

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

AVALIAÇÃO MIMÉTICA DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA SUPERÓXIDO
DISMUTASE E DE CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS DE COBRE DERIVADOS
DE AMINAS DE FURANOS E TIOFENOS.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SIDNEI FLORES DE PELLEGRIN

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2019

Sidnei Flores de Pellegrin

AVALIAÇÃO MIMÉTICA DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA SUPERÓXIDO
DISMUTASE E DE CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS DE COBRE DERIVADOS
DE AMINAS DE FURANOS E TIOFENOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Davi Fernando Back

Santa Maria, RS

2019

de Pellegrin, Sidnei
AVALIAÇÃO MIMÉTICA DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA
SUPERÓXIDO DISMUTASE E DE CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS DE
COBRE DERIVADOS DE AMINAS DE FURANOS E TIOFENOS. /
Sidnei de Pellegrin.- 2019.
165 p.; 30 cm

Orientador: Davi Back
Coorientador: Cristiano Giacomelli
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

1. Complexo de cobre 2. Piridoxal 3. Superóxido
dismutase 4. Segurança farmacológica 5. DNA I. Back, Davi
II. Giacomelli, Cristiano III. Título.

Sidnei Flores de Pellegrin

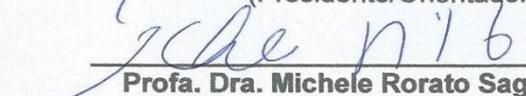
**AVALIAÇÃO MIMÉTICA DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA SUPERÓXIDO
DISMUTASE E DE CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS DE COBRE DERIVADOS
DE AMINAS DE FURANOS E TIOFENOS.**

Dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

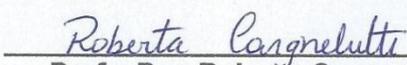
Aprovado em 19 de junho de 2019:



Prof. Dr. Davi Fernando Back
(Presidente/Orientador)



Profa. Dra. Michele Rorato Sagrillo (UFN)



Profa. Dra. Roberta Cargnelutti (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, minha maior fonte espiritual, pela dádiva de viver com plenitude nessa existência e a Nossa Senhora de Fátima e a Nossa Senhora Medianeira por sempre estarem ao meu lado iluminando meus passos para vencer todos os desafios almejados.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe Nelci e meu pai Antão, por me educarem, ensinando valores que pretendo passar a meus filhos. Sei que não foi fácil, mas vocês são meus verdadeiros heróis. Obrigado por estarem comigo em todos os momentos da minha vida, ajudando a enfrentar as tristezas e comemorando a cada conquista.

Ao professor Davi, pela orientação, profissionalismo e competência. Agradeço também, pela confiança em mim depositada, me ajudando na transição da área educacional para a inorgânica.

A banca examinadora Michele Sagrillo e Roberta Cargnelutti, por gentilmente aceitarem colaborar com essa dissertação.

A Universidade Federal de Santa Maria pela a infraestrutura e aos professores que em sua grande maioria, visam a qualidade do ensino.

Aos funcionários Ademir e Valéria que buscam de todas as formas ajudarem os estudantes na parte burocrática da pós-graduação.

A Universidade Franciscana, em especial a professora Michele e o professor Alencar pelas contribuições e ensinamentos transmitidos durante as atividades realizadas na UFN.

A CAPES pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Aos agregados do Laboratório: Carolina e Renne por sempre estarem por perto quando se precisa.

Aos colegas de Laboratório: As meninas da iniciação: Letícia, por me ajudar durante as SODs; Luísa, pelos PFs realizados; Jennyfer, por me auxiliar nos IVs.

Ao Francisco, te agradeço imensamente por esses 2 anos que estudamos e trabalhamos juntos, nossa amizade já transpôs a química é para a vida.

A Josiéli, que me trouxe de volta a química inorgânica e por ser essa amiga que posso contar em todos os momentos da minha vida.

Por fim, agradeço a quem de alguma forma contribuiu para o desenvolvimento desse trabalho.

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

Geroge Bernard Shaw

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

AVALIAÇÃO MIMÉTICA DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE E EFEITOS CITOTÓXICOS DE COMPLEXOS DE COBRE DERIVADOS DE AMINAS DE FURANOS E TIOFENOS.

Autor: Sidnei Flores de Pellegrin

Orientador: Prof. Dr. Davi Fernando Back

Este trabalho expõe a síntese, caracterização, avaliação do potencial mimético a atividade catalítica da enzima superóxido dismutase e efeitos citotóxicos de complexos de cobre.

Os complexos foram obtidos a partir da condensação aldólica entre aminas aromáticas (furfurilamina, 2-tiofenoetilamina e 2-tiofenometilamina) e aldeídos aromáticos (aldeído salicílico, orto-vanilina e cloridrato de piridoxal). Os complexos foram caracterizados estruturalmente por difração de raios X, voltametria cíclica e por métodos espectroscópicos de infravermelho com transformada de Fourier, RAMAN e na região do ultravioleta/visível.

Posteriormente, os compostos foram submetidos a metodologia de fotorredução do NBT (cloreto de azul nitrotetrazólio) para quantificação da atividade antioxidante. Os principais resultados de concentração inibitório destas substâncias foram para os complexos obtidos a partir do cloridrato de piridoxal.

Além disso, os complexos foram submetidos a testes dos possíveis efeitos citotóxicos em células, como as metodologias de ensaio fluorimétrico por reagente *DNA-PicoGreen®*, técnica MTT, teste de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) e ensaio de óxido nítrico.

Palavras-chaves: complexo de cobre, piridoxal, superóxido dismutase, segurança farmacológica, DNA.

ABSTRACT

DISMUTASE SUPEROXIDE EVALUATION OF CATALYTIC MIMETIC ACTIVITY AND CYTOTOXIC EFFECTS FROM FURAN AND THYOPHENE AMINES OF COPPER COMPLEX DERIVATIVES.

Author: Sidnei Flores de Pellegrin

Advisor: Prof. Dr. David Fernando Back

This work evidences the synthesis, characterization, evaluation of superoxide dismutase mimetic catalytic activity, and cytotoxic effects of copper complexes.

The complexes were obtained from aldol condensation between aromatic amines (furfurylamine, 2-thiopheneethylamine, and 2-thiophenemethylamine) and aromatic aldehydes (salicylic aldehyde, ortho-vanillin, and pyridoxal hydrochloride). The complexes were structurally characterized by X-ray diffraction, cyclic voltammetry, infrared, Raman, and ultraviolet/visible spectroscopic methods.

Subsequently, the compounds were submitted to NBT (nitrotetrazolium chloride blue) photoreduction methodology to quantify antioxidant activity. The best results were evidenced for complexes containing pyridoxal derivatized.

In addition, the complexes were tested for possible cytotoxic effects in cells, such as DNA-PicoGreen® reagent fluorimetric methodologies, MTT technique, dichlorofluorescein diacetate test (DCFH-DA), and nitric oxide assay.

Keywords: copper complex, pyridoxal, superoxide dismutase, pharmacological safety, DNA.

SUMÁRIO

1. Introdução	21
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. Revisão bibliográfica	26
3.1: Iminas.....	26
3.2: Furfurilamina e seus derivados calcogênios.....	27
3.3: Vitamina B6 (Piridoxal).....	29
3.4: Espécies reativas de oxigênio e Superóxido Dismutase.....	35
3.5: Superóxido Dismutase SOD.....	36
3.6: Compostos sintéticos que apresentam atividade catalítica mimética da enzima superóxido dismutase.....	40
3.6: Segurança farmacológica de complexos.....	43
4. Parte Experimental	50
4.1. Aspectos Gerais.....	50
4.2 Materiais e Métodos.....	50
4.2.1 Ponto de Fusão.....	50
4.2.2 Espectroscopia no Infravermelho.....	50
4.2.3 Espectroscopia RAMAN.....	51
4.2.4 Espectroscopia Eletrônica UV/Visível.....	51
4.2.5 Voltametria Cíclica.....	51
4.2.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	52
4.2.7 Difração de raios X de monocristal.....	52
4.2.8 Coleta de sangue para testes de citotoxicidade.....	53
4.2.9 Separação de células mononucleares do sangue periférico.....	53
4.2.10 Avaliação da Viabilidade Celular pela Técnica MTT.....	54

4.2.11 Ensaio de quantificação de DNA fluorimétrico por reagente DNA-PicoGreen®.....	54
4.2.12 Teste de óxido nítrico	54
4.2.13 Teste de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)	55
4.3 Síntese dos compostos	55
4.3.1 Síntese dos ligantes	55
4.3.1.1 Ligante L1 (2-Hidroxibenzilideno metano furano).....	55
4.3.1.2 Ligante L2 (3-hidroxi-5-(hidroximetil) -2-metil-4-metano furanodieno)....	56
4.3.1.3 Ligante L3 (2-Hidroxibenzilideno etano tiofeno)	57
4.3.1.4 Ligante L4 (3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metil-4-etano tiofenileno)	58
4.3.1.5 Ligante L5 (2-Hidroxi-3-metoxibenzilideno etano furano).....	59
4.3.1.6 Ligante L6 (2-Hidroxi-3-metoxibenzilideno etano tiofeno)	60
4.3.1.7 Ligante L7 (2-Hidroxibenzilideno metano tiofeno)	61
4.3.1.8 Ligante L8 (3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metil-4-metano tiofenileno)	62
4.3.1.9 Ligante L9 (2-Hidroxi-3-metoxibenzilideno metil tiofeno).....	62
4.3.2 Síntese dos complexos	63
4.3.2.1 Complexo C1:.....	63
4.3.2.2 Complexo C2:.....	64
4.3.2.3 Complexo C3:.....	65
4.3.2.4 Complexo C4:.....	66
4.3.2.5 Complexo C5:.....	67
4.3.2.6 Complexo C6:.....	68
4.3.2.7 Complexo C7:.....	69
4.3.2.8 Complexo C8:.....	70
4.3.2.9 Complexo C9:.....	71
5. Apresentação dos resultados.....	74
5.1.Resultados cristalográficos.....	74

5.1.1. Grupo espacial $P1$	74
5.1.2. Grupo espacial $P2_1/n$	79
5.1.3. Grupo espacial $P2_1/c$	83
5.1.4. Grupo espacial $C2/c$	86
5.1.5. Grupo espacial $Pnna$	89
5.1.6. Grupo espacial $Pbca$	92
5.2. Análise estrutural de complexos e ligantes por meio da espectroscopia vibracional na região do infravermelho:	99
5.3. Análise estrutural de complexos e ligantes por meio da espectroscopia RAMAN:.....	100
5.4. Avaliação da atividade mimética ao sítio ativo da enzima superóxido dismutase.....	102
5.6. Análise dos efeitos citotóxicos causados pelos compostos em células.	106
5.6.1. Teste de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio):	106
5.6.2. Ensaio de quantificação de DNA fluorimétrico por reagente DNA-PicoGreen®:	107
5.6.3. Teste de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA):.....	108
5.6.4. Teste de óxido nítrico:.....	110
6. Conclusões e perspectivas	113
6.1: Conclusões	113
6.2 Perspectivas.....	114
7. Anexos	116
7.1 Espectros de Infravermelho	116
7.2 Espectros de espectroscopia RAMAN	126
7.3 Espectros de espectroscopia UV-Vis.....	132
8.4 Espectros de espectroscopia UV-Vis. Estabilidade em solução.....	141
7.5 Espectros de RMN 1H	147

7.6 Parametros Cristalográficos	155
8. Referências	160

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Mecanismo de formação da Base de Schiff	26
Esquema 2: Representação do processo de transaminação.	31
Esquema 3: Ciclo do Oxigênio.	36
Esquema 4: Mecanismo de dismutação do íon superóxido pela enzima SOD-1.	39
Esquema 5: Síntese do ligante 3,4-bis((2-hidroxinaftalen-1-il)metilenoamino)benzenosulfônico	40
Esquema 6: Formação do complexo de Cu(II).	43
Esquema 7: Esquema reacional ligante L1.	56
Esquema 8: Esquema reacional ligante L2.	57
Esquema 9: Esquema reacional ligante L3.	58
Esquema 10: Esquema reacional ligante L4.	59
Esquema 11: Esquema reacional ligante L5.	60
Esquema 12: Esquema reacional ligante L6.	61
Esquema 13: Esquema reacional ligante L7.	61
Esquema 14: Esquema reacional ligante L8.	62
Esquema 15: Esquema reacional ligante L9.	63
Esquema 16: Esquema reacional complexo C1.	64
Esquema 17: Esquema reacional complexo C2.	65
Esquema 18: Esquema reacional complexo C3.	66
Esquema 19: Esquema reacional complexo C4.	67
Esquema 20: Esquema reacional complexo C5.	68
Esquema 21: Esquema reacional complexo C6.	69
Esquema 22: Esquema reacional complexo C7.	70
Esquema 23: Esquema reacional complexo C8.	71
Esquema 24: Esquema reacional complexo C9.	72
Esquema 25: Esquema reacional complexo C10.	72
Esquema 26: Ensaio utilizando o NBT para avaliar a atividade catalítica da enzima SOD-1.	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular dos complexos de manganês(III)	27
Figura 2: Estrutura molecular dos complexos de prata(I).	29
Figura 3: Representação das formas da Vitamina B6.	30
Figura 4: Representação da estrutura molecular do complexo de cobre(II).	32
Figura 5: Representação das estruturas moleculares dos complexos de molibdênio(VI).....	33
Figura 6: Representação complexos de cobalto(III).	34
Figura 7: Representação do orbital molecular do superóxido.....	36
Figura 8: Formas da Superóxido Dismutase em organismos variados.....	37
Figura 9: Sítio ativo da Cu/ZnSOD.....	38
Figura 10: Representação da estrutura cristalina das formas oxidada e reduzida do átomo de Cu na enzima (Cu-Zn-SOD).....	39
Figura 11: Representação complexo de manganês(II).	41
Figura 12: Representação dos complexos de cobre(II).	42
Figura 13: Ensaio MTT para o complexo de Cu(II).	44
Figura 14: Anéis porfirínicos com substituintes variados.	44
Figura 15: Ensaio de quantificação de DNA fluorimétrico por reagente DNA-PicoGreen® para os anéis porfirínicos.	45
Figura 16: Complexo de cobre (II) para a análise de diacetato de diclorofluoresceína.	46
Figura 17: Teste de diacetato de diclorofluoresceína para o complexo de Cu(II).	46
Figura 18: Estrutura do Cluster Miner2.	47
Figura 19: Teste óxido Nítrico para o cluster de Fe.	47
Figura 20: Projeção da estrutura molecular dos complexos C1, C3 e C10, respectivamente..	75
Figura 21: Estrutura molecular de complexo com quatro átomos de cobre(II).....	77
Figura 22: Projeção da estrutura molecular do complexo C7..	77
Figura 23: Projeção do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C1 no plano <i>cb</i> (a), diagrama de operadores de simetria do grupo espacial <i>P1</i> (b).	79
Figura 24: Projeção da estrutura molecular do complexo C4 e C8, respectivamente..	80

Figura 25: Projeção do empacotamento cristalino na cela unitária (a) e diagrama de operadores de simetria (b) do complexo C4 no plano <i>ca</i> , grupo espacial $P2_1/n$	82
Figura 26: Projeção da estrutura molecular do complexo C5. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%.	84
Figura 27: Projeção do empacotamento cristalino na cela unitária (a) e diagrama de operadores de simetria (b) do complexo C5 no plano <i>ab</i> , grupo espacial $P2_1/c$	85
Figura 28: Projeção da estrutura molecular do complexo C9.	87
Figura 29: Projeção do empacotamento cristalino na cela unitária no plano <i>ac</i> (a) e diagrama de operadores de simetria (b) do complexo C9, grupo espacial $C2/c$	88
Figura 30: Projeção da estrutura molecular do complexo C2.	90
Figura 31: Projeção do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C2 (a) e diagrama de operadores de simetria (b) do complexo C2.	91
Figura 32: Projeção da estrutura molecular do complexo C6.	93
Figura 33: Projeção do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C6 no plano <i>ca</i> (a) e diagrama de operadores de simetria (b) do complexo C6.	94
Figura 34: Distorções nos complexos C2 e C9, respectivamente.	97
Figura 35: Diagrama de Jablonski, onde: S_N : estado singlete qualquer; S_2 : segundo estado singlete, S_1 : primeiro estado singlete; S_0 : estado fundamental e T_1 : estado tripleto.	101
Figura 36: (a) Voltamograma cíclico comparativo dos complexos C1, C2, C5 e C7. (b) Voltamograma cíclico comparativo dos complexos C3, C4, C6, C8, C9 e C10.	105
Figura 37: Ensaio MTT	107
Figura 38: Teste DNA-Picogreen	108
Figura 39: Teste de diacetato de diclorofluoresceína.	110
Figura 40: Teste de Óxido Nítrico.	111
Figura 41: Espectro de infravermelho do ligante L1.	116
Figura 42: Espectro de infravermelho do ligante L2.	117
Figura 43: Espectro de infravermelho do ligante L3.	117
Figura 44: Espectro de infravermelho do ligante L4.	118
Figura 45: Espectro de infravermelho do ligante L5.	118
Figura 46: Espectro de infravermelho do ligante L6.	119
Figura 47: Espectro de infravermelho do ligante L7.	119
Figura 48: Espectro de infravermelho do ligante L8.	120
Figura 49: Espectro de infravermelho do ligante L9.	120

