aeróbicos, a maior parte do oxigênio molecular é reduzido no interior das mitocôndrias à água na cadeia de transporte de elétrons, através da ação da enzima citocromo c oxidase. Esta reação envolve a transferência de 4 elétrons para o oxigênio [74-75], sem a liberação de intermediários reativos como mostra a equação abaixo:

Entretanto, nem sempre o oxigênio se transforma em água diretamente. Em decorrência de sua configuração eletrônica, a molécula de oxigênio tem uma forte tendência a receber os elétrons em etapas monoeletrônicas, gerando intermediários reativos conhecidos como espécies reativas de oxigênio, cujos potenciais de redução [76] em meio aquoso, a pH 7,0, estão indicados no diagrama de Latimer, a seguir:

A captação de um elétron pelo oxigênio molecular origina o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) que pode ser formado enzimaticamente em quase todas as células aeróbicas, como resultado da auto-oxidação de algumas moléculas, ou ainda durante a atividade catalítica de algumas enzimas [77]. No entanto, a natureza soube aproveitar o potencial destruidor dessas espécies para a própria proteção do organismo, onde estas espécies reativas de oxigênio através de células fagocitárias ativadas desempenham um papel fundamental na morte de inúmeras bactérias [75-77].

Em pH fisiológico, o radical superóxido sofre uma rápida dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) [61,75,78], formando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Assim, o H_2O_2 é quase sempre formado nos sítios onde existe a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ [79] e é também formado pela redução direta do oxigênio por dois elétrons, numa reação catalisada por muitas oxidases, geralmente encontradas nos peroxissomas das células eucarióticas [80].

O peróxido de hidrogênio e o radical superóxido não são as espécies mais reativas originadas da redução parcial do O_2 , porém podem participar da formação de um potente oxidante, o radical hidroxil ($\text{OH}^{\cdot}$), que possivelmente também pode ser formado através da reação abaixo, denominada Haber-Weiss [81].

Apesar desta reação ser termodinamicamente favorável, ela é muito lenta, a menos que seja catalisada por metais de transição [81], principalmente o ferro(II) (Reação de Fenton) e o cobre(I). A reação de Haber-Weiss pode ser associada ao

resultado de duas outras reações, onde o radical superóxido atua como um redutor do metal (M):

O radical hidroxil é extremamente reativo, isto é, uma vez formado exibe uma meia vida extremamente curta, reagindo rápida e inespecificamente com os alvos celulares mais próximos, podendo causar danos oxidativos a diferentes substratos, como proteínas, açúcares, lipídios e DNA [75,82].

Os compostos de cobre(II) estudados mostraram-se cataliticamente ativos na decomposição do peróxido de hidrogênio, com geração de radicais hidroxil, que foram detectados através da técnica espectroscopia EPR, utilizando-se o captador de spin 5,5'-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) [83].

Os espectros EPR dos adutos DMPO-OH gerados durante a reação de peróxido de hidrogênio com os compostos de cobre(II) foram registrados, utilizando-se as seguintes condições: concentração dos compostos, $2,50 \times 10^{-5}$ M, concentração de H_2O_2 igual a 1,74 mM e a concentração de DMPO de 0,100 M, em tampão fosfato 50,0 mM (pH = 8,11). Nas **Figuras 49 e 50** constam os espectros resultantes, após 10 minutos de reação.

Através dos dados das **Figuras 49 e 50** verifica-se que para todos os sistemas compostos de cobre mono- e dinucleares / H_2O_2 estudados ocorre a formação do aduto DMPO-OH, em quantidades variáveis, com valores característicos das constantes hiperfinas, $a_N = a_H = 1,49$ mT [61].

Na **Tabela 9** constam os dados referentes à quantidade de aduto DMPO-OH formado para cada sistema no intervalo de 10 min. Estes dados foram obtidos a partir da integração dupla dos sinais de EPR, utilizando-se uma solução de tempol (38,2 μ M) para a calibração.

Tabela 9 – Formação do aduto DMPO-OH para os sistemas compostos de cobre mono-, di- e tetranucleares / H_2O_2 .

Compostos	[DMPO-OH] (μM)
$[\text{SECuImH}]^+$	0,361
$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$	0,297
$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$	0,598
$[\text{SECuImCuSE}]^+$	0,382
$[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$	0,736
$[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{3+}$	0,691
$[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$	1,39
$[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$	2,09

[Complexo] = $2,50 \times 10^{-5}$ M, [DMPO] = 0,100 M, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ = 1,74 mM, pH = 8,11 (tampão fosfato – 50 mM), T = 25,0 °C.

Figura 49 – Espectro EPR do aduto DMPO-OH gerado durante a reação do peróxido de hidrogênio com os complexos mono- di- e tetranucleares de cobre(II). $[\text{CuL}] = 2,50 \times 10^{-5}$ M, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ = 1,74 mM, pH = 8,11 (tampão fosfato), Temperatura = 25 °C, $G = 2,52 \times 10^6$.

Figura 50 – Espectro EPR do aduto DMPO-OH gerado durante a reação do peróxido de hidrogênio com os complexos mono- e dinucleares de cobre(II). $[CuL] = 2,50 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[H_2O_2] = 1,74 \text{ mM}$, $\text{pH} = 8,11$ (tampão fosfato), Temperatura = 25°C , $G = 2,52 \times 10^6$.

Os dados apresentados na **Tabela 9** mostram que os complexos apresentam uma atividade catalítica diferenciada frente ao peróxido de hidrogênio. O composto $[Cu_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$ foi o mais ativo, seguido do $[Cu_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$. As espécies mono-, di- e tetranucleares com o ligante apy-epy foram igualmente reativos; geraram aproximadamente a mesma quantidade de aduto DMPO-OH, como era de esperar para o equilíbrio a pH 8, quando predomina a espécie dinuclear. Os demais complexos foram bem menos reativos. É interessante observar que houve variação apreciável entre os complexos da série $[Cu(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ e o composto $[Cu(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$. Neste último caso, predomina a espécie monomérica no pH utilizado.

3.3.2. Catálise da Decomposição do Peróxido de Hidrogênio

Realizou-se um estudo cinético para os compostos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ observando sua atividade catalítica frente ao desproporcionamento do peróxido de hidrogênio, através da técnica manométrica, descrita anteriormente.

A evolução do oxigênio foi monitorada durante aproximadamente 2 horas e calculou-se a quantidade de O_2 liberado em μL (ou μmol) versus tempo de reação. Foram então obtidas as velocidades iniciais de reação visando determinar sua dependência com relação à concentração dos compostos de cobre, peróxido de hidrogênio e variação de pH.

As medidas experimentais foram realizadas a volume constante, sendo a variação da pressão determinada em mm de líquido manométrico (solução de Brodie) proporcional ao volume de gás liberado (ou consumido) no frasco de reação, à temperatura constante de $(30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

• *Método Univariável*

Consiste em variar um dos fatores de cada vez deixando os demais constantes. Este método teve como objetivo determinar a ordem de reação, além de observar o seu comportamento.

a) Variação da concentração do complexo mononuclear

Inicialmente variou-se a concentração do complexo $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ na faixa de 10^{-4} M e manteve-se constante a concentração de peróxido de hidrogênio $(6,51 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}\text{ M}$, em tampão fosfato (50 mM), pH = 8,95.

Figura 51 – Curvas de decomposição do peróxido de hidrogênio catalisada pelo composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ a variadas concentrações; $[\text{H}_2\text{O}_2] = (6,51 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$; $\text{pH} = 8,95$ e $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

Conforme mostrado na **Figura 51**, observou-se um aumento na velocidade inicial de reação com concentrações crescentes do catalisador, embora tenha sido verificado simultaneamente uma diminuição na quantidade total de O_2 liberado.

A partir destas curvas calculou-se as respectivas velocidades iniciais, conforme mostra a **Tabela 10**.

Tabela 10 – Velocidade inicial para diferentes concentrações de $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = (6,51 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$ e $\text{pH} = 8,95$.

$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ $\times 10^{-4} \text{ M}$	$V_i (\mu \text{ mol/L.s})$
0,0	0,0
3,24	0,47
4,86	0,71
5,76	0,83
6,48	0,94
8,10	1,18

A **Figura 52** mostra a curva obtida para as velocidades iniciais de reação versus $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$.

Figura 52 – Curva da velocidade inicial da decomposição do peróxido de hidrogênio, catalisada pelo composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ a variadas concentrações; $[\text{H}_2\text{O}_2] = (6,51 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$; Tampão fosfato-50 mM (pH = 8,95) e $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

A partir destes dados observou-se que o complexo $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ apresenta uma dependência de primeira ordem com relação à concentração do catalisador. A constante de velocidade estimada foi de $k_{\text{obs}} = (1,46 \pm 0,06) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Realizou-se o mesmo estudo descrito anteriormente, porém utilizando o composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ como catalisador.

Figura 53 – Curvas de decomposição do peróxido de hidrogênio catalisada pelo composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ a variadas concentrações; $[\text{H}_2\text{O}_2] = (6,51 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$; $\text{pH} = 8,95$ e $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

Observando a **Figura 53**, verificou-se um aumento na velocidade inicial de reação com concentrações crescentes do catalisador, embora tenha sido verificado também uma tendência à diminuição na quantidade total de O_2 liberado.