Figura 50: Espectro de infravermelho do complexo C1.	121
Figura 51: Espectro de infravermelho do complexo C2.	122
Figura 52: Espectro de infravermelho do complexo C3.	122
Figura 53: Espectro de infravermelho do complexo C4.	123
Figura 54: Espectro de infravermelho do complexo C5.	123
Figura 55: Espectro de infravermelho do complexo C6.	124
Figura 56: Espectro de infravermelho do complexo C7.	124
Figura 57: Espectro de infravermelho do complexo C8.	125
Figura 58: Espectro de infravermelho do complexo C9.	125
Figura 59: Espectro de infravermelho do complexo C10.	126
Figura 60: Espectro RAMAN complexo C1.	126
Figura 61: Espectro RAMAN Complexo C2.	127
Figura 62: Espectro RAMAN Complexo C3.	128
Figura 63: Espectro RAMAN Complexo C4.	128
Figura 64: Espectro RAMAN Complexo C5.	129
Figura 65: Espectro RAMAN Complexo C6.	129
Figura 66: Espectro RAMAN Complexo C7.	130
Figura 67: Espectro RAMAN Complexo C8.	130
Figura 68: Espectro RAMAN Complexo C9.	131
Figura 69: Espectro RAMAN Complexo C10.	131
Figura 70: Espectro UV-Vis. Ligante L1.	132
Figura 71: Espectro UV-Vis. Ligante L2.	132
Figura 72: Espectro UV-Vis. Ligante L3.	133
Figura 73: Espectro UV-Vis. Ligante L4.	133
Figura 74: Espectro UV-Vis. Ligante L5.	134
Figura 75: Espectro UV-Vis. Ligante L6.	134
Figura 76: Espectro UV-Vis. Ligante L7.	135
Figura 77: Espectro UV-Vis. Ligante L8.	135
Figura 78: Espectro UV-Vis. Ligante L9.	136
Figura 79: Espectro UV-Vis. Complexo C1.	136
Figura 80: Espectro UV-Vis. Complexo C2.	137
Figura 81: Espectro UV-Vis. Complexo C3.	137
Figura 82: Espectro UV-Vis. Complexo C4.	138
Figura 83: Espectro UV-Vis. Complexo C5.	138

Figura 84: Espectro UV-Vis. Complexo C6.	139
Figura 85: Espectro UV-Vis. Complexo C7.	139
Figura 86: Espectro UV-Vis. Complexo C8.	140
Figura 87: Espectro UV-Vis. Complexo C9.	140
Figura 88: Espectro UV-Vis. Complexo C10.	141
Figura 89: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C1.	141
Figura 90: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C2.	142
Figura 91: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C3.	142
Figura 92: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C4.	143
Figura 93: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C5.	143
Figura 94: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C6.	144
Figura 95: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C7.	144
Figura 96: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C8.	145
Figura 97: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C9.	145
Figura 98: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C10.	146
Figura 99: Espectro RMN ^1H ligante L1.	147
Figura 100: Espectro RMN ^1H ligante L2.	148
Figura 101: Espectro RMN ^1H ligante L3.	149
Figura 102: Espectro RMN ^1H ligante L4.	150
Figura 103: Espectro RMN ^1H ligante L5.	150
Figura 104: Espectro RMN ^1H ligante L6.	151
Figura 105: Espectro RMN ^1H ligante L7.	152
Figura 106: Espectro RMN ^1H ligante L8.	153
Figura 107: Espectro RMN ^1H ligante L9.	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: IC ₅₀ dos complexos e cisplatina frente a células cancerígenas.	34
Tabela 2: Distâncias interatômicas em Å.	41
Tabela 3: Concentrações das amostras utilizadas nos testes de segurança farmacológica	53
Tabela 4: Distâncias (Å) ligações C1, C3, C7 e C10.	78
Tabela 5: Comprimento das ligações da esfera de coordenação dos complexos C4 e C8.	81
Tabela 6: Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do grupo espacial $P2_1/n$	81
Tabela 7: Comprimento das ligações da esfera de coordenação dos complexos C5.	83
Tabela 8: Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do grupo espacial $P2_1/c$	84
Tabela 9: Comprimento das ligações da esfera de coordenação do complexo C9. .	86
Tabela 10: Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do grupo espacial $C2/c$	87
Tabela 11: Comprimento das ligações da esfera de coordenação dos complexos C2.	89
Tabela 12: Comprimento das ligações da esfera de coordenação dos complexos C6.	92
Tabela 13: Condições de reflexão observadas para a rede com simetria ortorrômbica do grupo espacial $Pbca$	95
Tabela 14: Ângulo das ligações dos complexos C1 - C10.	98
Tabela 15: Valores estiramentos C=N dos espectros IV dos ligantes e complexos .	99
Tabela 16: Estiramentos C=N dos espectros RAMAN dos complexos.	100
Tabela 17: Resultados IC ₅₀ e de kMcCF; Os destaques na coloração verde representam os melhores valores de IC ₅₀	104
Tabela 18: Dados eletroquímicos dos complexos.	106
Tabela 19: Parâmetros cristalográficos dos complexos C1, C2 e C3.	155
Tabela 20: Parâmetros cristalográficos dos complexos C4, C5 e C6.	156
Tabela 21: Parâmetros cristalográficos dos complexos C7, C8 e C9.	157
Tabela 22: Parâmetros cristalográficos do complexo C10.	158

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EROs	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
NBT	Cloreto de tetrazólio-nitroazul
PN	Piridoxina
PL	Piridoxal
PLP	Fosfato de piridoxal
PM	Piridoxamina
PNP	Fosfato de piridoxina
PMP	Fosfato de piridoxamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CAT	Catalase
GPx	Glutathione peroxidase
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível
IV	Espectroscopia no infravermelho
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
P. F.	Ponto de fusão
MeOH	Metanol
Et ₃ N	Trietilamina
CH ₃ CN	Acetonitrila
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsufóxido
EtOH	Etanol
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DCF	Diclorofluoresceína
ssDNA	DNA de fita simples
dsDNA	DNA de fita dupla
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico

1. Introdução

1. Introdução

Com o início da utilização do O₂ no processo de respiração, o mesmo, tornou-se imprescindível no processo de produção de energia a partir de alimentos. Onde o O₂ atua como aceptor final de elétrons nos processos de fosforização oxidativa, ocasionando um aumento da eficiência na produção de energia a partir de alimentos¹. Assim, o emprego do oxigênio tornou-se essencial na geração eficaz de energia. Porém, por outro lado, com a utilização constante de oxigênio molecular dos organismos vivos, houve (e continua havendo) um aumento excessivo na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que pode levar a danos celulares, ocasionando até mesmo a morte celular².

A produção de EROs nos seres aeróbicos faz parte do metabolismo respiratório normal, a qual apresenta funções essenciais aos organismos³. Contudo, a obtenção em excesso das EROs pode levar ao estresse oxidativo, onde o DNA, biomoléculas e tecidos circundantes são lesionados, assim, induzindo a processos inflamatórios⁴. Além disso, o estresse oxidativo está relacionado com doenças degenerativas do sistema nervoso central como Parkinson e Alzheimer^{5,6}.

Com o propósito de prevenir essa condição, os organismos possuem substâncias antioxidantes que atuam na inibição ou retardação da oxidação de substratos oxidativos dentre eles, O₂⁻, H₂O₂, peróxidos orgânicos e radical ⁻OH^{7,8}. Muitos seres vivos possuem as enzimas superóxido dismutase (SOD)⁹, a catalase (CAT)^{10,11} e a glutathiona peroxidase (GPx)¹² que desempenham funções para melhorar as defesas antioxidantes celulares, onde a SOD é responsável pela dismutação do íon superóxido em espécies menos nocivas ao organismo^{13,14}, estando essa enzima presente em duas formas no organismo, a Cu/ZnSOD presente no citosol e a MnSOD encontrada na mitocôndria^{15,16}.

A utilização da SOD em possíveis processos clínicos, como para testes que induzem a colite experimentalmente em ratos e evidenciam a capacidade da enzima antioxidante para reduzir a inflamação¹⁷, industriais e laboratoriais torna-se desfavorável devido a sua onerosa obtenção e purificação, alto valor agregado envolvido nos processos elevando o preço comercial da mesma, além da possível incompatibilidade genética, faz-se necessário o desenvolvimento de miméticos catalíticos desta enzima. Assim busca-se obter moléculas com propriedades

equivalentes as da enzima a partir de matérias primas abundantes e de baixo valor agregado.

Com a finalidade de obter miméticos da atividade catalítica do sítio ativo da SOD, foram sintetizados ligantes partindo da condensação aldólica de aldeídos aromáticos como o cloridrato de piridoxal, com aminas derivadas da furfurilamina. Sendo realizadas posteriormente, reações de complexação dos ligantes com sais de cobre.

O uso do piridoxal é justificado ao passo que, o mesmo está envolvido em diversos processos biológicos¹⁸, além de apresentar alta afinidade a coordenação de metais da primeira e segunda série de transição. No que se refere a utilização da furfurilamina deve-se a sua aplicação na produção de fármacos e de fibras, além da possibilidade de formação de Base de Schiff que possibilitam a coordenação a íons metálicos⁴⁰, sendo a furfurilamina sintetizada via aminação redutiva do furfural¹⁹.

O objetivo deste trabalho foi de sintetizar complexos contendo íons de cobre (Cu) a partir de ligantes imínicos, os quais foram caracterizados por difração de raios X de monocristais, espectroscopia de absorção UV-vis, espectroscopia vibracional RAMAN e infravermelho, bem como método eletroquímico de análise voltamétrica. Além disso, os novos compostos foram submetidos ao teste de potencial catalítico mimético ao sítio catalítico da superóxido dismutase através do ensaio de fotorredução do indicador NBT (Cloreto de tetrazólio-nitroazul) e a testes para verificar a sua segurança em aplicações farmacológicas envolvendo mecanismos de estresse oxidativo e dano de DNA, como nos testes de diacetato de diclorofluoresceína, óxido nítrico, método fluorimétrico por reagente *DNA-Picogreen®* e *MTT* (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio).

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Realizar um estudo sobre a síntese de complexos de cobre (II) com ligantes imínicos formados a partir de aldeídos aromáticos e aminas derivadas da furfurilamina. Posteriormente, avaliar o potencial catalítico mimético ao sítio ativo da superóxido dismutase dos complexos obtidos, bem como, suas seguranças *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Sintetizar e caracterizar ligantes a partir do aldeído salicílico, da orto-vanilina e do piridoxal com uma série de aminas provenientes da furfurilamina.
- 2) Complexar os ligantes sintetizados com sais de cobre, observando a influência do centro metálico na ação antioxidante e catalítica.
- 3) Caracterizar os complexos por análises de espectroscopia de infravermelho, RAMAN, ultravioleta-visível e eletroquímica, assim observando suas características químicas.
- 4) Avaliar a atividade de fotorredução do cloreto de tetrazólio-nitroazul (NBT), buscando encontrar uma possível correlação com a atividade antioxidante da superóxido dismutase (SOD).
- 5) Realizar testes sobre a segurança farmacológica, como o teste de *MTT* e o ensaio fluorimétrico por *DNA-PicoGreen®* que evidencia os danos causados ao DNA, posterior será evidenciado se ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio celular através dos testes de diacetato de diclorofluoresceína e óxido nítrico.

3. Revisão Bibliográfica

3. Revisão bibliográfica

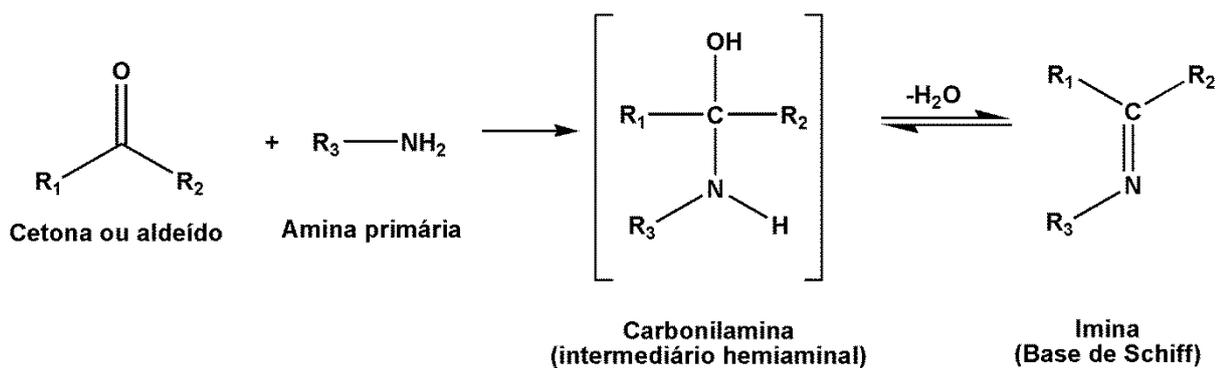
3.1: Iminas

A utilização de iminas como materiais de partida para a síntese de novos complexos é de grande interesse na química bioinorgânica^{20,21,22,23,24}, pois estas apresentam características estruturais importantes aos quais destacam-se a possibilidade de atuação como grupo aceptor de hidrogênio, doador de densidade eletrônica para anéis aromáticos, e ainda o aumento da permeabilidade celular, devido a sua maior lipofilicidade²⁵ quando comparado ao grupo amino correspondente. Diversos trabalhos já publicados comprovam também, as atividades biológicas do grupo imínico onde destacam-se atividade antimicrobiana²⁶ e anticancerígena²⁷.

A primeira rota sintética de obtenção de grupos imínicos foi realizada por Hugo Schiff em 1864, e por essa razão estes compostos, também são chamados de bases de Schiff. Esta síntese ocorre através da condensação entre compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) e aminas primárias^{21,23,28}.

A obtenção da base de Schiff parte da adição nucleofílica da amina sobre o carbono eletrofílico do aldeído, assim obtendo um intermediário hemiaminal, além de água como subproduto²⁹ (Esquema 1).

Esquema 1: Mecanismo de formação da Base de Schiff



$\text{R}_1 = \text{CH}_3 \text{ ou } \text{H}$
 $\text{R}_2 = \text{CH}_3$
 $\text{R}_3 = \text{CH}_3$

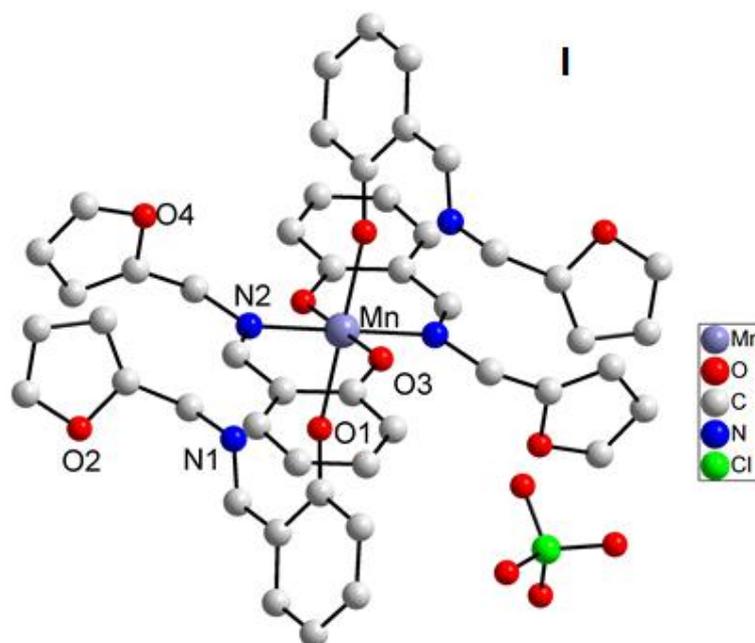
Fonte: Adaptado de Peter (1994).

3.2: Furfurilamina e seus derivados calcogênios

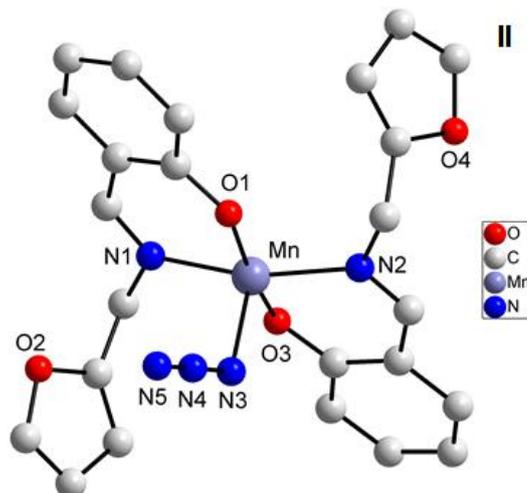
A furfurilamina é utilizada na produção de substâncias com atividades farmacológicas, bem como, no processo de produção de fibras, sendo preparada via aminação redutiva do furfural³⁰. Além disso, a furfurilamina e seus derivados são muito utilizados na química de coordenação já que apresentam átomos doadores com efeitos estéricos/eletrônicos ideais para coordenação com metais de transição. Como forma de exemplificar a versatilidade das furfurilaminas, abaixo são listadas algumas estruturas recentemente publicadas em artigos da área.

Mandal e colaboradores³¹ (2009) obtiveram complexos do tipo base de Schiff a partir da furfurilamina e aldeído salicílico juntamente a perclorato de manganês(III) hexahidratado. Na figura 1 que apresenta a estrutura **I**, o íon metal possui número de oxidação III, e geometria octaédrica distorcida, já, na estrutura **II** abaixo, o metal possui número de oxidação igual a III, porém e sua geometria é pirâmide de base quadrada distorcida. Ambos os compostos foram submetidos a testes de atividade antibacteriana, onde observou-se que o complexo **I** é ativo contra o *S. aureus* e o complexo **II** é ativo frente a *B. subtilis*.

Figura 1: Estrutura molecular dos complexos de manganês(III). Não foram representados os hidrogênios e nem solvatos de cristalização para melhor visualização.



Fonte: Adaptado de Mandal e col. (2009).

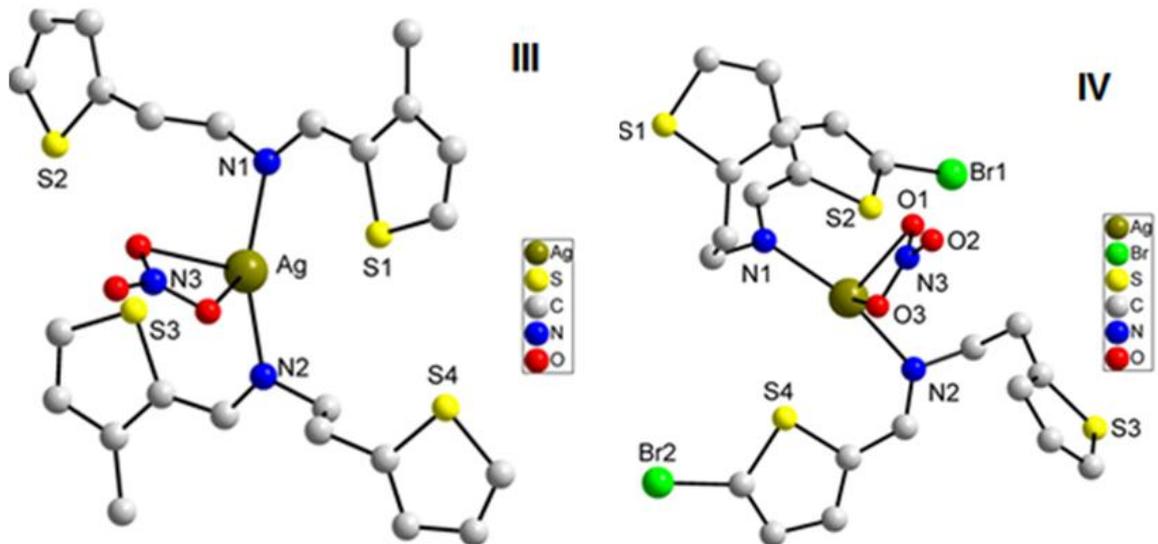


Fonte: Adaptado de Mandal e col. (2009).

Além da furfurilamina, os derivados com enxofre substituído no anel de quatro carbonos (tiofeno), apresentam relevância na síntese de novos complexos³², aos quais destacam-se propriedades biológicas na cultura de hepatócitos³³, além da atuação contra *Trypanosoma brucei rhodesiense*³⁴.

Como apresentado por Barwiolek e colaboradores (2017), que sintetizaram complexos a partir dos ligantes 2-tiofenil-etilamina com 3-metil-2-tiofenocarboxaldeído ou 5-bromo-2-tiofenocarboxaldeído com sais de prata(I). O íon metálico presente na estrutura **III** apresenta número de oxidação I, já na estrutura **IV** o íon metálico possui número de oxidação I. Ambos os complexos apresentam geometria tetraédrica distorcida, além de fluorescência e sendo ainda, bons materiais sensores de gás, que apresentam variação em suas resistências elétricas na presença de determinados gases.

Figura 2: Estrutura molecular dos complexos de prata(I). Não foram representados os hidrogênios e solvatos de cristalização para melhor visualização.



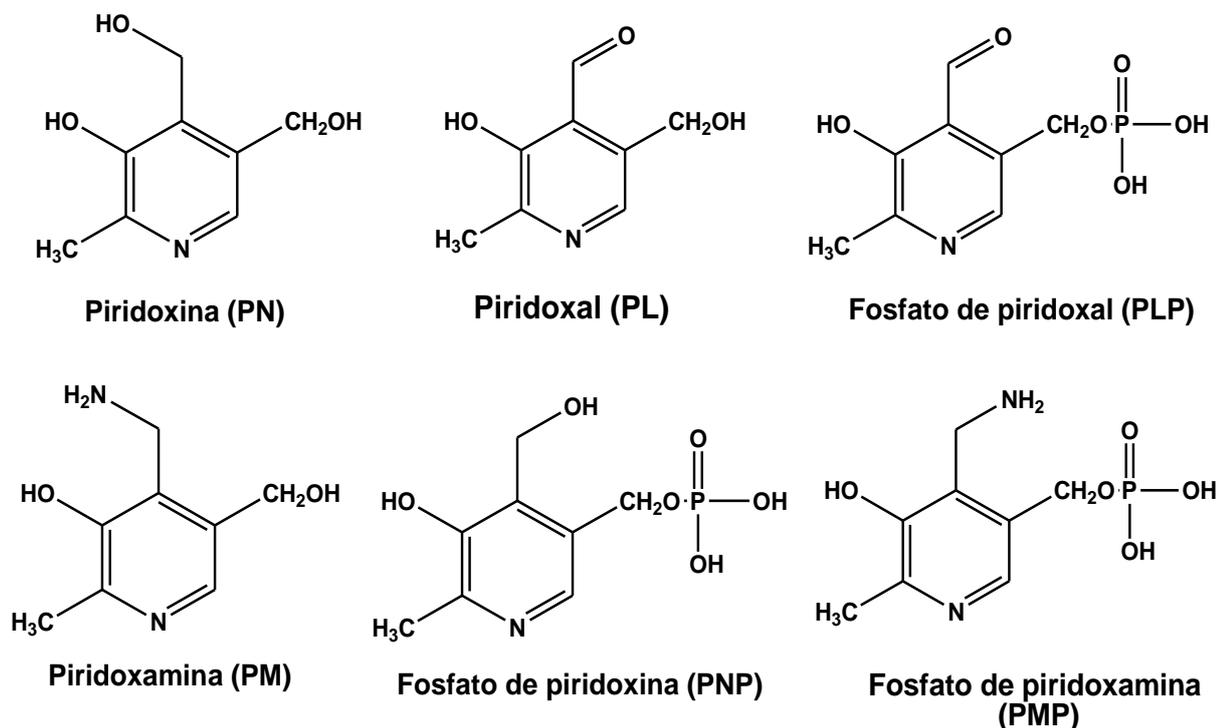
Fonte: Adaptado de Barwiolek e col. (2017).

3.3: Vitamina B6 (Piridoxal)

O grande interesse em se utilizar as derivatizações da vitamina B6 na química de coordenação se dá pela facilidade em se obter bases de Schiff contendo variados átomos para coordenação. A vitamina B6 e suas variações são utilizadas pelos mamíferos, como coenzimas nas principais vias metabólicas, apresentando funções na metabolização de proteínas, carboidratos e lipídios³⁵.

A vitamina B6 pode ser encontrada na natureza em seis formas, que são: piridoxina, piridoxal, piridoxamina e suas formas fosfatadas (figura 3).

Figura 3: Representação das formas da Vitamina B6.

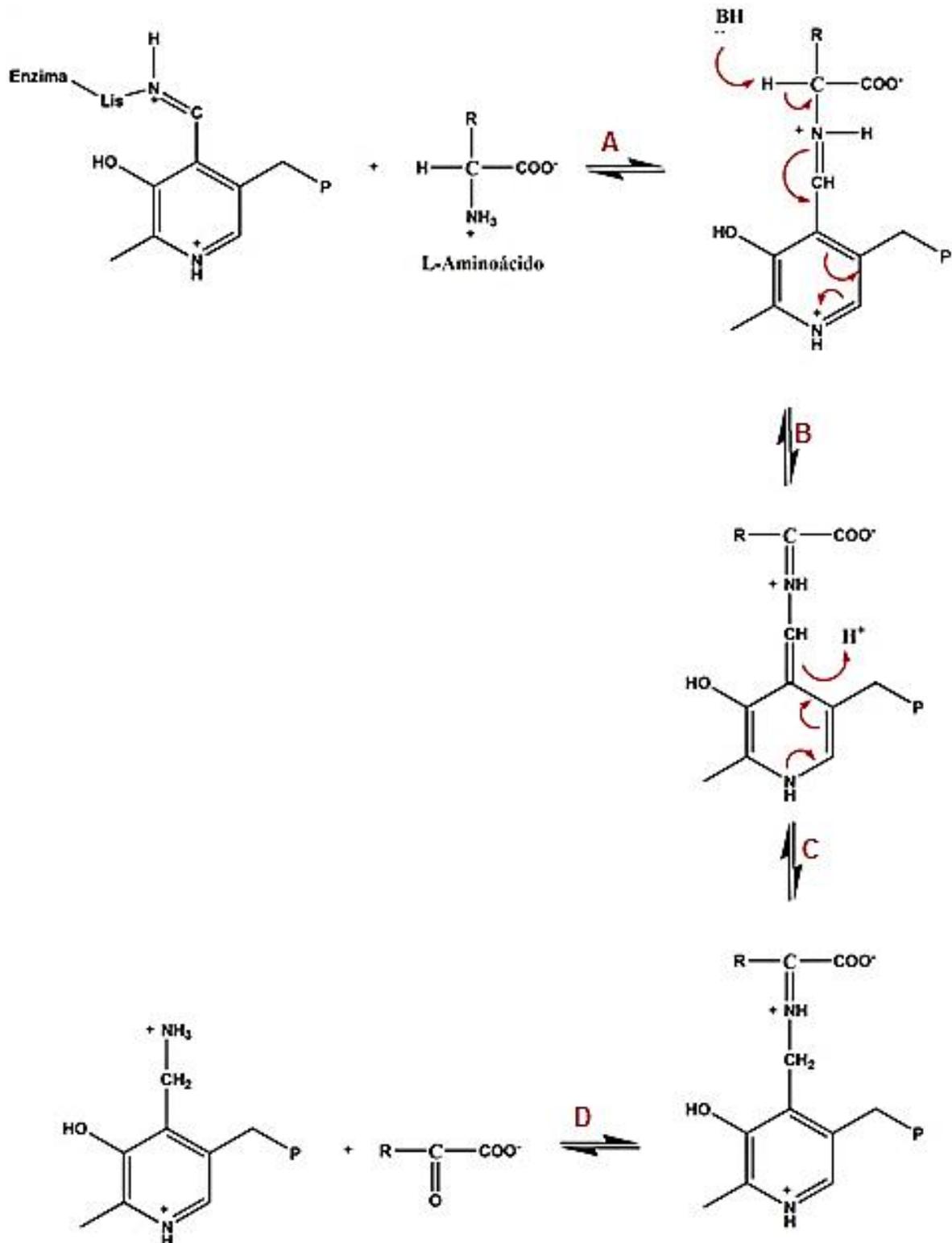


Fonte: Adaptado de Casas e col. (2012).

Dentre as formas mostradas acima, destaca-se o piridoxal 5-fosfato, que Metzler (1954)³⁶ comprovou sua presença em enzimas que catalisavam reações contendo diferentes aminoácidos, desempenhando importante papel na síntese de neurotransmissores como a noradrenalina, dopamina e serotonina³⁷.

O piridoxal 5-fosfato atua como cofator enzimático nas reações de transaminação, descarboxilação e desidratação³⁸. No processo de transaminação, os substratos (A) reagem a fim de formar um produto (B) a ser eliminado do sítio ativo, sendo este direcionado (C) para outra reação antes que a ligação com um segundo substrato seja formada. Com a ligação do aminoácido, têm-se a doação do grupo amino para o piridoxal 5 fosfato, formando um α -cetoácido. Posteriormente, outro α -cetoácido (D) liga-se a piridoxamina fosfato formada anteriormente, liberado na forma de aminoácido³⁹ (esquema 2).

Esquema 2: Representação do processo de transaminação.

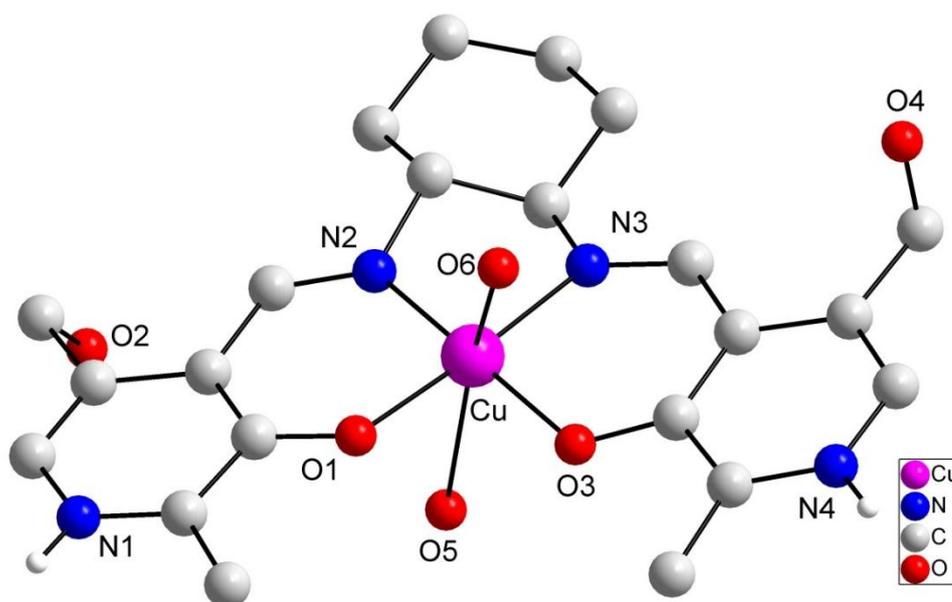


Fonte: Adaptado de Champe (1994).

Além dos processos biológicos em que o piridoxal está envolvido, o mesmo possui uma versátil química de coordenação, pois os sítios presentes como o oxigênio do fenolato e o nitrogênio da piridina apresentam alta afinidade a metais da primeira e segunda série de transição.

Mandal e colaboradores (2017)⁴⁰ apresentaram um novo ligante do tipo base de Schiff obtido a partir do cloridrato de piridoxal e 1,2-diaminociclohexano, ao qual foi complexado com perclorato de cobre, estrutura **V** na figura 4. O conjunto estrutural obtido mostra o centro de cobre(II), com geometrias octaédricas distorcidas. Ainda foram realizados testes da atividade fosfatase, onde o substrato éster de monofosfato, sal dissódico de (4-nitrofenil) fosfato hexa-hidratado (4-NPP), foi utilizado para verificar tal atividade. Os comprimentos das ligações encontradas para os complexos foram: Cu1-N2 1,931 Å; Cu1-N3 1,947 Å; Cu1-O1 1,896 Å; Cu1-O2 1,893 Å; Cu2-N6 1,940 Å; Cu2-N7 1,940 Å; Cu2-O5 1,897 Å; Cu2-O6 1,880 Å, estes estão de acordo com dados já disponibilizados na literatura⁴¹.

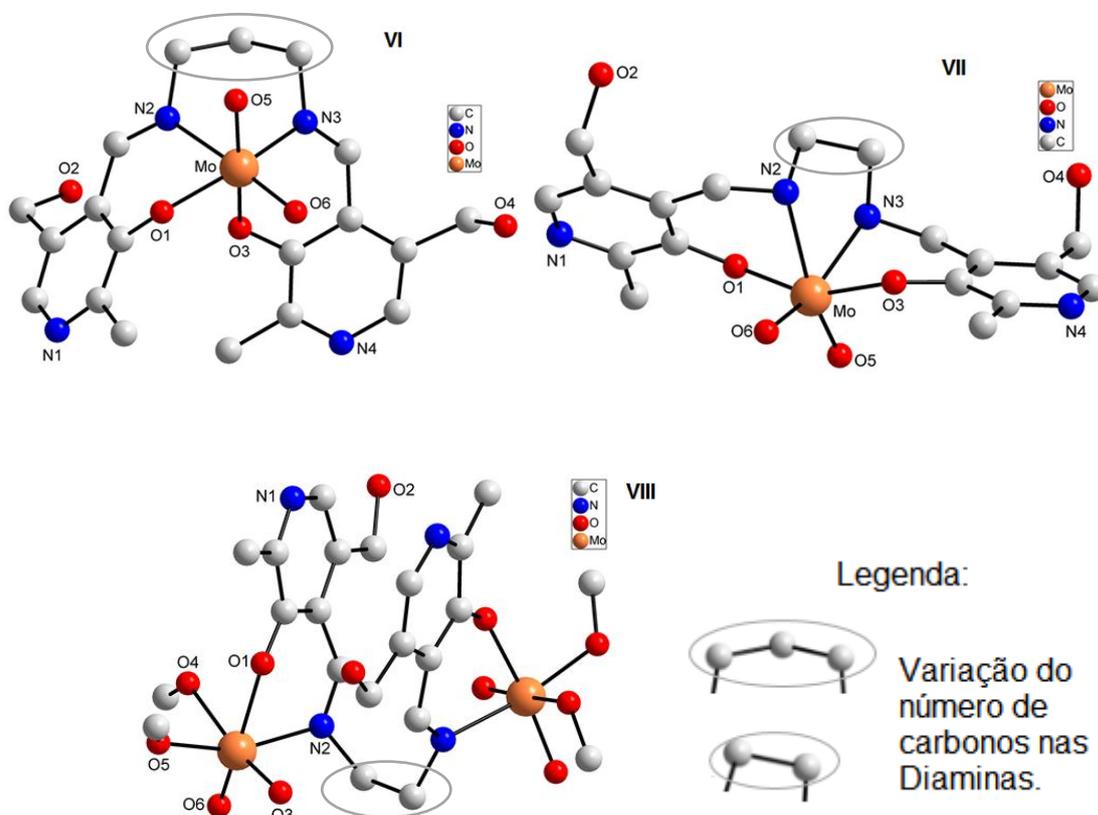
Figura 4: Representação da estrutura molecular do complexo de cobre(II). Não foram representados os hidrogênios e solvatos de cristalização para melhor visualização. O O6 e o O5 referem-se a ligações das funções álcool de moléculas vizinhas. Além disso, têm-se a presença de 4 ClO₄⁻ de contra íon que não foram representados.