A partir destas curvas calculou-se as respectivas velocidades iniciais, conforme mostra a **Tabela 11**.

Tabela 11 – Velocidade inicial para diferentes concentrações de $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = (6,51 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$ e $\text{pH} = 8,95$.

$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ $\times 10^{-4} \text{ M}$	$V_i (\mu \text{ mol/L.s})$
0,0	0,0
0,30	0,61
0,50	0,69
0,80	0,84
3,24	1,01
4,86	1,09
8,10	1,27

A **Figura 54** mostra a curva obtida para as velocidades iniciais de reação versus $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$.

Figura 54 – Curva da velocidade inicial da decomposição do peróxido de hidrogênio, catalisada pelo composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ a variadas concentrações; $[\text{H}_2\text{O}_2] = (6,51 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$; Tampão fosfato-50 mM (pH = 8,95) e $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

Podemos verificar no gráfico da **Figura 54** que a velocidade inicial da reação varia linearmente com a concentração do complexo para concentrações inferiores a $0,80 \times 10^{-4} \text{ M}$. Para concentrações maiores observa-se uma dependência de ordem zero, com respeito à variação da concentração do catalisador. A constante de velocidade estimada foi de $k_{\text{obs}} = (4,5 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

b) Variação da concentração do peróxido de hidrogênio

Variou-se a concentração de peróxido de hidrogênio na faixa de 10^{-3} M e utilizando-se uma concentração de $3,24 \times 10^{-4} \text{ M}$ para o composto de cobre, mantendo-se constante as demais condições. As velocidades iniciais obtidas para os compostos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ estão indicadas na **Tabela 12**.

Tabela 12 – Velocidade inicial para diferentes concentrações de H_2O_2 , $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{X}]^{\text{nt}} = 3,90 \times 10^{-4} \text{ M}$ e $\text{pH} = 8,95$.

$[\text{H}_2\text{O}_2]$ $\times 10^{-3} \text{ M}$	$V_i (\mu \text{ mol/L.s})$ $\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ $\times 10^{-3} \text{ M}$	$V_i (\mu \text{ mol/L.s})$ $\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$
0,0	0,0	0,0	0,0
1,30	0,07	2,60	0,23
3,90	0,33	5,20	0,56
6,51	0,52	6,51	0,66
6,57	0,57	7,80	0,86

As **Figura 55** e **56** mostram as curvas obtida para as velocidades iniciais de reação versus $[\text{H}_2\text{O}_2]$.

Figura 55 – Curva da velocidade inicial da decomposição do peróxido de hidrogênio, catalisada pelo composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ a $3,24 \times 10^{-4} \text{ M}$; Tampão fosfato-50 mM ($\text{pH} = 8,95$) e $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

Figura 56 – Curva da velocidade inicial da decomposição do peróxido de hidrogênio, catalisada pelo composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ a $3,24 \times 10^{-4}$ M; Tampão fosfato-50 mM (pH = 8,95) e $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

A influência da concentração do peróxido na velocidade de reação, mostrou ser de primeira ordem para ambos os compostos. Estimou-se a constante de velocidade como $k_{\text{obs}} = (0,83 \pm 0,03) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ utilizando o composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ e $k_{\text{obs}} = (1,53 \pm 0,05) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para o composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$. A constante de segunda ordem foi determinada como sendo $k = (0,24 \pm 0,01) \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ e $k = (0,58 \pm 0,02) \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

c) Variação do pH na reação de decomposição do peróxido de hidrogênio

A velocidade inicial de decomposição do peróxido de hidrogênio, catalisada pelo composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$, foi também monitorada variando-se o pH do sistema de 7,30 a 11,0, mantendo-se constante as concentrações do complexo e do peróxido de hidrogênio. Utilizou-se tampão fosfato 50 mM para os diferentes pHs.

Para este composto em estudo, utilizou-se uma concentração de $4,17 \times 10^{-4}$ M, $[\text{H}_2\text{O}_2] = (6,57 \pm 0,10) \times 10^{-3}$ M e $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Os resultados podem ser observados nas **Figuras 57 e 58**. A partir das curvas de liberação de oxigênio versus tempo de reação pôde-se obter a velocidade inicial da reação para cada pH (vide a **Tabela 13**).

Figura 57 – Curvas de decomposição do peróxido de hidrogênio em função do pH; $[H_2O_2] = (6,57 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$; $[Cu(apy-epy)ImH]^{2+} = 4,17 \times 10^{-4} \text{ M}$ e $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

Tabela 13 – Variação da velocidade inicial de decomposição do peróxido de hidrogênio em função do pH.

pH	$V_i (\mu \text{ mol/L.s})$
7,30	0,03
7,95	0,16
8,35	0,32
8,95	0,60
9,90	1,84
11,00	5,75

Figura 58 – Variação da velocidade inicial da decomposição do peróxido de hidrogênio em função do pH para o composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$.

À medida em que elevamos o pH ocorre um aumento da velocidade de reação e maior liberação de oxigênio. Portanto, o deslocamento do equilíbrio para a formação do composto dinuclear, com o aumento do pH, aparentemente favoreceria a reação catalítica. Porém, mesmo para a reação não catalisada a velocidade aumenta a pHs mais alcalinos [84]. Tem-se neste caso dois fatores com influência no processo.

Um perfil semelhante de dependência com o pH já havia sido observado no caso de catálise pela espécie $[\text{Cu}(\text{Im})_4]^{2+}$ [67], com aumento acentuado da velocidade ao redor de pH 9, atribuído à deprotonação da espécie peroxo coordenada ao cobre:

O pKa do grupo imidazol livre é 14,3 [85] e do peróxido é 11,6 [86], mas espera-se que sua acidez quando coordenados seja consideravelmente maior.

Caso a espécie dinuclear fosse mais ativa, com a deprotonação do imidazol para formar a ponte entre os dois centros de cobre, que deve ocorrer a $\text{pH} \geq 8$

segundo a literatura [16], deveria-se observar um aumento na velocidade de reação a pH menor que o efetivamente observado (a pH >10, na **Figura 58**).

• **Método Multivariável**

Para auxiliar na interpretação dos resultados cinéticos, utilizou-se então o método multivariável e/ou planejamento fatorial, visando investigar a influência de uma ou mais variáveis sobre a propriedade medida ($\mu\text{mol/L}$ de O_2 liberado). Este método, baseado em princípios estatísticos, consiste em fazer variar todos os fatores ao mesmo tempo. As variáveis podem se influenciar mutuamente e o valor ideal para uma delas pode depender dos valores das demais, por isso este método é perfeitamente aplicável.

Para estudar o efeito desses fatores (pH, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ e $[\text{Complexo}]$), sobre a resposta obtida, foi preciso a realização de ensaios em pelo menos dois níveis desses fatores. Havendo 3 fatores, portanto, 3 variáveis controladas, o planejamento de dois níveis requereu a realização de 2^3 ensaios diferentes, com quadruplicata no ponto central, para calcular o erro experimental. A **Tabela 14** e as próximas páginas mostram esses dados para os dois complexos estudados, a título de comparação.

Uma análise da significância estatística dos dados obtidos, através do Programa Fatorial [87], usando os compostos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ como catalisadores, mostraram que os efeitos da concentração de peróxido e do pH são predominantes neste sistema. Além disso, foi observado um efeito de interação acentuada entre esses dois fatores. Ao contrário, a concentração do catalisador teve influência negativa no volume de oxigênio liberado, visto que à medida em que se aumentou a concentração do complexo foi observada uma diminuição na quantidade de produto formado. A interação da concentração do complexo com o pH também foi negativa, em ambos os casos.

Os valores obtidos através desta estimativa de efeitos encontram-se na **Tabela 15**. Os gráficos das **Figuras 59 e 60** complementam a análise estatística.

Tabela 14 – Planejamento Fatorial 2^3 com quadruplicata no ponto central.

Nível	+1	0	-1
[Cu(apy-epy)X] ⁺	$8,10 \times 10^{-4} \text{ M}$	$5,67 \times 10^{-4} \text{ M}$	$3,24 \times 10^{-4} \text{ M}$
[H ₂ O ₂]	$8,10 \times 10^{-3} \text{ M}$	$5,67 \times 10^{-3} \text{ M}$	$3,24 \times 10^{-3} \text{ M}$
pH (Tampão Fosfato-50mM)	11,02	9,18	7,27
Temperatura constante = $(30,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$			

Ensaio	[CuL]	[H ₂ O ₂]	pH	[O ₂], 10 ³ μmol/L [Cu(apy-epy)ImH] ²⁺	[O ₂], 10 ³ μmol/L [Cu(apy-epy)OH] ⁺
1	-1	-1	-1	0,474	0,0949
2	+1	-1	-1	0,416	0,396
3	-1	+1	-1	0,688	0,103
4	+1	+1	-1	0,818	0,480
5	-1	-1	+1	1,32	1,38
6	+1	-1	+1	1,24	1,43
7	-1	+1	+1	3,92	4,03
8	+1	+1	+1	3,68	3,01
9	0	0	0	1,78	0,981
10	0	0	0	1,71	0,870
11	0	0	0	1,78	0,931
12	0	0	0	1,74	0,929

A partir da matriz de planejamento podemos formar a tabela de coeficientes de contraste, multiplicando um a um os sinais das colunas apropriadas para obter as novas colunas correspondentes às interações.

Tabela 15: Coeficientes de contraste para um fatorial 2^3 .

Média	[CuL] (1)	[H ₂ O ₂] (2)	pH (3)	12	13	23	123	[O ₂], 10 ³ μmol/L [Cu(apy-epy)ImH] ²⁺	[O ₂], 10 ³ μmol/L [Cu(apy-epy)OH] ⁺
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0,474	0,0949
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	0,416	0,396
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	0,688	0,103
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	0,818	0,480
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	1,32	1,38
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	1,24	1,43
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	3,92	4,03
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	3,68	3,01

Cálculo dos efeitos

A **Tabela 15** contém todos os sinais necessários para o cálculo dos efeitos. O divisor é 8 para a média e 4 para cada um dos efeitos. Empregando os sinais apropriados como coeficientes de oxigênio liberado ($\mu\text{mols O}_2/\text{L}$), respectivamente as duas últimas colunas da **Tabela 15**, e em seguida aplicando os divisores, calculamos os sete efeitos e a média global.

Todas as colunas da **Tabela 15**, exceto a primeira, têm quatro sinais positivos e quatro negativos. Qualquer efeito, portanto, pode ser interpretado como a diferença entre duas médias, cada uma das quais contendo metade das observações. Chamando de X a matriz 8×8 com os sinais algébricos da tabela de coeficientes de contraste e com elementos $+1$ ou -1 , os efeitos serão dados, a menos dos divisores, pelo produto $X^t y$, onde y é o vetor coluna contendo o volume de oxigênio liberado nos ensaios. Dividindo o primeiro elemento por 8, pois corresponde à média, e os demais por 4 obtemos o vetor dos efeitos representados na **Tabela 16** [87].

Tabela 16 – Valores dos efeitos fatoriais dentro do intervalo de confiança de 95%.

Efeitos	$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+} (\times 10^3)$	$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+ (\times 10^3)$
Média	$1,57 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,05$
[Complexo]	$-0,06 \pm 0,08$	$-0,07 \pm 0,05$
$[\text{H}_2\text{O}_2]$	$1,41 \pm 0,08$	$1,08 \pm 0,05$
pH	$1,94 \pm 0,08$	$2,19 \pm 0,05$
[Complexo] . $[\text{H}_2\text{O}_2]$	$0,01 \pm 0,08$	$-0,25 \pm 0,05$
[Complexo] . pH	$-0,10 \pm 0,08$	$-0,41 \pm 0,05$
$[\text{H}_2\text{O}_2]$. pH	$1,11 \pm 0,08$	$1,03 \pm 0,05$
[Complexo] . $[\text{H}_2\text{O}_2]$. pH	$-0,09 \pm 0,08$	$-0,29 \pm 0,05$

O modelo pode ser construído usando a notação:

$$y(x_1, x_2, x_3) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \varepsilon(x_1, x_2, x_3)$$

Os coeficientes dessa equação (simbolizados por β) representam valores populacionais dos efeitos, por unidade das variáveis codificadas, obtidos através da equação:

$$b = (1/2^k) X^t y ; \quad k = \text{número de fatores (k= 3)}$$

A **Tabela 16** mostra claramente que alguns efeitos são bem mais significativos que outros. Os efeitos mais significativos estão em negrito na **Tabela 16**. Se admitirmos, tendo em vista os valores dessa tabela, que os efeitos principais e as interações de dois fatores são suficientes para descrever adequadamente a superfície de resposta, temos:

1) **[Cu(apy-epy)ImH]²⁺**

Valores dos efeitos experimentais que serão incluídos na modelagem

Efeitos	Valores
Média	1569,500
[H ₂ O ₂]	707,000
pH	970,500
[H ₂ O ₂] . pH	553,000

Resultados da Modelagem

Ensaio	Resposta	Resposta Prevista	Resíduos
1	474,000	445,000	29,000
2	416,000	445,000	-29,000
3	688,000	753,000	-65,000
4	818,000	753,000	65,000
5	1320,000	1280,000	40,000
6	1240,000	1280,000	-40,000
7	3920,000	3800,000	120,000
8	3680,000	3800,000	-120,000

1.1) Gráfico normal dos resíduos

O gráfico normal dos resíduos, mostra que existe um comportamento linear para o modelo proposto, pois o modelo ideal não deixaria resíduo algum: todas as suas previsões (ou predições, como se diz na estatística) coincidiriam com os resultados observados.

1.2) Gráfico Normal das Estimativas

Um dos modelos estatísticos mais importantes é a distribuição normal, ou gaussiana, que é uma distribuição de probabilidades de ocorrência de erros em medições, proposta no início do século XIX por Carl F. Gauss. Tantos foram – e são – os dados adequadamente descritos por ela, que se chegou a pensar que a distribuição normal representaria o comportamento natural de qualquer tipo de erro experimental: daí o adjetivo normal. Se alguma vez a distribuição dos erros não seguisse uma gaussiana, era costume concluir-se que a coleta de dados não tinha sido feita de forma apropriada. Hoje em dia já se conhecem várias situações legítimas em que a distribuição normal não é válida, mas isso não a impede de continuar sendo, com razão, um dos modelos fundamentais da estatística. Muitos

dos resultados que aqui chegamos só são rigorosamente válidos para situações em que a distribuição normal seja obedecida [87].

A distribuição normal é uma distribuição contínua, isto é, uma distribuição em que a variável pode assumir qualquer valor dentro de um intervalo previamente definido. Caso a distribuição seja conhecida, podemos usar a sua expressão matemática para calcular probabilidades de ocorrência de qualquer valores da variável aleatória cujo comportamento ela descreve.

Examinando o gráfico anterior, vemos imediatamente que os pontos iniciais do gráfico se ajustam muito bem a uma reta cuja interseção com a probabilidade acumulada ocorre praticamente sobre o ponto zero do eixo das abscissas, confirmando que realmente faz sentido considerar esses pontos como vindos de uma população normal de média zero. Em outras palavras, esses pontos representam “efeitos” sem qualquer significado físico.

O mesmo já não se pode dizer dos outros valores, que estão identificados de acordo com o efeito que representam. Dificilmente poderíamos pensar nesses pontos, tão afastados da reta, como sendo provenientes da mesma distribuição de que vieram os pontos centrais. Eles devem ser interpretados, portanto, como

efeitos realmente significativos, e tanto mais significativos quanto mais afastados estiverem da região central, seja para a esquerda, seja para a direita. Comparando os efeitos calculados com a estimativa do erro padrão: somente os efeitos [pH], [H₂O₂] e [pH][H₂O₂] são mesmo os mais significativos.

Os gráficos normais também podem ajudar a avaliar o grau de ajuste de um modelo qualquer, relacionado ou não com um planejamento fatorial. Um modelo bem ajustado aos fatos, qualquer que seja a sua natureza, deve ser capaz de representar toda a informação sistemática contida nos dados, deixando para os resíduos apenas a parte aleatória, isto é, o ruído embutido nas medições.

Para o complexo [Cu(apy-epy)OH]⁺ foi realizado um estudo análogo ao descrito anteriormente:

2) [Cu(apy-epy)OH]⁺

Valores dos efeitos que serão incluídos na modelagem

Efeitos	Valores
Média	1365,487
[H ₂ O ₂]	540,262
pH	1097,012
[H ₂ O ₂] . pH	517,237

Resultados da Modelagem

Ensaio	Resposta	Resposta Prevista	Resíduos
1	94,900	245,450	-150,550
2	396,000	245,450	150,550
3	103,000	291,500	-188,500
4	480,000	291,500	188,500
5	1380,000	1405,000	-25,000
6	1430,000	1405,000	25,000
7	4030,000	3520,000	510,000
8	3010,000	3520,000	-510,000

2.1) Gráfico Normal dos Resíduos

O gráfico normal dos resíduos, mostrou que também existe um comportamento linear para este modelo em estudo.

2.2) Gráfico Normal das Estimativas

Usando o composto $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ como catalisador, mostrou-se que os efeitos da concentração do peróxido e do pH são também predominantes neste sistema. Além disso, foi também observado um efeito de interação acentuada entre estes dois fatores, semelhante ao descrito anteriormente para o complexo $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$.

Estes resultados indicaram que os dois complexos mononucleares são catalisadores desta reação. A menor liberação de oxigênio observada com concentrações crescentes de cobre conforme mostrado nas **Figuras 59 e 60**, nos sistemas $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{X}]^{n+}$, pode ser explicada pela formação do composto dinuclear correspondente que poderia facilitar a coordenação do oxigênio molecular, levando a um intermediário do tipo $[\text{LCu}(\text{O}_2)\text{CuL}]$. Além disso, a deprotonação do peróxido coordenado parece a mais provável de ocorrer a pH próximo de 10, facilitando o seu desproporcionamento.

Figura 59 – Gráfico da Influência das variáveis: concentração do complexo, concentração de peróxido e pH para o sistema $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$.

Figura 60 – Gráfico da Influência das variáveis: concentração do complexo, concentração de peróxido e pH para o sistema $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$.