Fonte: Adaptado de Mandal e col. (2017).

Em 2017, Pisk⁴² e colaboradores sintetizaram dois ligantes a partir do piridoxal e etano-1,2-diamina ou metano-1,3-diamina, assim variando a extensão da cadeia carbônica (2 e 3 carbonos) das diaminas. O processo de obtenção dos ligantes partiu de uma síntese mecanoquímica, que consiste na moagem de materiais sólidos⁴³. Após foram complexados com acetilacetato de molibdênio(VI) obtendo três estruturas distintas **VI**, **VII** e **VIII** (figura 5). Ambos os complexos apresentam geometria octaédrica e número de oxidação de VI.

Figura 5: Representação das estruturas moleculares dos complexos de molibdênio(VI). Não foram representados os hidrogênios e nem solvatos de cristalização para melhor visualização.



Fonte: Adaptado de Pisk e col. (2017).

Em 2014, Manikandan⁴⁴ e colaboradores sintetizaram ligantes a partir de cloridrato de piridoxal com tiossemicarbazidas substituídas pela reação de condensação. Após a obtenção dos ligantes, os mesmos foram complexados com cloreto de cobalto hexahidratado, obtendo-se dois complexos com geometria octaédrica distorcida e número de oxidação II, que estão dispostos na figura 6. Os

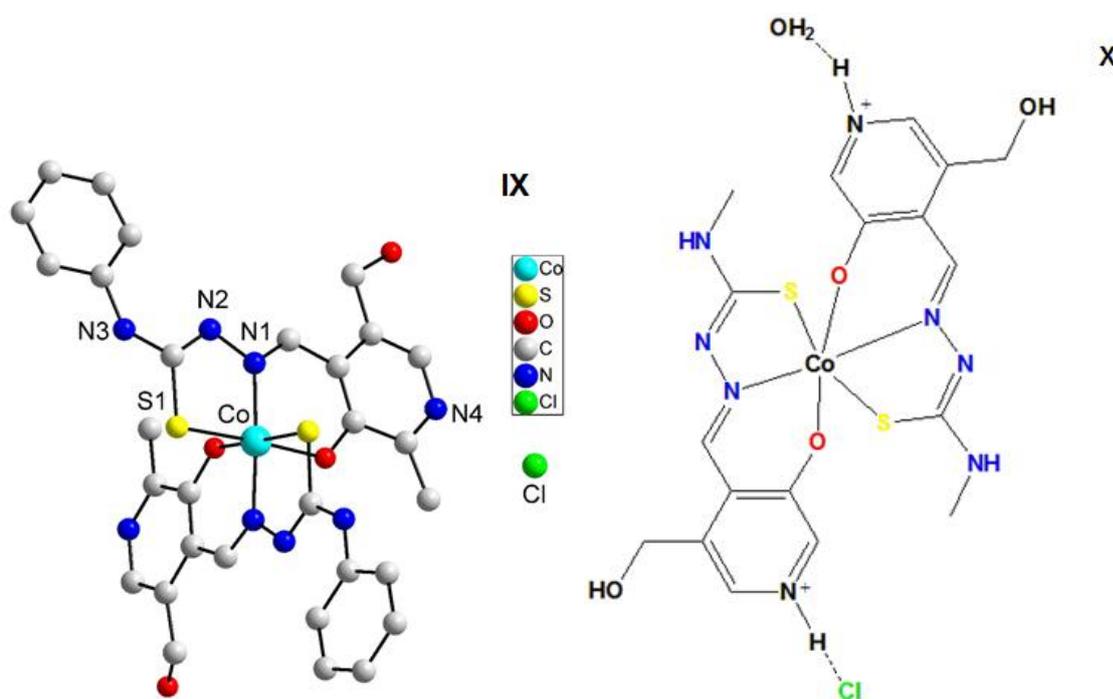
complexos foram submetidos a estudos de interação / clivagem do DNA, interação à proteína *BSA*, atividade antioxidante e citotoxicidade. A interação com DNA foi avaliada por espectroscopia de fluorescência revelando que ambos os complexos podem se ligar ao DNA via intercalação, além disso, os complexos apresentaram boa atividade antioxidante e o ensaio MTT mostrou que a substituição do anel fenílico na tiosemicarbazona aumenta o grau de citotoxicidade. Os valores de IC_{50} apresentados na tabela 1 demonstra que ambos os complexos apresentam atividade contra linhas celulares MCF-7 e HeLa, porém a estrutura **X** apresenta IC_{50} menor do que a própria cisplatina, que foi usada como referência para estas linhagem de células.

Tabela 1: IC_{50} dos complexos e cisplatina frente a células cancerígenas.

	IC_{50} (μ M) MCF-7	IC_{50} HeLa
Complexo IX	6,01	83,24
Complexo X	1,00	20,28
Cisplatina	3,19	53,50

Fonte: Adaptado de: Manikandan e col. (2014)

Figura 6: Representação complexos de cobalto(III). Não foram representados os hidrogênios e nem solvatos de cristalização para melhor visualização.



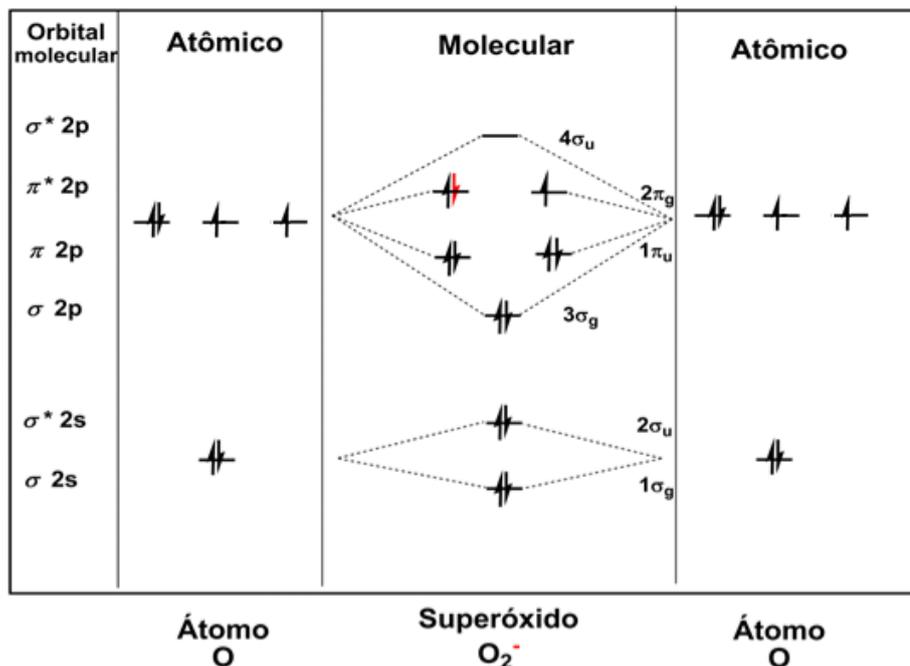
Fonte: Adaptado de Manikandan e col. (2014).

3.4: Espécies reativas de oxigênio e Superóxido Dismutase

Após o início da utilização do oxigênio no processo de respiração aeróbica, o mesmo tornou-se imprescindível no processo de produção de energia a partir de alimentos¹. A partir disso, a produção de espécies reativas de oxigênio faz parte do metabolismo respiratório celular, onde executa funções essenciais como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes³. No entanto, o aumento excessivo na produção dessas espécies pode ocasionar processos inflamatórios⁴, doenças neurodegenerativas^{5,6} ou até mesmo na morte celular².

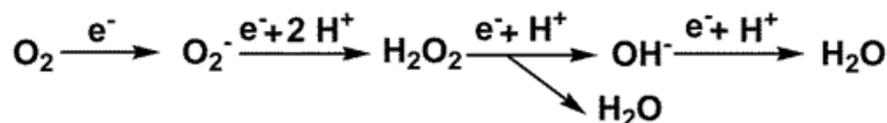
Como apresentado na figura 7 onde têm-se a representação do orbital molecular do superóxido, observa-se que o mesmo apresenta um elétron desemparelhado o qual atribui características oxidativas, sendo formado a partir da redução do oxigênio molecular⁴⁵⁻⁴⁶. O ciclo do oxigênio finaliza-se com sua redução em água, onde têm-se entrada de quatro elétrons provenientes de NADH e de FADH₂ (formados na glicólise e no ciclo de Krebs) ao término da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, ocasionando a redução em NAD⁺ e FAD, respectivamente⁴⁷, esquema 3. A produção de superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas, sendo muito instável, apresentando tempo de meia vida de poucos milissegundos, de intensa reatividade, podendo sofrer dismutação enzimática ou espontânea.

Figura 7: Representação do orbital molecular do superóxido.



Fonte: Adaptado de Ferreira (1997).

Esquema 3: Ciclo do Oxigênio.

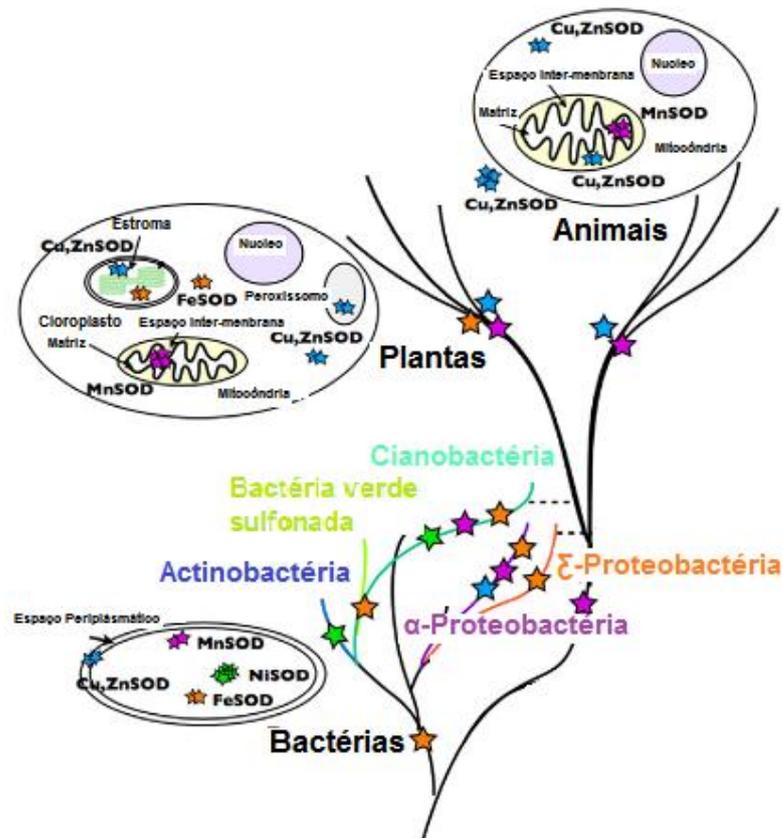


Fonte: Adaptado de Ferreira (1997).

3.5: Superóxido Dismutase SOD

A enzima SOD está presente em diversos organismos com diferentes formas⁴⁸, como apresentado na figura 8. No caso, as bactérias podem apresentar até quatro formas de SOD, como a Cu/ZnSOD presente em proteobactérias, a em FeSOD bactérias verdes sulfonadas, a NiSOD e MnSOD em cianobactérias. Além disso, nas plantas têm-se a presença de SOD dependentes de Cu/Zn, Fe e Mn e nos animais as duas principais formas de superóxido dismutase encontradas são Cu/ZnSOD presente no citosol e MnSOD encontrada na mitocôndria⁴⁹⁻⁵⁰.

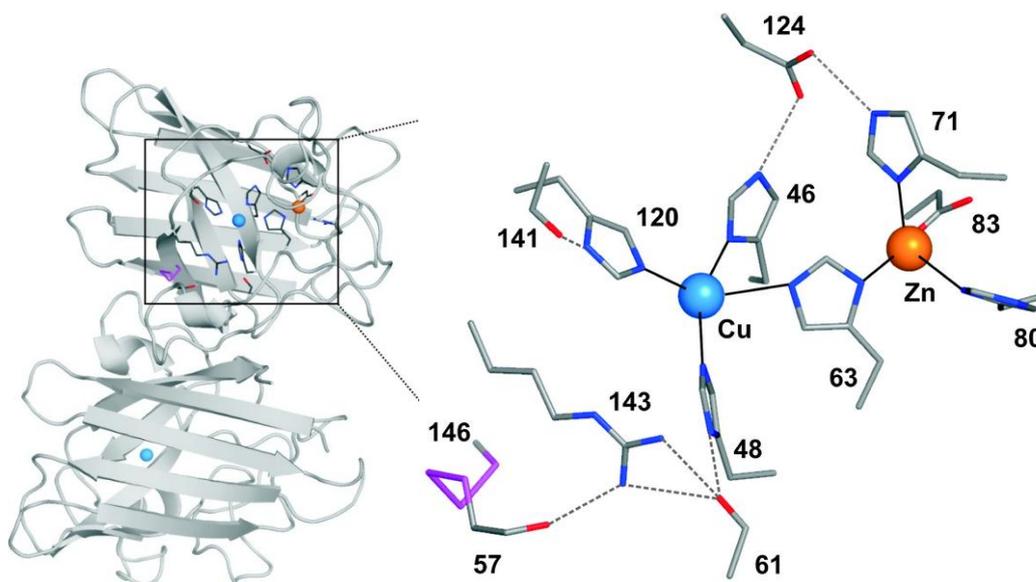
Figura 8: Formas da Superóxido Dismutase em organismos variados.



Fonte: Adaptado de Miller (2012).

A Cu/ZnSOD (SOD-1) é uma enzima dinuclear que possui um sítio ativo com geometria piramidal quadrática distorcida em torno do átomo de Cu^{II} e tetraédrica distorcida em torno do átomo de Zn^{II} ⁵⁷. Os metais presentes no sítio ativo da SOD-1 (figura 9) apresentam funções distintas na dismutação do O_2^- , o átomo Cu^{II} é o responsável pela catálise e é coordenado por quatro resíduos de histidinas e uma molécula de água, o átomo de Zn^{II} por sua vez, está ligado por três resíduos de histidinas e um aspartato, e tem função estrutural na enzima.

Figura 9: Sítio ativo da Cu/ZnSOD.



Fonte: Adaptado de Valentine e col. (2005).

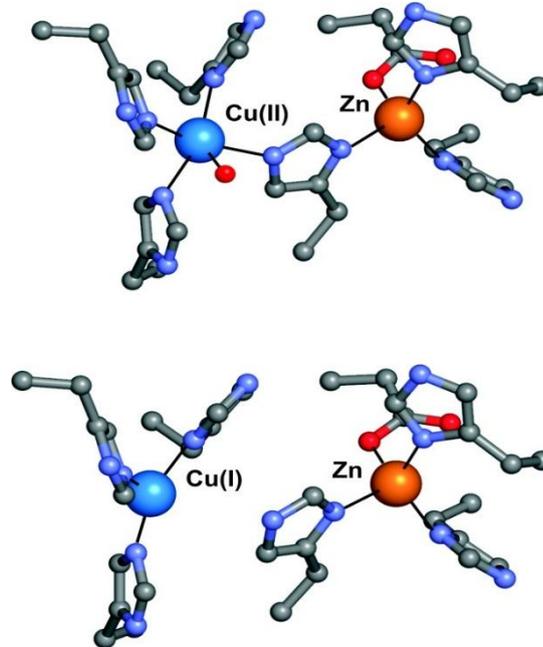
A SOD-1 começa a atuar a partir do processo de oxirredução do átomo de cobre ($\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$), fato que facilita a dismutação do íon superóxido. Com a reação de dismutação, a SOD catalisa a formação de espécies menos nocivas ao organismo, tais como, peróxido de hidrogênio a partir O_2^{-51-52} .

Com a redução do cobre há uma diminuição de 1,3 Å na ligação do íon Cu^{II} , ocorrendo um afastamento do átomo de nitrogênio da His-63 com a liberação do ligante aquo, assim alterando a geometria bipirâmide trigonal distorcida para trigonal. O Zn^{II} mantém-se tetraédrico, já que, ocorre a protonação do imidazolato em ponte His-63, conforme mostra a figura 10.

O mecanismo de atuação da SOD-1 é cíclico, devido à oxidação e redução do centro metálico. Inicialmente o ligante aquo por ser lábil é liberado, sendo assim disponibilizado um orbital vazio do cobre, o qual na sequência, coordena-se a uma molécula de superóxido que participa de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de arginina 141. Após em meio prótico, ocorre a liberação da molécula de superóxido, clivando o sítio ativo, onde o Cu^{II} é reduzido a Cu^{I} , sendo ainda protonado o resíduo de histidina 63. Em seguida com a presença de uma nova molécula de superóxido em meio ácido ocorre uma recoordenação do superóxido com o cobre, sendo ainda realizadas ligações de hidrogênio com o a histidna 63, além das ligações efetuadas pelo outro oxigênio com o resíduo de arginina 141 e com uma molécula de água protonada. Por fim, ocorre uma reorganização estrutural,

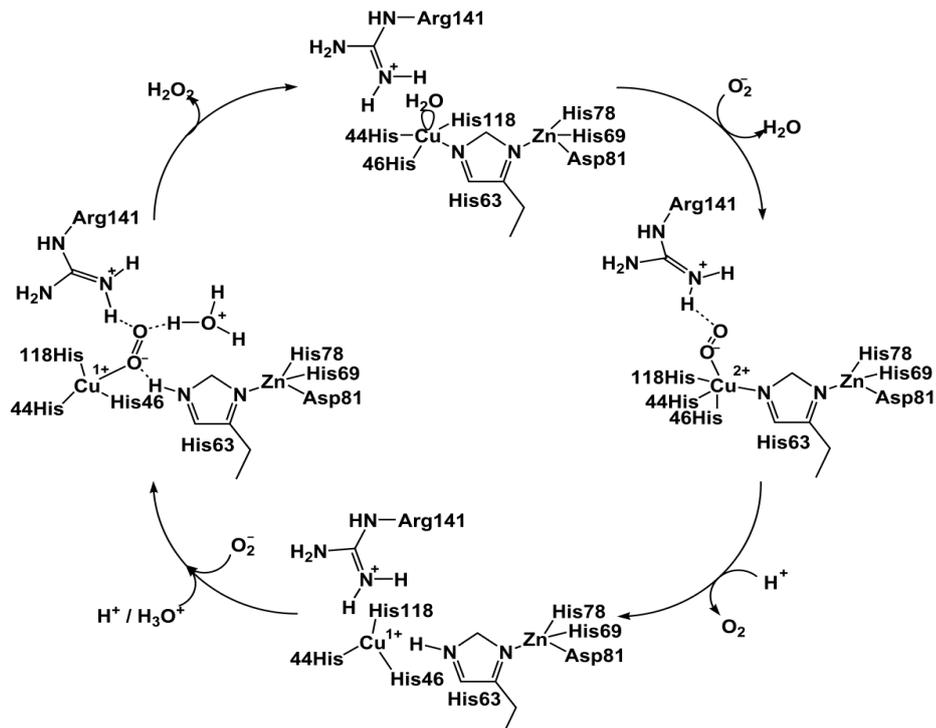
a qual acarreta na liberação de peróxido de hidrogênio retornando a sítio ativo inicial da enzima (esquema 4).