$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$

A) Cálculo do erro de medida (desvio padrão)

$$S_p^2 = 1/(N-1) \sum S_i^2 = 1/3 (756,25 + 1806,25 + 756,25 + 156,25)$$

$$S_p^2 = 1158,333 \therefore \text{Erro de medida} = \pm 34,03$$

B) Cálculo da Variância do Efeito

$$V(\text{Ef}) = V(R_+) + V(R_-)$$

$$V(\text{Ef}) = S_p^2/4 + S_p^2/4 = S_p^2/2 = 1/2 (1158,333) = 579,166$$

$$\text{Logo; Erro do Efeito} = \pm 24,06$$

C) Intervalo de Confiança (nível de 95%)

$$T_{v; 0,05} = T_{3; 0,05} = 3,182$$

$$\text{Logo; IC} = 0 \pm 24,06 \times 3,182$$

$$\text{IC} = 0 \pm 76,56$$

D) Valores dos efeitos que serão incluídos na modelagem

$$Y = 1569,5 + 707,0 [\text{H}_2\text{O}_2] + 970,5 \text{ pH} + 553,0 [\text{H}_2\text{O}_2] \cdot \text{pH}$$

$(\pm 19,14) \quad (\pm 38,28) \quad (\pm 38,28) \quad (\pm 38,28)$

[Cu(apy-epy)OH]⁺

A) Cálculo do erro de medida (desvio padrão)

$$Sp^2 = 1/(N-1) \sum Si^2 = 1/3 (2835,56 + 3335,06 + 10,5625 + 1,5625)$$

$$Sp^2 = 2060,91 \therefore \text{Erro de medida} = \pm 45,39$$

B) Cálculo da Variância do Efeito

$$V(\text{Ef}) = V(R_+) + V(R_-)$$

$$V(\text{Ef}) = Sp^2/4 + Sp^2/4 = Sp^2/2 = 1/2 (2060,91) = 1030,45$$

$$\text{Logo; Erro do Efeito} = \pm 32,10$$

C) Intervalo de Confiança (nível de 95%)

$$T_{v; 0,05} = T_{3; 0,05} = 3,182$$

$$\text{Logo; IC} = 0 \pm 32,10 \times 3,182$$

$$\text{IC} = 0 \pm 102,14$$

D) Valores dos efeitos que serão incluídos na modelagem

$$Y = 1365,5 + 540,2 [\text{H}_2\text{O}_2] + 1097,0 \text{ pH} + 517,2 [\text{H}_2\text{O}_2] \cdot \text{pH}$$

$(\pm 25,53) \quad (\pm 51,07) \quad (\pm 51,07) \quad (\pm 51,07)$

Ao se comparar os resultados aqui obtidos, com aqueles observados pelo método tradicional univariável, percebe-se que realmente o pH do meio tem papel preponderante, uma vez que determina a posição de equilíbrio entre as espécies mono- e dinuclear de cobre. Valores de pHs elevados também favorecem a deprotonação do próprio peróxido de hidrogênio, que assim interagiria melhor com os centros metálicos.

Esquemáticamente:

Embora as espécies de cobre com oxigênio coordenado só sejam estáveis, *in vitro*, a temperaturas muito baixas [88], a inibição da liberação de oxigênio com a formação das espécies dinucleares mostra que estas não são ativas neste processo, frente ao peróxido de hidrogênio. Ao contrário, serão ativas na oxidação catalisada de substratos fenólicos pelo oxigênio molecular.

3.3.3. Catálise da Oxidação do 2,6-di-*terc*-butilfenol

Dentre as proteínas e enzimas de cobre, uma das mais estudadas tem sido a tirosinase, exibindo um centro metálico do chamado tipo 3, com dois átomos de cobre que interagem antiferromagneticamente, capazes de coordenar em ponte ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$) uma molécula de oxigênio [89]. Tal espécie, verificada experimentalmente na proteína carregadora de oxigênio, hemocianina, e em alguns compostos modelo [90], aumentou sobremaneira o interesse dos pesquisadores pela reatividade de compostos dinucleares de cobre, especialmente aqueles com ligantes imínicos, que estabilizam eficientemente ambos os estados usuais de oxidação deste metal. Embora a espécie $\text{Cu}(\text{O}_2)\text{Cu}$ verificada com muitos dos compostos estudados seja do tipo ($\mu\text{-}\eta^1\text{:}\eta^1$), a atividade catalítica destas espécies frente a fenóis, mimetizando as funções cresolase (oxidação a catecóis) e catecolase (oxidação a quinonas) da enzima tirosinase e de outras oxidases, mereceu atenção especial visando o desenvolvimento de novos catalisadores.

Alguns catalisadores metálicos mononucleares, entretanto, podem também catalisar esta reação, porém são menos reativos quando comparados aos compostos dinucleares [91,92]. O mecanismo proposto na literatura para esta reação envolve a coordenação do oxigênio molecular ao centro bimetálico, com transferência de dois elétrons. Por outro lado, em alguns casos, espécies fenoxil foram detectadas, por exemplo, com catalisadores de cobalto, capazes também de formar espécies mononucleares e dinucleares [93].

Realizou-se experimentos cinéticos para comparar a atividade catalítica dos compostos preparados na oxidação do 2,6-di-*terc*-butilfenol, um substrato com impedimento nas posições *orto*-, favorecendo a obtenção da respectiva difenoquinona e/ou benzoquinona, monitorada espectrofotometricamente a 418 nm (vide **Figuras 61 e 62**) [94,95]. Nestes experimentos utilizaram-se concentrações de [2,6-di-*terc*-butilfenol] = 11,47 mM ($V = 2,00$ mL) e [catalisador] = 0,09 mM, exceto [tetranuclear] = 0,045 mM ($V = 1,00$ mL), em soluções metanólicas, a $(25,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$. O fenol e o catalisador foram adicionados em

sequência dentro de uma cela espectrofotométrica, de caminho óptico igual a 1,000 cm (V=3,00 mL).

Figura 61 – Monitoramento espectrofotométrico na formação da quinona a 418 nm. [2,6-di-*tert*-butilfenol] = 11,47 mM; [Cu(*apy-epy*)ImH]²⁺ = 0,09 mM, em soluções metanólicas, a (25,0 ± 0,3)°C.

Figura 62 – Monitoramento espectrofotométrico na formação da quinona a 418 nm. [2,6-di-*tert*-butilfenol] = 11,47 mM; [Cu₂(*apy-epy*)₂Im]³⁺ = 0,09 mM, em soluções metanólicas, a (25,0 ± 0,3)°C.

Na oxidação do 2,6-di-*terc*-butilfenol catalisada pelos compostos: $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$, tentou-se verificar a existência de um equilíbrio em solução metanólica, onde dobrou-se o número de mols do composto mononuclear de modo a obter a mesma quantidade equimolar de íons cobre em relação ao complexo dinuclear.

Observa-se um aumento da velocidade, porém inferior ao comportamento esperado em relação ao composto dinuclear (vide **Figura 63**), mostrando o não estabelecimento de um equilíbrio em solução metanólica.

Figura 63 – Curvas cinéticas na formação da quinona a 418 nm. $[\text{2,6-di-terc-butilfenol}] = 1,40 \text{ mM}$; $[\text{Cu(apy-epy)ImH}]^{2+} = 0,09 \text{ mM}$, $[\text{Cu(apy-epy)ImH}]^{2+} = 0,18 \text{ mM}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+} = 0,09 \text{ mM}$, em soluções metanólicas, a $(25,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$.

Comparando a reatividade entre todos compostos de cobre(II) preparados, verificou-se que o complexo $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$ é o mais reativo (vide **Figura 64**).

Figura 64 – Curvas cinéticas na formação da difenoquinona a 418 nm. [2,6-di-terc-butilfenol]= 11,47 mM, [catalisador] = 0,090 mM, exceto [Cu₄(apy-epy)₄(Im)₄]= 0,045 mM, em soluções metanólicas, a (25,0 ± 0,3°C).

Neste estudo cinético, a concentração molar usada do composto tetranuclear foi determinada em função da quantidade equimolar de íons cobre presentes nos compostos dinucleares, isto é, a concentração usada de composto tetranuclear foi a metade da concentração dos compostos dinucleares.

Verificou-se assim que alguns dos compostos dinucleares e o tetranuclear mostraram ser eficientes catalisadores na oxidação do substrato fenólico, exibindo uma dependência de primeira ordem em relação à concentração dos complexos em estudo. Este comportamento pode ser explicado através de suas características geométricas, baseado nos cálculos estimativos de otimização de geometria, feitos com o programa HyperChem. Para o composto [SECuImCuSE]⁺, observou-se um impedimento estérico maior em um dos lados da molécula, comparado aos outros complexos dinucleares, que apresentam impedimentos semelhantes em ambos os lados da molécula. Como o processo catalítico deve ocorrer com coordenação tanto do oxigênio como do substrato fenólico aos centros metálicos (vide o **ciclo catalítico proposto**), a estrutura do complexo

$[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$, mais tetragonal acaba sendo menos impedida estericamente, facilitando a coordenação do oxigênio e do fenol ao centro bimetálico. Além disso, a cavidade formada pelos ligantes ao redor do metal é mais hidrofóbica neste caso, devido aos anéis aromáticos, facilitando também a interação com o oxigênio e o fenol. Desta forma o fator estérico parece ser predominante.

Ciclo catalítico proposto

O ciclo catalítico proposto foi baseado em estudos anteriores descritos na literatura, para sistemas semelhantes [95, 96].

As etapas propostas envolvem a redução dos centros metálicos pelo substrato fenólico, a coordenação do oxigênio molecular e a subsequente transferência eletrônica de 2 elétrons, levando à formação da correspondente

difenoquina (ou benzoquina) e à redução do oxigênio a peróxido de hidrogênio. Como as espécies mononucleares são bons catalisadores da decomposição do peróxido de hidrogênio, o processo global envolve ainda etapas monoeletrônicas com formação de espécies radicalares muito reativas (especialmente radicais hidroxil). A etapa inicial de redução dos íons metálicos pelo fenol poderia explicar os períodos de indução observados, da ordem de 10-15 min (vide **Figura 64**), para os compostos mais ativos.

Composto $[Cu_2(apy-epy)_2]Im^{3+}$

a) Variação da concentração do complexo dinuclear

Inicialmente variou-se a concentração do complexo $[Cu_2(apy-epy)_2]Im^{3+}$ na faixa de 10^{-5} M e manteve-se constante a concentração do 2,6-di-*terc*-butilfenol ($11,47 \pm 0,10$) mM, em solução metanólica (**Figura 65**).

Figura 65 – Curvas de oxidação do 2,6-di-*terc*-butilfenol a variadas concentrações do composto $[Cu_2(apy-epy)_2]Im^{3+}$; $[2,6\text{-di-}terc\text{-butilfenol}] = (11,47 \pm 0,10)$ mM e $T = (25,0 \pm 0,3)$ °C.

A partir destes dados calculou-se as velocidades iniciais, conforme mostra a **Tabela 17**.

Tabela 17 – Velocidade inicial para diferentes concentrações de $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$, $[\text{2,6-di-terc-butilfenol}] = (11,47 \pm 0,10) \text{ mM}$

$[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ $\times 10^{-5} \text{ M}$	$V_i (\text{min}^{-1}), 10^{-2}$
0,0	0,0
1,20	0,301
2,70	0,707
3,50	0,912
5,40	2,06
9,00	4,50

A **Figura 66** mostra a curva obtida para as velocidades iniciais de reação versus $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$.

Figura 66 – Curva da velocidade inicial de oxidação do 2,6-di-terc-butilfenol, catalisada pelo composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ a variadas concentrações; $[\text{2,6-di-terc-butilfenol}] = (11,47 \pm 0,10) \text{ mM}$ e $T = (25,0 \pm 0,3) ^\circ\text{C}$.

A partir destes dados observou-se que o complexo $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ apresentou uma dependência de primeira ordem até a concentração $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, e em seguida uma dependência de ordem superior, com concentração mais elevadas. Estimou-se a constante de velocidade como sendo $k_{\text{obs}} = 2,58 \times 10^2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, na faixa de menor concentração.

b) Variação da concentração do 2,6-di-*terc*-butilfenol

Variou-se a concentração do 2,6-di-*terc*-butilfenol na faixa de 10^{-3} M e utilizou-se uma concentração de $3,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ para o composto de cobre, mantendo-se constante as demais condições (**Figura 67**). Conforme observado, as curvas apresentam um período de indução de $\sim 10 \text{ min}$, provavelmente devido aos equilíbrios de formação da espécie dinuclear e de sua redução pelo substrato fenólico.

Figura 67 – Curvas de oxidação do 2,6-di-*terc*-butilfenol a variadas concentrações do mesmo; $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+} = 3,50 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $T = (25,0 \pm 0,3) ^\circ\text{C}$.

As velocidades iniciais obtidas estão indicadas na **Tabela 18**.

Tabela 18 – Velocidade inicial para diferentes concentrações do 2,6-di-*terc*-butilfenol, $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+} = 3,50 \times 10^{-5} \text{ M}$.

[2,6-di- <i>terc</i> -butilfenol] $\times 10^{-3} \text{ M}$	$V_i (\text{min}^{-1}), 10^{-2}$
0,0	0,0
3,00	0,780
5,04	0,908
7,00	0,984
9,00	1,04
11,47	1,08

A **Figura 68** mostra a curva obtida para as velocidades iniciais de reação versus [2,6-di-*terc*-butilfenol].

Figura 68 – Curva da velocidade inicial de oxidação do 2,6-di-*terc*-butilfenol, catalisada pelo composto $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ a $3,50 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $T = (25,0 \pm 0,3) ^\circ\text{C}$.

Podemos verificar no gráfico da **Figura 68** que a velocidade inicial da reação varia linearmente com a concentração de fenol para concentrações inferiores a $5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$. Para concentrações maiores observa-se uma dependência de ordem zero, com respeito à variação da concentração do

substrato, que corrobora a necessidade de interação do substrato ao centro de cobre. Neste caso, o fator limitante é a quantidade de catalisador usada.

A eficiência do catalisador é determinada através da taxa máxima em que ela converte o substrato em produto. Tal é expresso com $V_{\text{máx}}$ ou mais precisamente como número de “turnover” (conversão), o número de moles de substrato convertidos em produto por minuto (min).

O tipo especial de ligação observada no caso do catalisador, **C**, e do substrato, **S**, é descrita em termos de uma “constante de associação” denominada constante de Michaelis, K_M , e através da eficiência catalítica, $k_{\text{cat}} = V_{\text{Máx.}} / [\text{catalisador}]$.

Figura 69 – Inverso da velocidade inicial da oxidação do 2,6-di-terc-butilfenol versus o inverso da concentração do mesmo. $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ a $3,50 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $T = (25,0 \pm 0,3) ^\circ\text{C}$.

A partir do resultado da regressão linear, conforme mostrado na **Figura 69**, chegou-se ao seguinte resultado para a dependência da velocidade com a concentração do substrato estudado:

$$1 / V_i = 0,145 \times 1 / [2,6\text{-di-terc-butilfenol}] + 80,43$$

Através do gráfico duplamente recíproco, $1/V_i$ versus $1/[2,6\text{-di-}i\text{-}terc\text{-butilfenol}]$, obtemos:

$$1 / V_i = K_M / V_{M\acute{a}x} \times 1 / [2,6\text{-di-}i\text{-}terc\text{-butilfenol}] + 1 / V_{M\acute{a}x}$$

A velocidade máxima do catalisador $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ como sendo igual a $(1,20 \pm 0,05) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, e a “constante de associação” igual a $(1,80 \pm 0,08) \text{ mM}$.

Composto $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$

a) Variação da concentração do complexo tetranuclear

Inicialmente variou-se a concentração do complexo $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ na faixa de 10^{-5} M e manteve-se constante a concentração do 2,6-di-*terc*-butilfenol $(11,47 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$, em solução metanólica (**Figura 70**).

Figura 70 – Curvas de oxidação do 2,6-di-*terc*-butilfenol a variadas concentrações do composto $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$; $[2,6\text{-di-}i\text{-}terc\text{-butilfenol}] = (11,47 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$ e $T = (25,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$.

A partir destes dados calculou-se as velocidades iniciais, conforme mostra a **Tabela 19**.

Tabela 19 – Velocidade inicial para diferentes concentrações de $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$, $[\text{2,6-di-terc-butilfenol}] = (11,47 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$.

$[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ $\times 10^{-5} \text{ M}$	$V_i (\text{min}^{-1}), 10^{-2}$
0,0	0,0
0,70	0,42
1,35	0,81
1,75	1,30
2,70	2,70
4,50	4,40

A **Figura 71** mostra a curva obtida para as velocidades iniciais de reação versus $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$.

Figura 71 – Curva da velocidade inicial de oxidação do 2,6-di-terc-butilfenol, catalisada pelo composto $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ a variadas concentrações; $[\text{2,6-di-terc-butilfenol}] = (11,47 \pm 0,10) \times 10^{-3} \text{ M}$ e $T = (25,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$.

A partir destes dados observou-se que o complexo $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ apresentou uma dependência de primeira ordem com relação à concentração do catalisador. Estimou-se a constante de velocidade em $k_{\text{obs}} = (9,3 \pm 0,3) \times 10^2 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

b) Variação da concentração do 2,6-di-*terc*-butilfenol

Variou-se a concentração do 2,6-di-*terc*-butilfenol na faixa de 10^{-3} M e utilizou-se uma concentração de $1,75 \times 10^{-5}$ M para o composto de cobre, mantendo-se constante as demais condições (**Figura 72**).

Figura 72 – Curvas de oxidação do 2,6-di-*terc*-butilfenol a variadas concentrações do mesmo; $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+} = 1,75 \times 10^{-5}$ M e $T = (25,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$.

As velocidades iniciais obtidas estão indicadas na **Tabela 20**.

Tabela 20 – Velocidade inicial para diferentes concentrações do 2,6-di-*terc*-butilfenol, $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+} = 1,75 \times 10^{-5}$ M.

[2,6-di- <i>terc</i> -butilfenol] $\times 10^{-3}$ M	V_i (min^{-1})
0,0	0,0
3,00	0,009
5,04	0,012
7,00	0,014
9,00	0,015
11,25	0,016

A **Figura 73** mostra a curva obtida para as velocidades iniciais de reação versus [2,6-di-terc-butilfenol].

Figura 73 – Curva da velocidade inicial de oxidação do 2,6-di-terc-butilfenol, catalisada pelo composto $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ a $1,75 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $T = (25,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$.

Podemos verificar no gráfico da **Figura 73** que a velocidade inicial da reação varia linearmente com a concentração de fenol para concentrações inferiores a $7,00 \times 10^{-3} \text{ M}$. Para concentrações maiores observa-se um efeito de saturação.