Figura 10: Representação da estrutura cristalina das formas oxidada e reduzida do átomo de Cu na enzima (Cu-Zn-SOD).



Fonte: Adaptado de Valentine⁵³ e col. (2005).

Esquema 4: Mecanismo de dismutação do íon superóxido pela enzima SOD-1.



Fonte: Adaptado de Tainer⁵⁴ (1982).

3.6: Compostos sintéticos que apresentam atividade catalítica mimética da enzima superóxido dismutase

O termo mimético vem do grego *mimetés* que significa imitação ou adaptação. Na natureza existem vários animais que evoluíram especificamente para se assemelhar com as de outras espécies, a fim de se proteger, atacar ou reproduzir. Um exemplo de mimetismo são traças que imitam aranhas, tendo por objetivo assemelhar-se a aranha para evitar um possível ataque⁵⁵.

No contexto enzimático da superóxido dismutase, visa-se obter moléculas com propriedades equivalentes as da enzima a partir de matérias primas com custos baixos e abundantes, com pesos moleculares pequenos, uma vez que, a utilização da SOD *in vivo* torna-se dificultada pela sua onerosa obtenção e purificação, alto valor econômico envolvido nos processos os quais elevam o preço comercial da mesma, com custo médio de U\$800,00⁵⁶ para 75 unidades de massa, além da possível incompatibilidade genética.

Zhang e colaboradores⁵⁷ (2017) sintetizaram o ligante 3,4-bis((2-hidroxinaftalen-1-il)metilenoamino)benzenosulfônico, conforme esquema 5 sendo realizadas posteriormente reações de complexação com cloreto de manganês tetra hidratado e cloreto de cobalto hexa hidratado, onde foram obtidos dois complexos isoestruturais, sendo representado um deste complexos na figura 11, estrutura **XI**. Ambos os complexos apresentam número de oxidação II e geometria octaédrica distorcida. Aos quais foram submetidos ao ensaio indireto de Fridovich⁵⁸ com algumas modificações, que se baseia na competição cinética entre o complexo e o NBT para reagir com O_2^- . Os valores de IC_{50} obtidos para o complexo de manganês foi de 4,72 μM e 2,73 μM para o complexo de cobalto.

Esquema 5: Síntese do ligante 3,4-bis((2-hidroxinaftalen-1-il)metilenoamino)benzenosulfônico

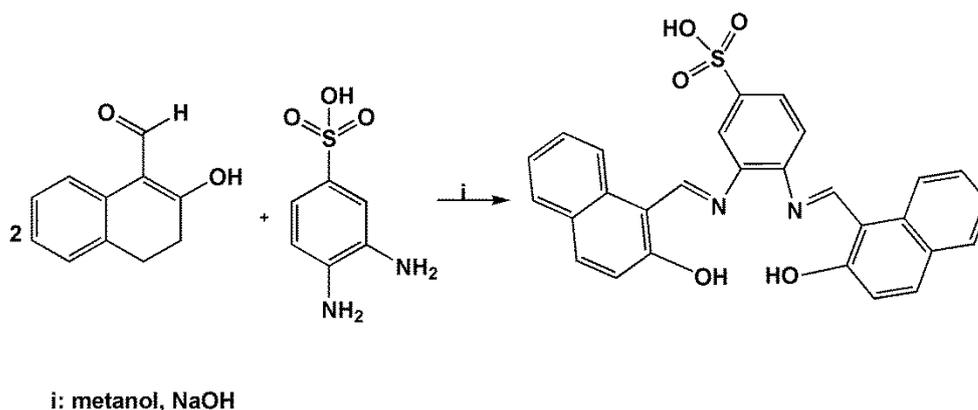
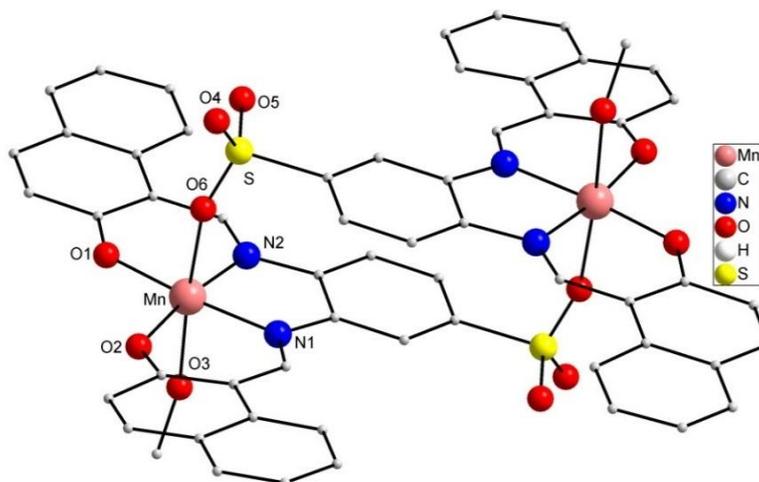


Figura 11: Representação complexo de manganês(II). Não foram representados os hidrogênios e solvatos de cristalização para melhor visualização.



Fonte: Zhang e col. 2017.

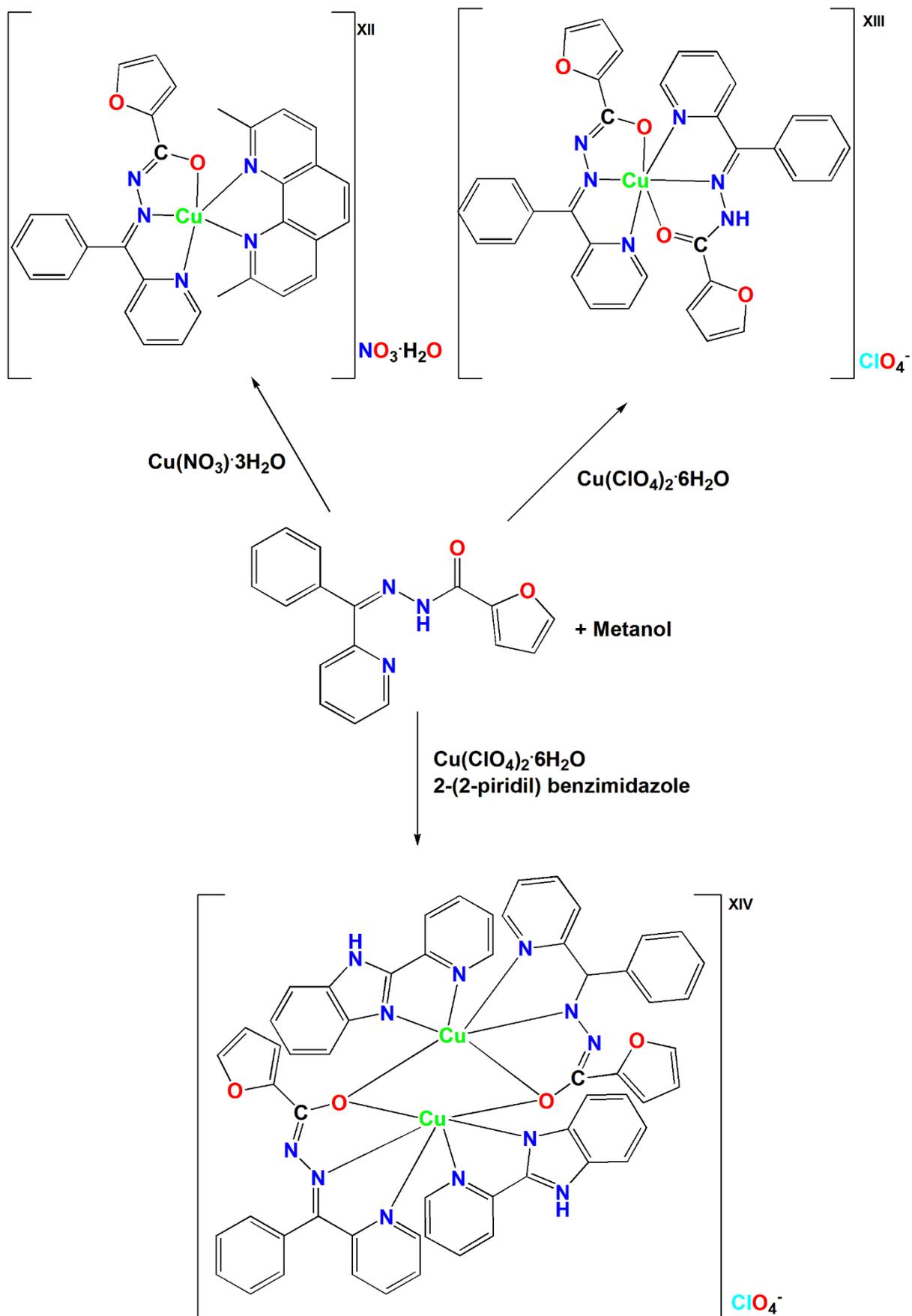
Singh e colaboradores⁵⁹ (2017) sintetizaram um ligante a partir da condensação entre o 2-benzoílo piridina e hidrazida do ácido 2-fúrico. Após, o ligante foi complexado com nitrato de cobre trihidratado (estrutura **XII**), perclorato de cobre hexahidratado (estrutura **XIII**) e perclorato de cobre hexahidratado com 2-(2-piridil)benzimidazol (estrutura **XIV**), como apresentado na figura 12. O complexo na estrutura **XII** apresenta geometria piramidal de base quadrada distorcida, número de oxidação II, já os complexos das estruturas **XIII** e **XIV** possuem geometria octaédrica, número de oxidação II. As atividades catálitica mimética ao sítio ativo da SOD dos complexos das estruturas **XII**, **XIII** e **XIV** foram investigadas pelo ensaio NBT⁶⁰⁻⁶¹, obtendo valores de IC₅₀ de 21, 49 e 17 μ M respectivamente. Os comprimentos das ligações estão descritos na tabela 2 e estão de acordo com dados encontrados na literatura com valores entre 1,902 e 2,345 Å para Cu-N e 1,987 e 2,718 Å para Cu-O ^{62,63,64,65}.

Tabela 2: Distâncias interatômicas em Å.

Complexo XII		Complexo XIII		Complexo XIV	
Cu-N(1)	2,008 Å	Cu-N(1B)	2,03 Å	Cu(1)-N(5A)	2,302 Å
Cu-N(2)	1,945 Å	Cu-O(1B)	2,007 Å	Cu(1)-O(1B)	2,613 Å
Cu-O(1)	1,995 Å			Cu(2)-N(5B)	2,295 Å
Cu-N(4)	2,213 Å			Cu(2)-O(1A)	2,608 Å
Cu-N(5)	2,005 Å			Cu(1)...Cu(2)	3,582 Å

Fonte: Adaptado de Singh e col. (2017).

Figura 12: Representação dos complexos de cobre(II).



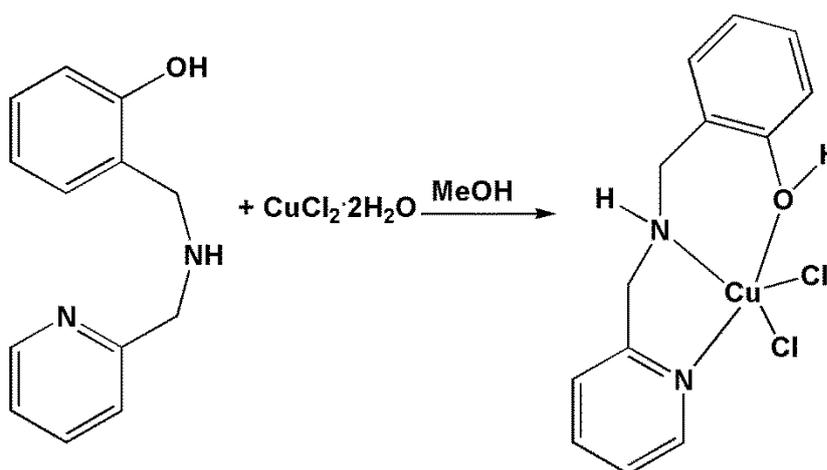
Fonte: Singh e col. (2017).

3.6: Segurança farmacológica de complexos

A avaliação da citotoxicidade de complexos se torna indispensável para a evidencição da sua segurança farmacológica. Dessa forma, caso o composto seja seguro para as células, o mesmo torna-se candidato a ser utilizado em futuros ensaios não-clínicos e clínicos. Dentre os testes de citotoxicidade amplamente utilizados, destaca-se os ensaios de MTT para obter a viabilidade celular que os compostos demonstram frente a CMSP, de quantificação de DNA fluorimétrico por reagente DNA-PicoGreen® que evidencia os danos na fita dupla do DNA, de óxido nítrico o qual indica a formação de ERNs e de diacetato de diclorofluoresceína para evidenciar a formação de EROs.

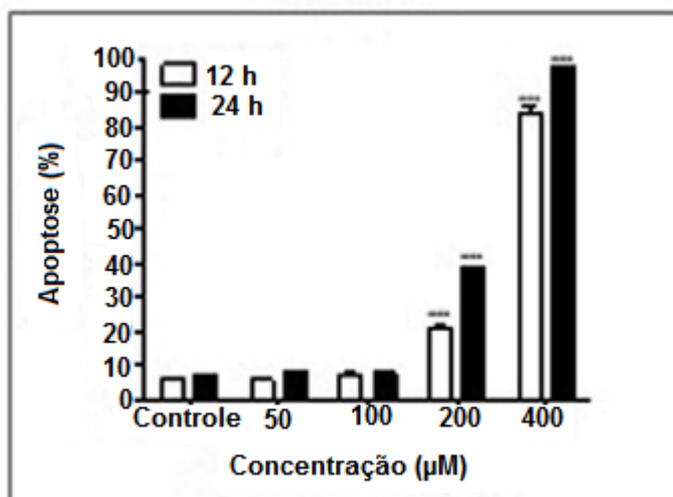
Em 2016, Borges⁶⁶ e colaboradores sintetizaram o complexo de cobre(II) conforme esquema 6, após realizou-se o teste de MTT frente a células mononucleares do sangue periférico, observando que o com o aumento da concentração do composto têm-se um aumento na quantidade de células que sofreram apoptose, ao passo que, na concentração de 400 μM do complexo têm-se que 100% das células sofreram apoptose. Dessa forma, o complexo não é seguro para as células nessa concentração, conforme figura 13.

Esquema 6: Formação do complexo de Cu(II).



Fonte: Adaptado de Borges e col. (2016).

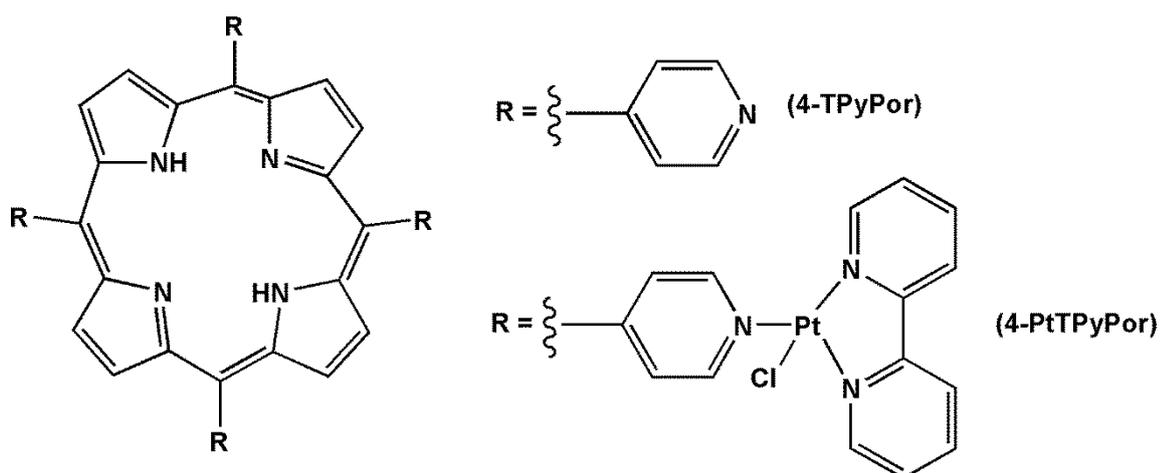
Figura 13: Ensaio MTT para o complexo de Cu(II).