Figura 74 – Inverso da velocidade inicial da oxidação do 2,6-di-terc-butilfenol versus o inverso da concentração do mesmo. $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+} = 1,75 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $T = (25,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$.

Do resultado da regressão linear, conforme mostrado na **Figura 74**, chegou-se ao seguinte resultado para a dependência da velocidade com a concentração do substrato estudado:

$$1 / V_i = 0,213 \times 1 / [2,6\text{-di-}t\text{-}er\text{-}c\text{-}butilfenol] + 41,30$$

A velocidade máxima do catalisador $[Cu_4(apy\text{-}epy)_4(lm)_4]^{4+}$ como sendo igual a $(2,40 \pm 0,08) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, e a “constante de associação” igual a $(5,2 \pm 0,2) \text{ mM}$.

Portanto, comparando os resultados obtidos da lei de velocidade nos dois casos verifica-se que são consistentes com o mecanismo proposto. A constante de velocidade do catalisador $[Cu_2(apy\text{-}epy)_2lm]^{3+}$ é praticamente a metade do valor determinado para o complexo $[Cu_4(apy\text{-}epy)_4(lm)_4]^{4+}$. Por outro lado, observa-se que o valor de K_M para o composto tetranuclear é aproximadamente 3 vezes maior quando comparado ao respectivo composto dinuclear. Logo, uma das possíveis explicações para a maior atividade catalítica desse complexo tetranuclear, está na acessibilidade do agente oxidante ao centro metálico, devido à cavidade hidrofóbica formada, facilitando a interação com o oxigênio e o fenol [96,97].

Este mesmo estudo também foi estendido para os demais compostos dinucleares de cobre(II), afim de completar o estudo comparativo da atividade catalítica na oxidação do 2,6-di-*terc*-butilfenol, vide tabela a seguir:

Tabela 21 – Parâmetros cinéticos.

Complexos (na forma de sais percloratos)	$V_{\text{máx}} \times 10^{-3}$ (min^{-1})	K_M (mM)	k_{cat} (min^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_M \times 10^3$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
$[Cu_2(apy\text{-}fen)_2lm]^{3+}$	14,6	0,9	417	463
$[Cu_4(apy\text{-}epy)_4(lm)_4]^{4+}$	24,0	5,2	1371	263
$[Cu_2(apy\text{-}bz)_2lm]^{3+}$	18,9	2,4	540	225
$[Cu_2(apy\text{-}epy)_2lm]^{3+}$	12,0	1,8	343	190

Através da relação k_{cat}/K_M , podemos avaliar diferentes catalisadores para um mesmo substrato numa determinada concentração, cujo os valores obtidos podem ser correlacionados com os resultados apresentados na **Figura 64** (pág. 107), permitindo racionalizar os respectivos desempenhos em função da natureza dos ligantes e suas estruturas. Dentre estes as espécies $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ apresentaram melhor desempenho, em função do menor impedimento estérico ou da formação de uma cavidade hidrofóbica, possibilitando maior afinidade com o substrato fenólico.

3.3.4. Catálise da Oxidação da L-Dopa

Estes estudos foram estendidos para um outro substrato, um catecol, visando ampliar as possibilidades de uso dos compostos estudados em catálise. Neste caso, realizaram-se experimentos cinéticos para comparar a atividade catalítica dos compostos preparados na oxidação da L-Dopa, favorecendo a obtenção da respectiva dopaquinona e sua posterior polimerização (estrutura parcial da melanina), monitorada espectrofotometricamente a 475 nm, com $\epsilon = 3600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (vide o **ciclo catalítico**) [98]. Nestes experimentos utilizaram-se concentrações de $[\text{L-Dopa}] = 6,67 \text{ mM}$, $[\text{catalisador}] = 0,145 \text{ mM}$ e utilizou-se tampão fosfato 50 mM para os pHs= 7,30 e 11,00, a $(30,0 \pm 0,3) ^\circ\text{C}$.

Esquema de reações

Figura 75 – Curvas cinéticas na formação da dopaquinona a 475 nm. [L-Dopa]= 6,67 mM; [catalisador] = 0,145 mM; pH= 7,30 (tampão fosfato – 50 mM) e T= 30,0 °C.

Figura 76 – Curvas cinéticas na formação da dopaquinona a 475 nm. [L-Dopa]= 6,67 mM; [catalisador] = 0,145 mM; pH= 11,00 (tampão fosfato – 50 mM) e T= 30,0 °C.

As curvas cinéticas das **Figuras 75 e 76**, mostraram a existência de duas etapas distintas, e este comportamento está de acordo com o esquema de reações proposto (anteriormente mostrado), onde, na primeira etapa ocorre uma oxidação da L-dopa para dopaquinona e, posteriormente, o início de sua polimerização.

À medida em que elevamos o pH ocorre um aumento da velocidade de reação. Portanto, o deslocamento do equilíbrio para a formação do composto dinuclear, com o aumento do pH, aparentemente favoreceria a reação catalítica. Porém, mesmo para a reação não catalisada a velocidade aumenta, em pequenas proporções, a pHs mais alcalinos [99].

Diferentes ligantes coordenados ao redor do íon cobre(II), podem ter influência na sua atividade catalítica, como por exemplo: o aumento da hidrofobicidade, acessibilidade do substrato ao íon metálico (características estéricas), potencial redox, entre outras. Conseqüentemente, características estéricas e polaridade do substrato também são fatores que devem ser considerados no processo de oxidação [99].

Observou-se que os compostos: $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ são melhores catalisadores para a oxidação da L-dopa em meio aquoso quando comparados com os compostos: $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$, conforme mostrado nas **Figuras 75 e 76**.

Este comportamento pode ser explicado através do tipo de ligante coordenado ao redor do cobre(II). Para os compostos $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$, verifica-se maior hidrofobicidade, com maior quantidade de anéis piridínicos comparados aos outros complexos dinucleares $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$, facilitando a aproximação da L-Dopa, considerado um substrato mais polar em relação ao 2,6-di-*terc*-butilfenol.

Para comparar a atividade enzimática destes compostos dinucleares e tetranuclear, frente à oxidação da L-Dopa, utilizou-se a própria enzima nativa tirosinase extraída do *mushroom*, procedência da Biochemika (código do lote: 399978/1 - 44099).

Preparou-se uma solução estoque através da adição de 1 mg da enzima nativa em 1 mL de solução tampão fosfato – 50 mM (pH = 7,30), cuja a concentração final foi de aproximadamente 15 μ M.

A uma cela espectrofotométrica, de caminho óptico igual a 1,000 cm (V= 3 mL) foram adicionados, em seqüência, uma solução de tampão fosfato 50 mM (V= 1,95 mL), em seguida 1,00 mL da solução de L-Dopa dissolvido em água desionizada (2×10^{-2} M) e, posteriormente, 50 μ L da solução estoque contendo a enzima nativa ($2,5 \times 10^{-10}$ M) (**Figuras 77 e 78**).

Figura 77 - Curva cinética na formação da dopaquinona a 475 nm. [Tyrosinase from *mushroom*]= $2,5 \times 10^{-10}$ M (50 μ L da solução estoque); [L-Dopa]= 6,67 mM; pH= 7,30 (tampão fosfato – 50 mM) e T= 30,0 °C.

Figura 78 – Curvas cinéticas na formação da dopaquinona a 475 nm. [L-Dopa]= 6,67 mM; [catalisador] = 0,145 mM; [Tyrosinase from *mushroom*]= $2,5 \times 10^{-10}$ M (50 μ L da solução estoque); pH= 7,30 (tampão fosfato – 50 mM) e T= 30,0 °C.

Observa-se que as curvas cinéticas obtidas para a enzima (**Figura 77**) têm o mesmo aspecto das observadas com os compostos-modelo (**Figura 78**). Porém, como esperado as atividades catalíticas dos complexos dinucleares e tetranuclear ficam aquém da atividade da própria enzima nativa.

Por outro lado, a maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima; acima ou abaixo desse pH, a atividade se reduz. Logo; uma das vantagens destes compostos modelos de oxidases, seria a possibilidade de trabalho a pHs mais elevados, que possibilitaria a formação de compostos dinucleares ou tetranuclear, por exemplo, aparentemente favorecendo a reação catalítica.

4. CONCLUSÕES

Diferentes complexos de cobre(II) contendo um ligante tridentado do tipo base de Schiff e um grupo imidazol foram preparados, na forma de sais perclorato, e caracterizados através de diferentes técnicas espectroscópicas (UV/Vis, IR, Raman e EPR), além de análise elementar, medidas de condutividade e medidas magnéticas, pelo método de Faraday, obtendo-se seus parâmetros espectroscópicos e estruturais. Em solução aquosa, estes compostos estão em equilíbrio com as correspondentes espécies dinucleares, onde os centros de cobre estão ligados através de um ligante ponte imidazolato. Em meio alcalino, estes compostos dinucleares e uma espécie tetranuclear foram também isolados e caracterizados. Evidências destes equilíbrios em solução aquosa foram obtidas através de medidas espectroscópicas e eletroforese capilar, em diferentes pHs, determinando-se a constante de equilíbrio num dos casos.

Tanto os valores dos momentos magnéticos efetivos (μ_{ef}) como os parâmetros de EPR observados indicam que as espécies di- e tetranucleares preparadas apresentam alguma interação antiferromagnética. A configuração ao redor do cobre parece ser tetragonal, com discreta distorção tetraédrica, avaliada através do parâmetro $g_{\parallel} / A_{\parallel}$. A distância estimada entre os centros de cobre nas espécies com ponte imidazolato, é de $\sim 5,40 \text{ \AA}$, calculada com o uso do programa HyperChem. Para a tirosinase nativa esta distância é de $\sim 3,4 \text{ \AA}$.

No estudo da reatividade dos compostos mononucleares, verificou-se sua atividade catalítica na decomposição do peróxido de hidrogênio, através da técnica manométrica, monitorando-se o volume de oxigênio liberado na reação. Analisando os dados obtidos através do planejamento fatorial, utilizando os compostos $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{ImH}]^{2+}$ ou $[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^+$ como catalisador, verificou-se que os efeitos da concentração do peróxido e do pH são predominantes nestes sistemas. Além disso, foi observado um efeito de interação acentuada entre estes dois fatores. Ao contrário, a concentração do catalisador teve influência negativa no volume de oxigênio liberado, visto que à medida em que se aumentou a

concentração do complexo foi observada uma diminuição na quantidade total de produto formado.

Dados complementares foram então obtidos através do método univariável. A determinação da lei de velocidade de reação indicou uma dependência de primeira ordem tanto em relação à concentração do peróxido como do complexo, com forte influência do pH. Estes resultados indicaram que as espécies mononucleares estudadas são bons catalisadores para esta reação. Entretanto, observou-se uma diminuição na quantidade total de O₂ liberado com concentrações crescentes do catalisador, consistente com os resultados anteriormente obtidos, pelo método multivariável. Uma vez que espécies mono- e dinucleares coexistem em solução, num equilíbrio fortemente dependente do pH, a menor liberação de oxigênio observada com concentrações crescentes de cobre poderia ser explicada pela não atividade catalítica das espécies dinucleares ou pela formação intermediária de compostos do tipo [LCu(O₂)CuL]. Intermediários deste tipo, observados *in vitro* apenas a temperaturas muito baixas, parecem ser formados *in vivo* com as proteínas hemocianina e tirosinase.

Posteriormente, realizaram-se experimentos cinéticos para comparar a atividade catalítica dos compostos dinucleares preparados na oxidação do 2,6-di-*tert*-butilfenol, favorecendo a obtenção da respectiva difenoquinona, monitorada espectrofotometricamente a 418 nm. Alguns dos compostos dinucleares e o tetranuclear obtido mostraram ser eficientes catalisadores na oxidação do substrato fenólico, exibindo uma dependência de pseudo-primeira ordem com relação à concentração dos complexos em estudo. Este comportamento pode ser explicado através de suas características geométricas, baseado nos cálculos estimativos de otimização de geometria, feitos com o programa HyperChem. Como o processo catalítico deve ocorrer com coordenação do oxigênio molecular e a subsequente transferência eletrônica de 2 elétrons, levando à formação da correspondente difenoquinona (ou benzoquinona) e à redução do oxigênio a peróxido de hidrogênio, a estrutura do complexo [Cu₂(apy-fen)₂Im]³⁺, mais tetragonal acaba sendo menos impedida estericamente, facilitando a coordenação do oxigênio e a aproximação do fenol ao centro bimetálico. Isto explicaria a alta

reatividade deste composto. Este mesmo composto também apresentou elevada atividade pró-oxidante (formação do radical hidroxil) frente ao peróxido de hidrogênio, mostrando que o composto também favorece etapas monoelétrônicas.

Estes estudos foram estendidos para um outro substrato, catecol, visando ampliar as possibilidades de uso dos compostos estudados em catálise. Neste caso, realizaram-se experimentos cinéticos para comparar a atividade catalítica dos compostos preparados na oxidação da L-dopa, favorecendo a obtenção da respectiva dopaquinona e sua posterior polimerização, monitorada espectrofotometricamente a 475 nm. À medida em que elevamos o pH ocorre um aumento da velocidade de reação. Portanto, o deslocamento do equilíbrio para a formação dos compostos dinucleares e tetranuclear, com o aumento do pH, favorece a reação catalítica.

Observou-se que os compostos: $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$ são melhores catalisadores para a oxidação da L-dopa em meio aquoso quando comparados com os compostos: $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$. Este comportamento pode ser explicado através do tipo de ligante coordenado ao redor do cobre(II). Para os compostos $[\text{Cu}_4(\text{apy-epy})_4(\text{Im})_4]^{4+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-epy})_2\text{Im}]^{3+}$, verifica-se maior hidrofiliabilidade com maior quantidade de anéis piridínicos comparados aos outros complexos dinucleares $[\text{Cu}_2(\text{apy-bz})_2\text{Im}]^{3+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{apy-fen})_2\text{Im}]^{3+}$, facilitando a aproximação da L-dopa, considerado um substrato mais polar que o 2,6-di-*tert*-butilfenol.

Nossos estudos mostraram que diferentes ligantes coordenados ao redor do íon cobre(II) podem ter influência na sua atividade catalítica. Consequentemente, características estéricas, hidrofobicidade, acessibilidade do substrato ao íon metálico e polaridade do substrato também são fatores que devem ser considerados no processo de oxidação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A.M.D.C. Ferreira, *Revista Universidade de Guarulhos – Ciências Exatas e Tecnológicas*, 1998, **III** (4), 5.
2. a) N. Kitajima, *Adv. Inorg. Chem.*, 1992, **39**, 1.
3. E. T. Adman, *Adv. Protein. Chem.*, 1991, **42**, 145.
4. G. Wilkinson, J. A. Gillard e McCleverty, *Comprehensive Coordination Chemistry – The Synthesis, Reactions, Properties & Applications of Coordination Compounds*, v. 6, Pergamon Press, Nova York 1987.
5. G. E. Norris, B. F. Anderson e E. N. Baker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 2784.
6. Y. Nako, M. Oonish, U. Tamoko, H. Kashiara, S. Suzuki, M. Sakai e Y. Fukuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1994, **67**, 2586.
7. W. Kaim e J. Rall, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1996, **35**, 43.
8. E. Spodine e J. Manzur, *Coord. Chem. Rev.*, 1992, **119**, 171.
9. J. Costamagna, J. Vargas, R. Latorre, A. Alvarado e G. Mena, *Coord. Chem. Rev.*, 1992, **119**, 67.
10. T. Yaping, F. Yunzhong, L. Qinhmi, S. Mengchang, L. Qin e S. Wenmei, *Free Rad. Biol. Med.*, 1992, **13**, 533.
11. M. Fontecave e J.-L. Pierre, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, **170**, 125.
12. C. Y. Shen, M. F. Hu, Q.-H. Luo e M. C. Shen, *J. Inorg. Biochem.*, 1997, **68**, 195.
13. A. Messerschmidt, *Structure and Bonding*, **vol. 90** ed. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1998.
14. N. Kitajima, K. Fujisawa, Y. Moro-Oka e K. Toriumi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 8975.
15. G. Kolks, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **17**, 5804.
16. J.-P. Costes, F. Dahan, M. B. F. Fernandez, M. I. Fernandez Garcia, A. M. Garcia Deibe e J. Sanmartin, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **274**, 73.
17. F. E. Mabbs e D. J. Machin, *Magnetism and Transition Metal Complexes*, Chapman Hall, London, 1973.
18. P. Tordo, *Electron Paramagnetic Resonance*, 1998, **16**, 116.

19. P. F. Knowles, D. Marsh e H. W. E. Rattle, *Magnetic Resonance of Biomolecules*, John Wiley & Sons, New York, 1976.
20. J. Müller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengfelder, J. Strächle e F. U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, 1995, **233**, 11.
21. W. W. Umbert, R. H. Burris e J. F. Stauffer, *Manometric and Biochemical Techniques*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1972.
22. W. D. Chandler, E. J. Lee e D. G. Lee, *J. Chem. Educ.*, 1987, **64**, 878.
23. M. C. A. Ribeiro, Atividade Catalítica de Ferriprotoporfirina IX em Reações do Peróxido de Hidrogênio na Presença da Cloroquina, Tese de Doutorado, I.Q. – USP, 1995.
24. O. W. Howart e J. R. Hunt, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1979, **9**, 1388.
25. M. Z. Hoffman, *J. Chem. Educ.*, 1983, **60**, 784.
26. T. G. Fawcett, E. E. Bernarducci, K. K. -Jespersen e H. J. Schugar, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 2598.
27. C. M. Jones, C. R. Johnson, S. A. Asher e R. E. Shepherd, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 3772.
28. J. E. Huheey, E. A. Keiter e R. L. Keiter, *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*, Harper Collins Publ., 1993, 409.
29. a) Douglas, D. H. McDaniel e J. J. Alexander, *Concepts and Models of Inorganic Chemistry*, J. Wiley, N.Y., 1983; b) S. F. A. Kettle, *Physical Inorganic Chemistry, A Coordination Chemistry Approach*, Oxford Univ. Press, 1998.
30. N. Matsumoto, T. Nozaki, H. -I. Motoda, M. Ohba, G. Mago e H. Okawa, *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, 1993, , 2157.
31. M. Mimura, T. Matsuo, T. Nakashima e N. Matsumoto, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 3553.
32. N. Matsumoto, Y. Motoda, T. Matsuo, T. Nakashima, N. Re, F. Dahan e J. -P. Tuchagues, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 1165.
33. K. Hussain Reddy, P. S. Reddy, P. R. Babu, *J. Inorg. Biochemistry*, 1999, **77**, 169.
34. P. Teyssie, J. J. Charette, *Spectrochem. Acta*, 1963, **19**, 1407.
35. J. A. Faniran, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1974, **36**, 1547.