Fonte: Adaptado de Borges e col. (2016).

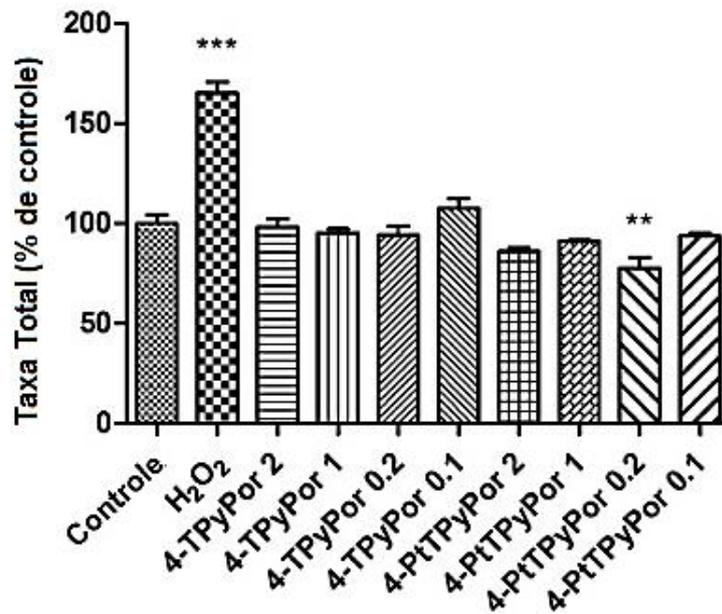
Em 2019, Lopes⁶⁷ e colaboradores obtiveram anéis porfirínicos com dois substituintes distintos, conforme figura 14, que foram submetidos ao ensaio de quantificação de DNA fluorimétrico por reagente DNA-PicoGreen®, onde observou-se que os compostos são seguros a células, já que não houve o aparecimento de altos níveis de formação de dsDNA (figura 15) no ensaio realizado no escuro.

Figura 14: Anéis porfirínicos com substituintes variados.



Fonte: Adaptado de Lopes e col. (2019).

Figura 15: Ensaio de quantificação de DNA fluorimétrico por reagente DNA-PicoGreen® para os anéis porfirínicos.

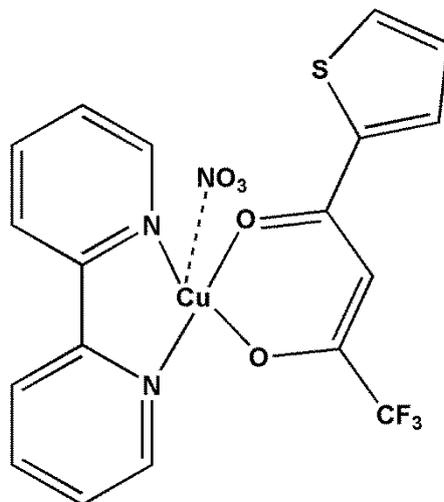


PBMCs expostas em diferentes formulações por 24h. As amostras estão ordenadas em ordem crescente para melhor entendimento dos dados obtidos. Análise estatística foi realizada em ANOVA seguido por tukey post hot. * Análise estatística difere do controle negativo. # Análise estatística difere do controle positivo.

Fonte: Adaptado de Lopes e col. (2019).

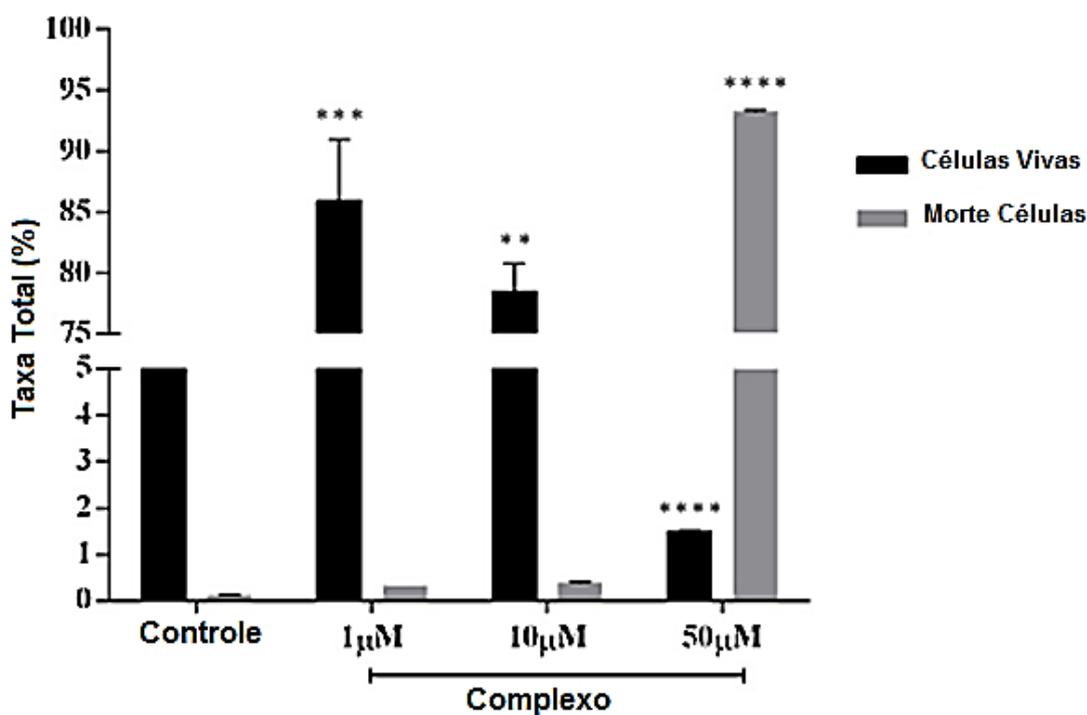
O teste de diacetato de diclorofluoresceína foi utilizado por Polloni⁶⁸ e colaboradores para evidenciar a formação de EROs quando o complexo de cobre (II) (figura 16) em contato com células mononucleares do sangue periférico. Assim observando que em concentrações pequenas (1 μ M) já têm a formação de peróxido de hidrogênio, porém na concentração de 50 μ M têm-se um grande aumento na quantidade de células mortas devido a formação de peróxido de hidrogênio. Dessa forma, esse complexo também não é seguro para as células, já que levam a formação de EROs, as quais podem acarretar em danos celulares.

Figura 16: Complexo de cobre (II) para a análise de diacetato de diclorofluoresceína.



Fonte: Adaptado de Polloni e col. (2019).

Figura 17: Teste de diacetato de diclorofluoresceína para o complexo de Cu(II).

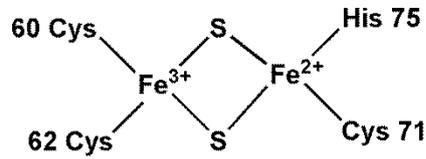


Fonte: Adaptado de Polloni e col. (2019).

Para Wang⁶⁹ e colaboradores (2019), o cluster metálico Miner2 (figura 18) quando em contato com o reagente de Griess, leva a formação de nitrito, o qual leva a formação do composto Azo(N-1-naftilenodiamino) que apresenta coloração rosa e elevada fluorescência (figura 19). Dessa forma, o cluster gera ERNs que podem

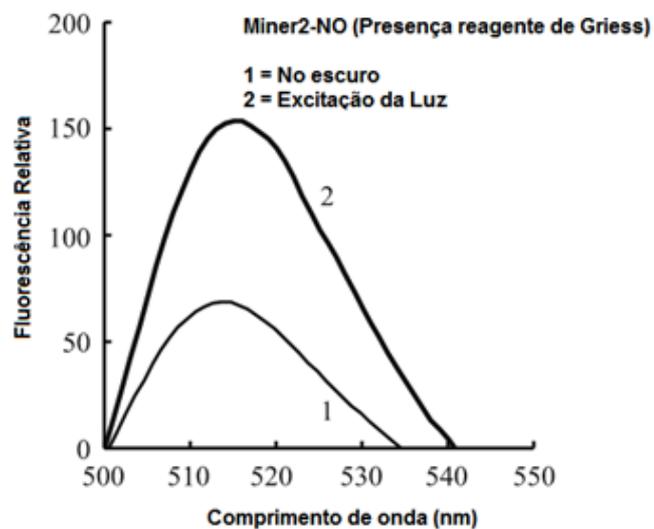
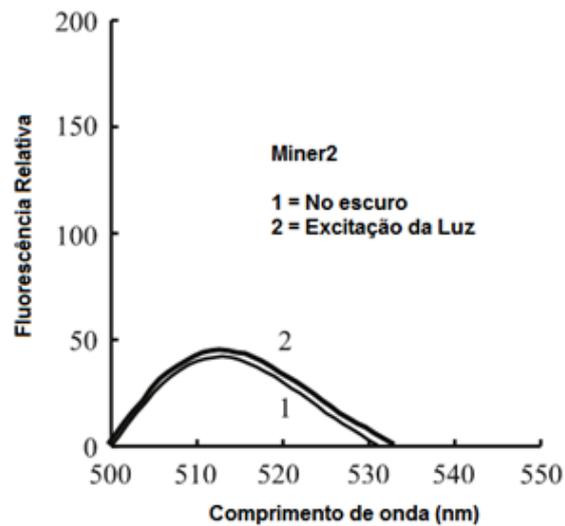
causar danos nas CMSP, assim o mesmo não se torna seguro para possíveis aplicações farmacológicas.

Figura 18: Estrutura do Cluster Miner2.



Fonte: Adaptado de Wang e col. (2019)

Figura 19: Teste óxido Nítrico para o cluster de Fe.



Fonte: Adaptado de Wang e col. (2019)

Para os compostos apresentados não foram realizadas técnicas concomitantemente para avaliar a citotoxicidade de cada molécula, dessa forma, torna-se arriscado atribuir a segurança farmacológica dos mesmos.

4. Parte Experimental

4. Parte Experimental

4.1. Aspectos Gerais

Os solventes: metanol, etanol, dimetilformamida e tetrahidrofurano utilizados nas sínteses dos ligantes e complexos e os demais reagentes comerciais: furfurilamina, 2-tiofenometilamina, 2-tiofenoetilamina, trietilamina, terc-butóxido de potássio, perclorato de cobre (II), cloreto de cobre (II) e acetato de cobre (II), foram usados sem tratamento prévio. Os procedimentos de cristalização foram realizados através da lenta evaporação do solvente.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão de todos os compostos sintetizados foram medidos em um aparelho digital Micro Química modelo MQAPEF-301 pertencente ao laboratório de Materiais Inorgânicos da Universidade Federal de Santa Maria. Os dados referentes aos pontos de fusão determinados seguem nas seções 4.3 e 4.4.

4.2.2 Espectroscopia no Infravermelho

A análise de espectroscopia no infravermelho dos ligantes e dos complexos realizou-se em um equipamento Bruker Tensor-27 Sample Compartment RT- DLa-TGS, que abrange uma janela espectral de $4000-400\text{ cm}^{-1}$, localizado no departamento de química da Universidade Federal de Santa Maria. Os espectros de infravermelho foram registrados utilizando-se os compostos na forma de pastilhas sólida, com brometo de potássio e amostra (ligantes e complexos). As bandas mais significativas encontradas para os ligantes e os complexos estão descritos nas seções 4.3 e 4.4.

4.2.3 Espectroscopia RAMAN

Os espectros de Raman foram obtidos através do equipamento Bruker MultiRAM, que apresenta detector de Ge resfriado com nitrogênio líquido e fonte de 1064 nm (Nd:YAG), ou através do espectrômetro Bruker SENTERRA que possui uma câmera CCD resfriada termoeletricamente (Bruker/Andor, 1024x256 pixels), sendo esta acoplada em um microscópio Olympus (BX-51). Os espectros foram produzidos usando uma fonte laser de 532 nm (laser de diodo) ou de 785 nm (laser diodo) que foi focada na amostra usando uma objetiva Olympus de 20x (NA 0,40). A fim de evitar a decomposição da amostra à potência da fonte foi mantida em valores adequados. Os dados de Espectroscopia RAMAN são mostrados nas seções 4.3 e 4.4.

4.2.4 Espectroscopia Eletrônica UV/Visível

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta e do visível foram obtidos em um espectrofotômetro UV-Vis 1650-PC Shimadzu, em solução de DMF, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Os dados de Espectroscopia Eletrônica UV/Visível são mostrados nas seções 4.3 e 4.4.

4.2.5 Voltametria Cíclica

As medidas voltamétricas foram realizadas em solução de dimetilformamida, utilizando-se como eletrodo suporte hexafluorofosfato de tetrabutylamônio. O eletrodo de trabalho utilizado foi de platina, e o ferroceno foi usado como referência interna, sendo os voltamogramas expressos em função do mesmo ($Fc + /Fc = 0,64$ V vs SHE). A varredura dos potenciais foi realizada no sentido catódico, na velocidade de 100 mV/s. Os gráficos mostrando diferentes velocidades de varredura (50, 100 e 200 mV/s), tal qual, nos sentidos catódico e anódico, foram investigados para identificar a correlação ou dependência de um processo e outro. Os dados de voltametria cíclica estão dispostos na seção 5.5.

4.2.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em espectrômetros Bruker DPX-400, à frequência de 400 MHz. Os equipamentos pertencem ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Santa Maria. Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm), em relação ao pico residual de tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno para os espectros de prótons e DMSO, colocando-se entre parênteses a multiplicidade (**s** = singleto, **d** = dubleto, **t** = tripleto, **quart** = quarteto, **quint** = quinteto, **sex** = sexteto, **m** = multipletto), o número de hidrogênios deduzido da integral relativa e a constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os dados de Espectroscopia de ressonância paramagnética nuclear estão dispostos nas seções 4.3 e 4.4.

4.2.7 Difração de raios X de monocristal

A coleta de dados foi realizada por um difratômetro Bruker D8 Venture Photon 100 equipado com um tubo de raios X ($\text{Mo K}\alpha = 0,71073$) de alta luminosidade (Incoatec $1\mu\text{S}$). As medidas foram efetuadas a baixa temperatura utilizando-se uma unidade Cryostream 800 da Oxford Cryosystems.

Todas as estruturas foram solucionadas empregando-se métodos diretos através do programa SHELXS-2014⁷⁰. Os refinamentos realizaram-se com o pacote de programas SHELXS-2014⁷⁰ através do método de matriz completa/mínimos quadrados dos fatores estruturais F_2 , com os parâmetros de deslocamento térmico anisotrópico para todos os átomos não hidrogenóides. Os átomos não hidrogenóides localizaram-se através de sucessivas diferenças de Fourier e refinamentos com parâmetros anisotrópicos. Já os átomos de hidrogênio refinaram-se isotropicamente na forma de grupos vinculados geometricamente aos respectivos átomos não hidrogenóides. As projeções gráficas das estruturas cristalinas foram realizadas através dos programas ORTEP⁷¹ e DIAMOND⁷². A discussão dos resultados cristalográficos dos complexos obtidos está na seção 5.1.

4.2.8 Coleta de sangue para testes de citotoxicidade

As amostras de sangue periférico são obtidas através de amostras de descarte do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Franciscana, sob aprovação do Comitê de Ética em Seres Humanos da Instituição (CAAE: 31211214.4 .0000.5306) com ausência de dados de identificação. As amostras são adquiridas através de punção venosa utilizando tubos com heparina do tipo Vacutainer®, que foram utilizados para separar células mononucleares do sangue periférico, em tratamentos subsequentes e em culturas de células.

4.2.9 Separação de células mononucleares do sangue periférico

Nos testes de viabilidade celular e danos de DNA dos efeitos citotóxicos utilizou-se protocolo experimental semelhante ao descrito por Wilms e col.⁷³, em CMSP, onde o meio de cultura contém as células como controlo negativo e o meio de cultura adicionando de 100 mM de peróxido de hidrogênio como controlo positivo.

A separação de linfócitos nas PBMCs ocorrem por gradiente de densidade (Histopaque®-1077) por centrifugação, e a concentração de 2×10^5 células/mL é obtida pela contagem em uma câmara de Neubauer com 0,4% de azul de tripano.

O meio de cultura juntamente com as amostras foram armazenadas em estufa por 24 horas, a temperatura de 37 °C e com controle de CO₂ a 5%. As concentrações das amostras foram as mesmas encontradas para os valores de IC₅₀ no ensaio de fotorredução do indicador NBT estando dispostas na tabela 3:

Tabela 3: Concentrações das amostras utilizadas nos testes de segurança farmacológica

Amostra	Concentração de uso das amostras (mol/L):	Proporção solução stock/meio de cultura (µL/µL):
C1	$20,85 \times 10^{-5}$	157/843
C2	$14,65 \times 10^{-5}$	17/983
C3	$19,35 \times 10^{-5}$	186/814
C4	$7,55 \times 10^{-5}$	97/903
C5	$5,95 \times 10^{-4}$	416/584
C6	$18,7 \times 10^{-5}$	198/802
C7	$37,75 \times 10^{-6}$	142/858
C8	10×10^{-5}	170/830
C9	$41,75 \times 10^{-6}$	49/951

C10	12,15X10 ⁻⁵	185/815
-----	------------------------	---------

4.2.10 Avaliação da Viabilidade Celular pela Técnica MTT

No ensaio MTT, o reagente brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio é solúvel em água apresentando coloração amarelada, sendo prontamente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em atividade mitocondrial pela enzima succinato desidrogenase. Ao passo que, por essa redução o MTT é convertido em cristais de formazan, que são insolúveis em água e de cor púrpura-azulada. Inicialmente, o formazan formado é armazenado no citoplasma da célula e posteriormente solubilizados pela adição de DMSO sendo quantificado colorimetricamente por espectrofotometria em um comprimento de onda de 570nm. O valor de absorbância é proporcional ao número de células viáveis em comparação com o controle negativo^{74,75}.

4.2.11 Ensaio de quantificação de DNA fluorimétrico por reagente DNA-PicoGreen®

O ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA livre no meio pode ser realizado utilizando o reagente Invitrogen-DNA-PicoGreen® (Life Technologies), que é um corante fluorescente que se liga à dupla fita de DNA. Este procedimento é realizado no meio onde as células são tratadas, por objetivo de determinar a presença de DNA neste meio, devido à possível ruptura celular e morte celular⁷⁶.

O corante é adicionado à amostra em uma placa Elisa escura de 96 poços, sendo previamente incubado por 5 minutos, lendo-se a fluorescência no espectrofluorímetro do aparelho a 480 nm de excitação e 520 nm de emissão.

4.2.12 Teste de óxido nítrico

A presença de nitrito orgânico pode ser detectada através do teste de óxido nítrico, que consiste na adição do reagente de Griess na amostra contendo NO₂⁻, sendo presente nitrito ocorre uma variação na coloração passando a ser rosa. A sulfanilamida do reagente de Griess¹¹⁰ é responsável pela formação de diazônio do

nitrito na amostra. Quando o composto azo (N-1-naftilenodiamino-biclorohidrato) interage com os sais de diazônio, a coloração rosa aparece na amostra.

4.2.13 Teste de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)

O reagente diacetato de 2-7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) conforme Esposti e col.⁷⁷, tem a capacidade de atravessar a membrana celular sendo desacetilado por enzimas mitocondriais, levando a formação do 2,7-diclorodidrofluoresceína. Este último reage com EROs, principalmente peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzindo a 2,7-diclorofluoresceína que emite fluorescência. Sendo a fluorescência detectada em aparelho espectrofluorimétrico com comprimentos de onda de 488nm de excitação e 525nm de emissão.

4.3 Síntese dos compostos

4.3.1 Síntese dos ligantes

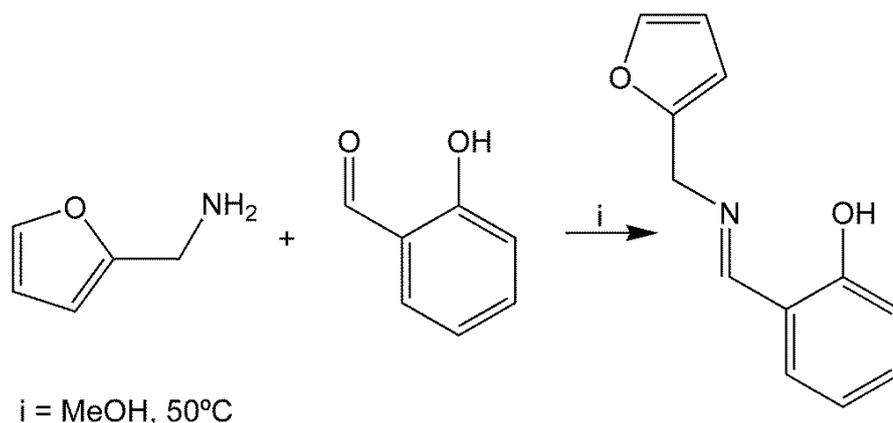
Os ligantes foram sintetizados utilizando uma proporção de 5 mmol da furfúrilamina e seus derivados com 5 mmol dos respectivos aldeídos (aldeído salicílico, orto-vanilina e cloridrato de piridoxal). Na solução reacional foram utilizados como solvente o metanol ou etanol, sob temperatura de 50 °C e agitação constante, com variação de tempo reacional entre 10 e 24 horas. Sendo todos os solventes evaporados em rota-evaporador. As reações foram acompanhadas com placas de cromatografia em camada delgada. As condições reacionais de cada ligante estão descritas abaixo.

4.3.1.1 Ligante L1 (2-Hidroxibenzelideno metano furano)

- Furfúrilamina (0,46 mL, d= 1,05 g/mL), aldeído salicílico (0,53 mL, d= 1,15 g/mL), 15 mL de metanol, esquema 7. Após 10 horas de reação obteve-se uma solução amarela que após evaporação levou a formação de um óleo amarelo que foi submetido a separação de impurezas por coluna de sílica gel, com eluente 80% hexano e 20% acetato de etila. Após o óleo amarelo obtido foi submetido a técnicas de caracterização. Rendimento de 43%. UV/VIS

$\lambda_{\text{máx.}}$: 317 nm; ϵ : 8.933 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 3474,89 [m, ν (O–H)_{álcool}]; 1632,67 [s, δ (C=N)_{imina}]; 1581,66 [m, ν (C–O)]; 756,25 [m, ν (C–H)_{alifático}]; 598,95 [m, ν (C–N)]. RMN (DMSO-d₆) 400 MHz: 4,8 s {2H} CH₂(imina); 6,35-7,81 m {7H} CH_(aromático); 9,23 {1H} CH_(imina); 13,31 s {1H} OH_(fenol).

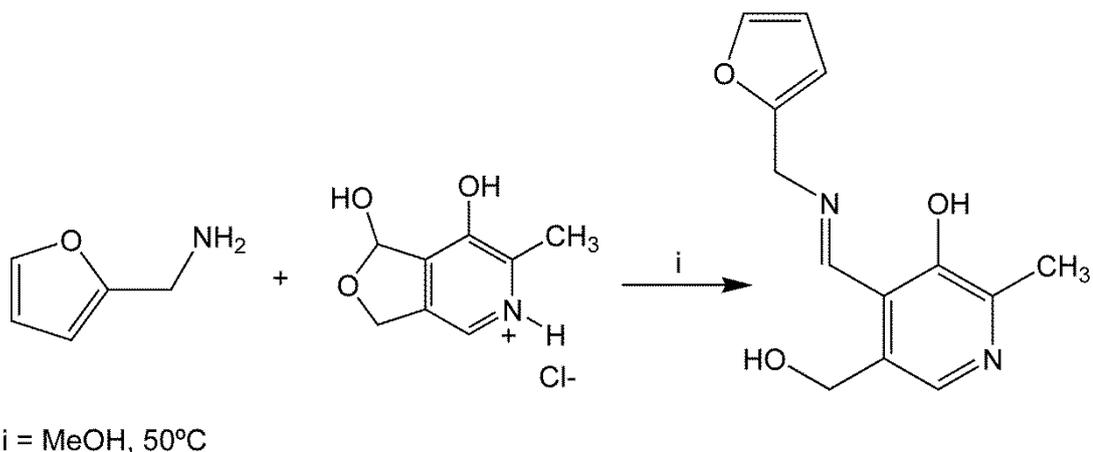
Esquema 7: Esquema reacional ligante L1.



Fonte: Construção do autor.

4.3.1.2 Ligante L2 (3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metil-4-metano furanodieno)

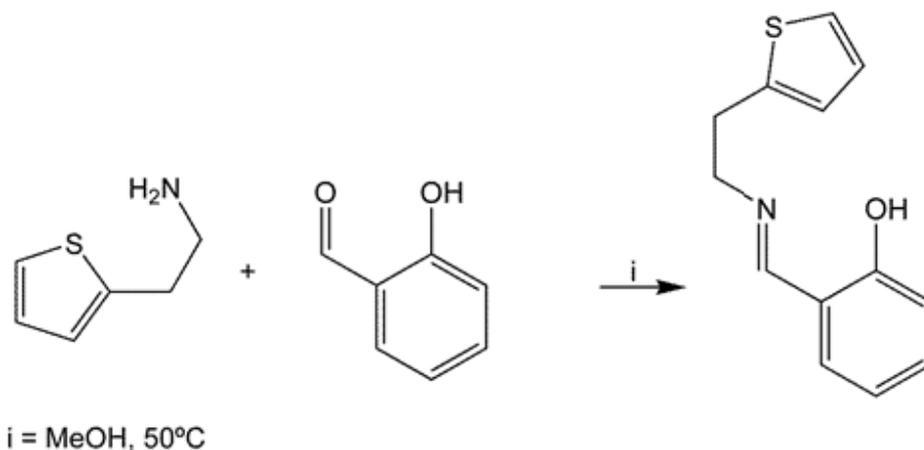
- Furfurilamina (0,46 mL, d= 1,05 g/mL), cloridrato de piridoxal (1,02 g), 15 mL de metanol. O tempo reacional foi de 15 horas, obtendo-se uma solução amarela escura. O produto estava puro, após evaporação do solvente obtendo-se um óleo de cor amarela. Rendimento de 53%. UV/VIS $\lambda_{\text{máx.}}$: 331 nm; ϵ : 9.156 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 3421,39 [m, ν (O–H)_{álcool}]; 1650,05 [s, δ (C–N)_{imina}]; 1400,98 [m, ν (C–O)]; 1025,84 [m, ν (C–H)_{alifático}]; 827,07 [m, ν (C–N)]. RMN (DMSO-d₆) 400 MHz: 2,38 s {3H} CH₃; 3,37 s {2H} CH₂(imina); 4,4 s {2H} CH₂; 6,96-7,51 m {4H} CH_(aromático); 10,53 {1H} CH_(imina).

Esquema 8: Esquema reacional ligante L2.

Fonte: Construção do autor.

4.3.1.3 Ligante L3 (2-Hidroxibenzelideno etano tiofeno)

- 2-tiofenoetilamina (0,58 mL, $d = 1,08 \text{ g/mL}$); aldeído salicílico (0,53 mL, $d = 1,15 \text{ g/mL}$); 15 mL de metanol. A reação foi mantida no sistema por 14 horas, sendo evaporado o solvente havendo o aparecimento de um óleo amarelo, o qual não precisou ser purificado, já que apresentou apenas um ponto na placa de sílica. Esquema 9. Rendimento de 58%. UV/VIS $\lambda_{\text{máx.}}$: 307 nm; ϵ : $10.634 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (DMSO [] $2,7534 \times 10^{-5}$); IR (Pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3424,12 [m, $\nu(\text{O-H})_{\text{álcool}}$]; 1633,39 [s, $\delta(\text{C=N})_{\text{imina}}$]; 1280,39 [m, $\nu(\text{C-O})$]; 1026,75 [m, $\nu(\text{C-H})_{\text{alifático}}$]; 826,32 [m, $\nu(\text{C-N})$]. RMN (DMSO- d_6) 400 MHz: 4,53 s {2H} $\text{CH}_2(\text{imina})$; 4,93 s {2H} CH_2 ; 6,04-7,05 m {7H} $\text{CH}_{(\text{aromático})}$; 10,53 {1H} $\text{CH}_{(\text{imina})}$.

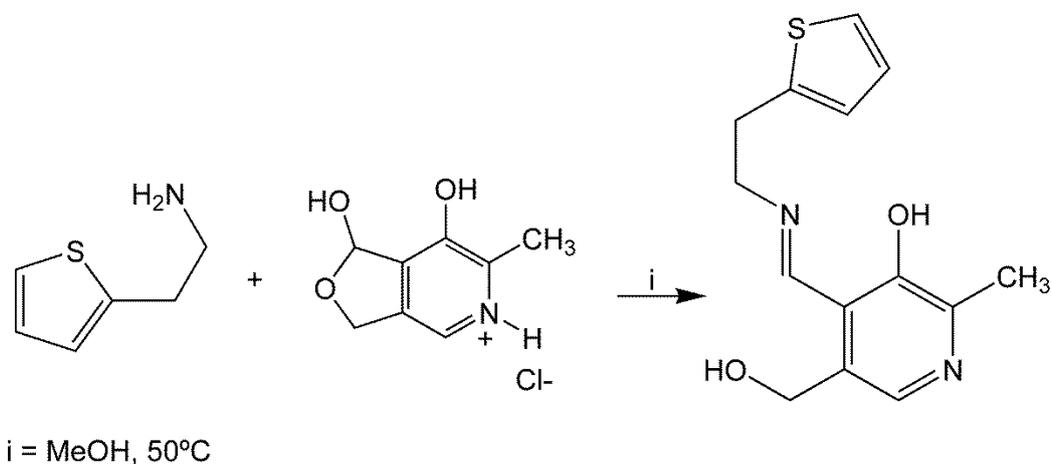
Esquema 9: Esquema reacional ligante L3.

Fonte: Construção do autor.

4.3.1.4 Ligante L4 (3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metil-4-etano tiofenileno)

- 2-tiofenoetilamina (0,58 mL, $d = 1,08 \text{ g/mL}$), cloridrato de piridoxal (1,02 g), 15 mL de metanol, por 15 horas. A solução amarela obtida inicialmente obtida levou a formação de um óleo amarelo escuro após evaporação do solvente. O óleo foi separado de impurezas por coluna de sílica gel, com eluente 80% hexano e 20% acetato de etila. Rendimento de 50%. UV/VIS $\lambda_{\text{máx.}}$: 349 nm; ϵ : $6.468 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (DMSO [] $2,7534 \times 10^{-5}$); IR (Pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3423,37 [m, $\nu(\text{O-H})_{\text{álcool}}$]; 1643,10 [s, $\delta(\text{C=N})_{\text{imina}}$]; 1025,75 [m, $\nu(\text{C-H})_{\text{alifático}}$]; 827,01 [m, $\nu(\text{C-N})$]. RMN (DMSO- d_6) 400 MHz: 2,63 s {3H} CH_3 ; 4,39 s {2H} $\text{CH}_2(\text{álcool})$; 4,53 s {2H} $\text{CH}_2(\text{imina})$; 4,76 s {2H} CH_2 ; 6,93-8,17 m {4H} $\text{CH}(\text{aromático})$; 9,05 {1H} $\text{CH}(\text{imina})$.

Esquema 10: Esquema reacional ligante L4.

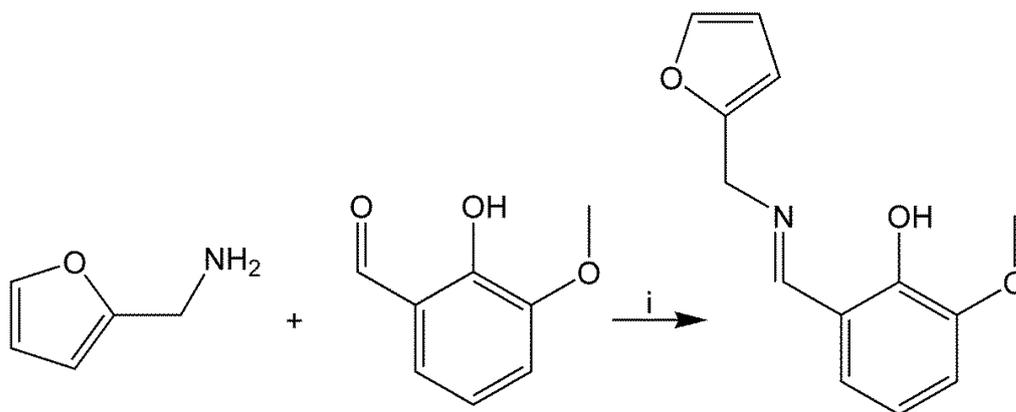


Fonte: Construção do autor.

4.3.1.5 Ligante L5 (2-Hidroxi-3-metoxibenzilideno etano furano)

- Furfurilamina (0,46 mL, $d = 1,05 \text{ g/mL}$), orto-vanilina (0,76 g), 15 mL metanol, sendo o sistema mantido por 10 horas. A solução amarela obtida após evaporação do solvente gerou um óleo amarelo. Rendimento de 57%. UV/VIS $\lambda_{\text{máx.}}$: 316 nm; ϵ : $8.910 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (DMSO [] $2,7534 \times 10^{-5}$); IR (Pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3423,89 [m, $\nu(\text{O-H})_{\text{álcool}}$]; 1631,33 [s, $\delta(\text{C-N})_{\text{imina}}$]; 1466,71 [m, $\nu(\text{C-O})$]; 730,93 [m, $\nu(\text{C-H})_{\text{alifático}}$]; 599,36 [m, $\nu(\text{C-N})$]. RMN (DMSO- d_6) 400 MHz: 2,93 s {3H} $\text{CH}_3(\text{éter})$; 3,74 s {2H} $\text{CH}_2(\text{imina})$; 6,04-7,05 m {6H} $\text{CH}(\text{aromático})$; 7,74 {1H} $\text{CH}(\text{imina})$.

Esquema 11: Esquema reacional ligante L5.

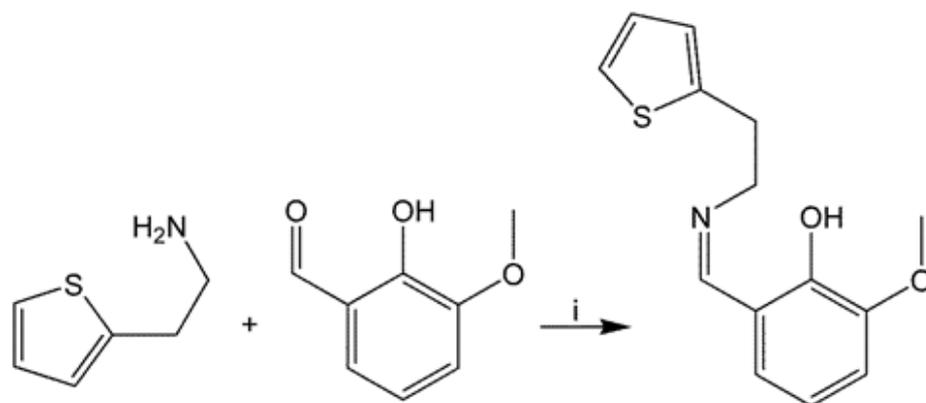


i = MeOH, 50°C

Fonte: Construção do autor.