36. F. A. Botino, P. Finochioro, E. Libertini, *J. Coord. Chem.*, 1988, **16**, 341.
37. A. M. Ramadan e M. M. El. Naggat, *J. Inorg. Biochem.*, 1996, **63**, 143.
38. K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectroscopy of Inorganic and Coordination Compounds*, 1997, 5ª ed., J. Wiley, Nova York.
39. R. -G. Xiong, B. -L. Song, J. -L. Zuo e X. -Z. You, *Polyhedron*, 1996, **15**, 903.
40. C. -M. Liu, R. -G. Xiong e Y. -Z. You, *Polyhedron*, 1997, **16**, 119.
41. D. W. Johnson, H. K. Mayer, J. P. Minard, J. Banaticla e C. Miller, *Inorg. Chim. Acta*, 1988, **144**, 167.
42. R. M. Silverstein, G. C. Bassler, T. C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 1991, 5ª ed., J. Wiley, Nova York.
43. H. Miyasaka, S. Okamura, T. Nakashima e N. Matsumoto, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 4329.
44. D. A. Carter e J. E. Pemberton, *J. of Raman Spectroscopy*, 1997, **28**, 939.
45. T. Miura, T. Satoh, A. Hori-i e H. Takeuchi, *J. of Raman Spectroscopy*, 1998, **29**, 41.
46. M. Mimura, T. Matsuo, T. Nakashima e N. Matsuomoto, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 3553.
47. a) D. P. Shoemaker e G. M. Gerland, *Experiments in Physical Chemistry*, McGraw Hill, N.Y., 2ª ed., 1967; b) H. E. Toma, A.M.D.C. Ferreira e V. K. L. Osório, *J. Chem. Ed.*, 1983, **60**, 600.
48. B. N. Figgis e J. Lewis, In: "Modern Coordination Chemistry", J. Lewis e R. J. Wilkins, eds., Interscience, N.Y., 1960.
49. C. -L. O'Young, J. C. Dewan, H. R. Lilienthal e S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 7291.
50. G. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham, R. C. Denney, *Análise Química Quantitativa Vogel*, Guanabara Koogan, 5ª ed., 1992.
51. W. J. Geary, *Coord. Chem. Rev.*, 1971, **7**, 81-122.
52. P. W. Atkins, *Físico-Química*, vol. 2, 6ª ed., 1997.
53. F. E. Mabbs e D. Collison, *Electron Paramagnetic Ressonance of d Transition Metal Compounds*, N.Y., 1992.

54. G. J. A. A. Koolhaas, P. M. van Berkel, S. C. van der Slot, G. Mendoza-Diaz, W. L. Driessen e J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 3525.
55. *Comprehensive Coordination Chemistry*, G. Wilkinson, R. D. Gillard e J. A. Cleverty, eds, Pergamon Press, vol. 5, U. K., 1987, 652.
56. C. Béguin, P. Chautemps, J. -L. Pierre, E. Saint-Aman, G. Serratrice, *Bull Soc. Chim. Fr.*, 1997, **134**, 635.
57. M. G. B. Drew, S. M. Nelson e J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 1982, **64**, 189.
58. M. S. Haddad e D. N. Hendrickson, *Inorg. Chem.*, 1978, **17**, 2622.
59. H.-L. Zhu, L.-M. Zheng, D.-G. Fu, P. Huang, W.-M. Bu, W.-X. Tang, *Inorg. Chim. Acta*, 1999, **287**, 52.
60. G. Batra e P. Mathur, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 1575-1580.
61. G. R. Buettner, L. W. Oberley (Ed), *Superoxide Dismutase*, vol 2, CRC Press, Boca Raton, 1982, 63.
62. *Comprehensive Coordination Chemistry*, G. Wilkinson, R. D. Gillard e J. A. Cleverty, eds, Pergamon Press, U. K., 1987, **vol. 5**, p. 652.
63. E. B. Fleischer, J. M. Palmer, T. S. Srivastava, A. J. Chattergee, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 3162.
64. M. F. M. Tavares, *Química Nova*, 1996, **19**(2), 173-181.
65. C. Li e L. M. Martin, *Anal. Biochem.*, 1998, **263**, 72.
66. G. Tabbi, W. L. Driessen, J. Reedijk, R. P. Bonomo, N. Ueldman e A. L. Spek, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 1168.
67. A.M.D.C. Ferreira e H. E. Toma, *J. Coord. Chem.*, 1988, **18**, 351.
68. M. L. P. dos Santos, A. Faljoni-Alário, A. S. Mangrich e A.M.D.C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **71**, 71.
69. R. D. Sinisterra, R. V. Mielli, C. A. A. Carvalho, W. G. da Silva, A. S. Mangrich e A.M.D.C. Ferreira, *J. Inclusion Phenom.*, 1999, **33**, 203.
70. T. Yaping, F. Yunzhong, L. Qinhuai, S. Mengchang, L. Qin e S. Wenmei, *Free Rad. Biol. Med.*, 1992, **13**, 533.
71. M. Fontecave e J.-L. Pierre, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, **170**, 125.
72. C. Y. Shen, M. F. Hu, Q.-H. Luo e M. C. Shen, *J. Inorg. Biochem.*, 1997, **68**, 195.

73. M. R. Malachowski, B. Dorsey, J. G. Sackett, R. S. Kelly, A. L. Ferko e R. N. Hardin, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, **249**, 85.
74. A. Azzi, *Experientia*, 1984, **40**, 906.
75. J. A. Cowan, *Inorganic Biochemistry an Introduction*, VCH Publishers Inc, N.Y., 1993.
76. C. R. Brand e R. V. Eldik, *Chem. Rev.*, 1995, **95**, 143.
77. F. Z. Meerson, V. V. Didenko, L. M. Belkina, E. B. Manukhina, K. C. Chow (Ed), *Celular Antioxidant Defense Mechanisms*, CRC Press, Boca Raton, 1988, 216.
78. J. M. McCord e J. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1969, 244.
79. J. L. Farber, M. E. Kyle e J. B. Coleman, *Lab. Invest.*, 1990, **62**, 670.
80. B. A. Freeman e J. D. Crapo, *Lab. Invest.*, 1982, **47**, 412.
81. D. M. Miller, G. R. Buettner e S. D. Aust, *Free Rad. Biol. Med.*, 1990, **8**, 95.
82. S. Oga, *Fundamentos de Toxicologia*, Atheneu, São Paulo, 1996, 37.
83. E. Y. Janzen, *Acc. Chem. Res.*, 1971, **4**, 31.
84. Z. M. Galbács e L. J. Csányi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1983, 2353.
85. H. Siegel, C. Flierl e R. Griesser, *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, **91**, 1061.
86. K. C. Francis, D. Cummins e J. Oakes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1985, 493.
87. B. de Barros Neto I. S. Scarminio e R. E. Bruns, *Planejamento e Otimização de Experimentos*, ed. Unicamp, SP, 1995.
88. a) B. Jung, K. D. Karlin e A. D. Zuberbühler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 3763. b) J. A. Halfen, S. Mahapatra, E. C. Wilkinson, S. Kaderli, V. G. Young Jr., L. Que Jr., A. D. Zuberbühler e W. B. Tolman, *Science*, 1996, **271**, 1397.
89. N. Kitajima, *Adv. In Inorg. Chem.*, 1992, **39**, 1.
90. Z. Tyeklar e K. D. Karlin, Functional models for hemocyanin and copper monooxygenases, In: *Bioinorganic Chemistry of Copper*, Chapman & Hall, New York, 1993, p. 277.
91. E. Spodine e J. Manzur, *Coord. Chem. Rev.*, 1992, **119**, 171.
92. M. R. Malachowski, B. Dorsey, J. G. Sackett, R. S. Kelly, A. L. Ferko e R. N. Hardin, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, **249**, 85.

93. A. Zombeck, R. S. Drago, B. B. Corden e J. H. Gaul, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 7580.
94. N. Kitajima, T. Koda, Y. Iwata e Y. Moro-Oka, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 8833.
95. A. E. Martell, R. Menif, P. M. Ngwenya e D. A. Rockcliffe, Dioxygen Activation and Transport by Dinuclear Copper (I) Macrocyclic Complexes, In: *Bioinorganic Chemistry of Copper*, Chapman & Hall, New York, 1993, p. 325-337.
96. E. Monzani, L. Quinti, A. Perotti, M. Gullotti, L. Randaccio, S. Geremia, G. Nardin, P. Faleschini, G. Tabbi e L. Casella, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 553.
97. S. Torelli, C. Belle, I. G.-Luneau e J. L. Pierre, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 3526.
98. W. Kaim, T. B. Schvederski, 1994 - Bioinorganic Chemistry: *Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, J. Wiley, N.Y.
99. M. R. Malachowski, H. B. Herynh, L. J. Tonlinson, R. S. Kelly e J. W. Furbee Jun, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1995, 31-36.