4.3.1.6 Ligante L6 (2-Hidroxi-3-metoxibenzilideno etano tiofeno)

- 2-tiofenoetilamina (0,58 mL, d= 1,08 g/mL), orto-vanilina (0,76 g), 15 mL de metanol, por 12 horas. Após evaporação do solvente obteve-se um óleo amarelo sendo separado de impurezas por coluna de sílica gel, com eluente 80% hexano e 20% acetato de etila. Rendimento de 44%. UV/VIS $\lambda_{\text{máx.}}$: 322 nm; ϵ : 8.630 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 2930,56 [m, $\nu(\text{O-H})_{\text{álcool}}$]; 1630,75 [s, $\delta(\text{C=N})_{\text{imina}}$]; 1469,00 [m, $\nu(\text{C-O})$]; 734,35 [m, $\nu(\text{C-H})_{\text{alifático}}$]; 698,14 [m, $\nu(\text{C-N})$]. RMN (DMSO-d₆) 400 MHz: 1,80 s {3H} CH₃(éter); 4,79 s {2H} CH₂(imina); 4,81 s {2H} CH₂; 6,16-6,57 m {6H} CH_(aromático); 7,53 {1H} CH_(imina).

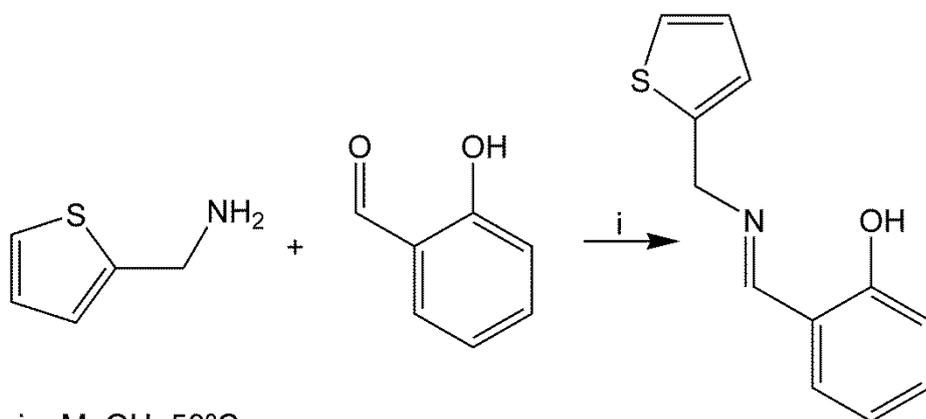
Esquema 12: Esquema reacional ligante L6.

i = MeOH, 50°C

Fonte: Construção do autor.

4.3.1.7 Ligante L7 (2-Hidroxibenzilideno metano tiofeno)

- 2-tiofenometilamina (0,51 mL, d= 1,10 g/mL); aldeído salicílico (0,53 mL, d= 1,15 g/mL); 15 mL de metanol, por tempo reacional de 24 horas, esquema 13. Foi obtido um óleo amarelo sem a necessidade de purificação. Rendimento de 56%. UV/VIS $\lambda_{\text{máx.}}$: 333 nm; ϵ : 7.142 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 3419,37 [m, $\nu(\text{O-H})_{\text{álcool}}$]; 1612,67 [s, $\delta(\text{C-N})_{\text{imina}}$]. RMN (DMSO-d₆) 400 MHz: 4,37 s {2H} CH₂(imina); 7,59-8,24 m {7H} CH_(aromático); 9,08 {1H} CH_(imina).

Esquema 13: Esquema reacional ligante L7.

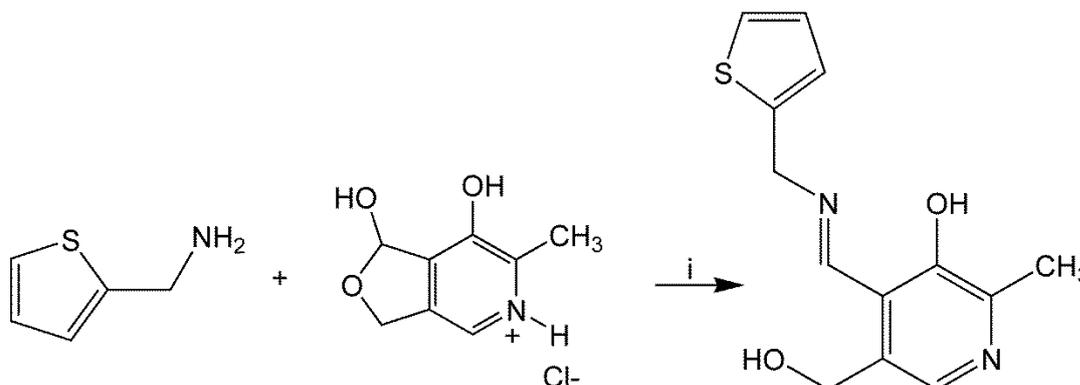
i = MeOH, 50°C

Fonte: Construção do autor.

4.3.1.8 Ligante L8 (3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metil-4-metano tiofenileno)

- 2-tiofenometilamina (0,51 mL, $d = 1,10 \text{ g/mL}$); cloridrato de piridoxal (1,02 g); 15 mL de metanol, pelo tempo reacional de 22 horas, Esquema 14. Foi obtido um óleo amarelo escuro sem a necessidade de purificação, após evaporação do solvente. Rendimento de 54%. UV/VIS $\lambda_{\text{máx.}}$: 311 nm; ϵ : $9.426 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (DMSO [] $2,7534 \times 10^{-5}$); IR (Pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3409,58 [m, $\nu(\text{O-H})_{\text{álcool}}$]; 1650,00 [s, $\delta(\text{C-N})_{\text{imina}}$]. RMN (DMSO- d_6) 400 MHz: 1,80 s {3H} CH_3 ; 5,01 s {2H} $\text{CH}_2(\text{álcool})$; 5,34 s {2H} $\text{CH}_2(\text{imina})$; 6,82-7,27 m {4H} $\text{CH}(\text{aromático})$; 11,60 {1H} $\text{CH}(\text{imina})$.

Esquema 14: Esquema reacional ligante L8.



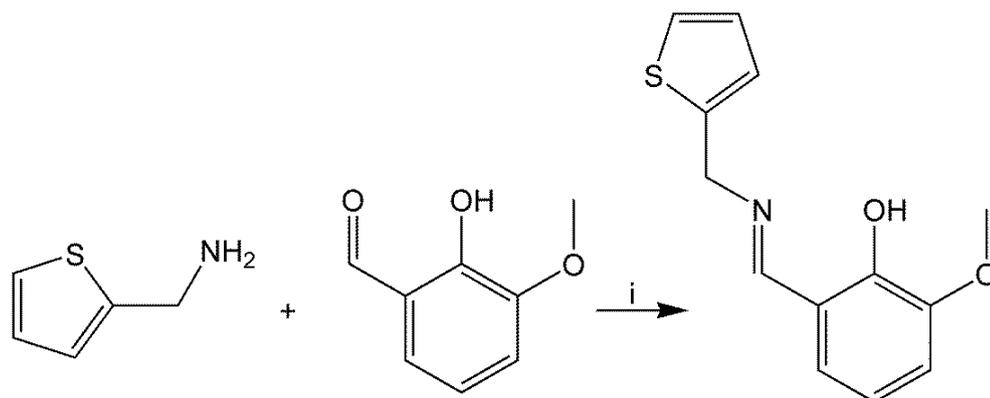
i = MeOH, 50°C

Fonte: Construção do autor.

4.3.1.9 Ligante L9 (2-Hidroxi-3-metoxibenzilideno metil tiofeno)

- 2-tiofenometilamina (0,51 g, $d = 1,10 \text{ g/mL}$), orto-vanilina (0,76 g), 15 mL de metanol. Tempo reacional de 20 horas. O óleo amarelo escuro obtido não precisou de purificação posterior. Rendimento de 57%. UV/VIS $\lambda_{\text{máx.}}$: 307 nm; ϵ : $9.631 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (DMSO [] $2,7534 \times 10^{-5}$); IR (Pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3423,89 [m, $\nu(\text{O-H})_{\text{álcool}}$]; 1631,34 [s, $\delta(\text{C-N})_{\text{imina}}$]. RMN (DMSO- d_6) 400 MHz: 1,36 s {3H} $\text{CH}_3(\text{éter})$; 3,38 s {2H} $\text{CH}_2(\text{imina})$; 6,78-7,25 m {6H} $\text{CH}(\text{aromático})$; 11,28 {1H} $\text{CH}(\text{imina})$.

Esquema 15: Esquema reacional ligante L9.



i = MeOH, 50°C

Fonte: Construção do autor.

4.3.2 Síntese dos complexos

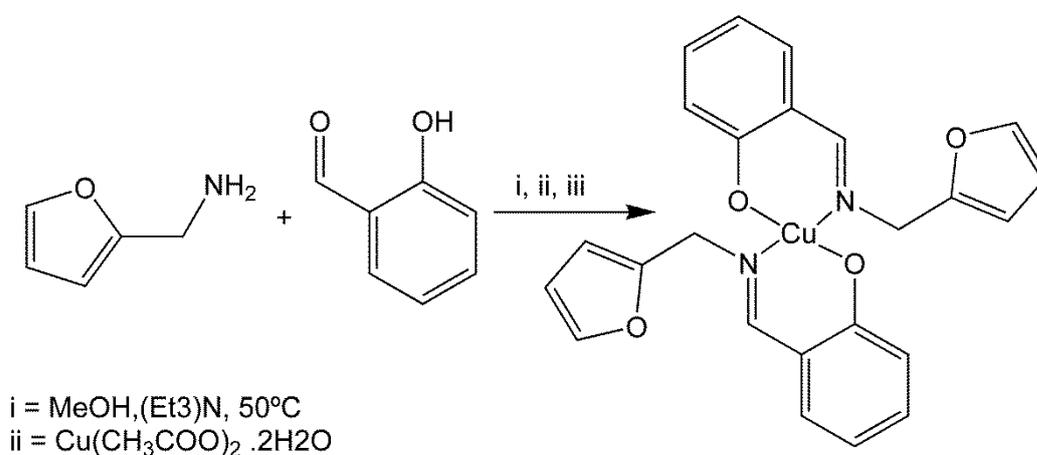
Os complexos foram sintetizados utilizando duas maneiras: *in situ* (uma vez que se constatou rendimento mais elevado do que com reações com ligantes previamente preparados) onde utilizou-se os 0,4 mmol de materiais de partida dos ligantes para 0,2 mmol do respectivo sal de cobre (II). Nas reações convencionais utilizou-se 0,4 mmol do ligante previamente preparado e 0,2 mmol do sal de cobre (II). Em ambas as maneiras os solventes utilizados foram metanol ou etanol, sob temperatura de 50 °C e agitação constante, por 1 hora. Além da utilização de base para desprotonação de hidrogênio ácidos para facilitar a reação.

4.3.2.1 Complexo C1:

- Reação *in situ*: furfurilamina (37 μL , $d= 1,05 \text{ g/mL}$), aldeído salicílico (42,6 μL , $d= 1,15 \text{ g/mL}$), 10 mL de metanol até total solubilização, seguida adicionou-se trietilamina (56 μL). Após prévia agitação de 15 minutos, adicionou-se acetato de cobre (II) dihidratado (0,039 g), Esquema 16. Observou a formação de precipitado verde escuro, o qual foi separado por filtração da solução inicial e solubilizado em THF. Ambos, precipitado solubilizado e solução inicial foram deixados em evaporação lenta. Após cinco dias observou-se a formação de

cristais verdes na solução preparada a partir do precipitado. Rendimento cristalino 32 %. P.F.: 204°C (dec); Anal. Elem.: $C_{24}H_{20}CuN_2O_4$; M.M. = 463,95 g/mol^{-1} ; Calculada: C 62,13; H 4,34; N 6,03 – Encontrada: C 61,23; H 4,64; N 6,09; UV/VIS $\lambda_{m\acute{a}x.}$: 270,79 e 370,54 nm; ϵ : 6.313 $M^{-1}.cm^{-1}$ (DMSO [] $2,7534 \times 10^{-5}$); IR (Pastilhas de KBr, cm^{-1}): 2902,01 [m, $\nu(C-H)$ aromático]; 1623,68 [s, $\delta(C=N)_{imina}$]; 1428,86 [m, $\nu(C-O)$]; 750,88 [m, $\nu(C-H)$ alifático]; 728,38 [m, $\nu(C-N)$].

Esquema 16: Esquema reacional complexo C1.



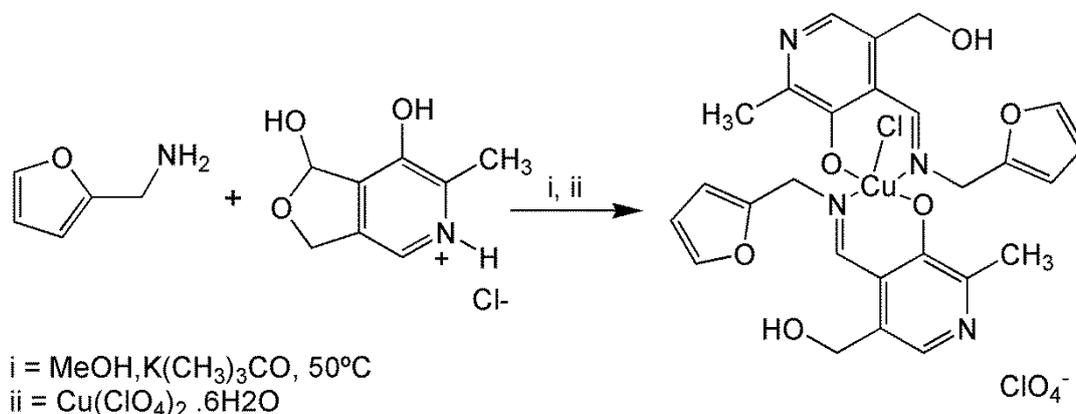
Fonte: Construção do autor.

4.3.2.2 Complexo C2:

- Reação *in situ*: furfurilamina (37 μ L, $d = 1,05$ g/mL), cloridrato de piridoxal (0,081) em 10 mL de metanol, posteriormente foram adicionados tert-butóxido de potássio (0,053 g). Após agitação magnética de 15 minutos adicionou-se perclorato de cobre (II) hexahidratado (0,074 g). Não houve a formação de precipitado e a solução transferida obtida inicialmente foi evaporada lentamente, o que ocasionou na formação de cristais verdes após 3 dias. Rendimento Cristalino de 38%. P.F.: 188°C (dec); Anal. Elem.: $C_{26}H_{28}N_4O_{10}Cl_2Cu$; M.M. = 690,96 g/mol^{-1} ; Calculada: C 45,19; H 4,08; N 8,10 - Encontrada: C 45,05; H 4,11; N 8,07; UV/VIS $\lambda_{m\acute{a}x.}$: 380 nm; ϵ : 6.017 $M^{-1}.cm^{-1}$ (DMSO [] $2,7534 \times 10^{-5}$); IR (Pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3111,83 [m, $\nu(O-$

H)_{álcool}]; 1624,27 [s, δ (C=N)_{imina}]; 1504,34 [m, ν (C–O)]; 741,25 [m, ν (C–H)_{alifático}]; 624,93 [m, ν (C–N)].

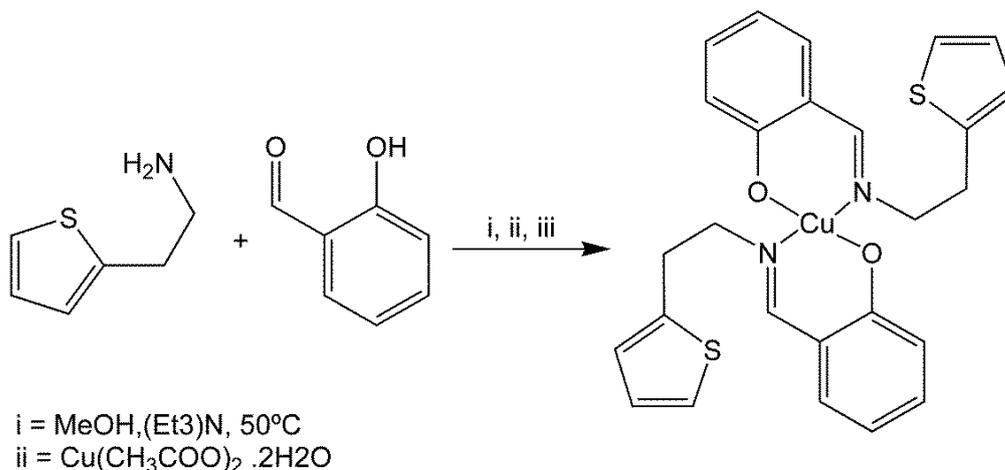
Esquema 17: Esquema reacional complexo C2.



Fonte: Construção do autor.

4.3.2.3 Complexo C3:

- Reação *in situ*: 2-tiofenoetilamina (46,8 μ L, d= 1,08 g/mL), aldeído salicílico (42,6 μ L, d= 1,15 g/mL), trietilamina (56 μ L) em 10 mL de metanol. Após 15 minutos foi adicionado ao sistema acetato de cobre (II) (0,039 g). Sendo separado o precipitado e solubilizado em THF, após o período reacional. Passados 6 dias de evaporação do solvente houve a formação de cristais verdes provenientes do precipitado solubilizado. Rendimento cristalino de 51 %. P.F.: 280°C (dec); Anal. Elem.: C₂₆H₂₄N₂O₂S₂Cu; M.M. = 524,13 g/mol⁻¹; Calculada: C 59,58; H 4,61; N 5,34 - Encontrada: C 60,05; H 4,70; N 5,31 UV/VIS $\lambda_{\text{máx}}$: 364 nm; ϵ : 6.613 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 3453,33 [m, ν (N–H)]; 3147,01 [m, ν (C–H)_{aromático}]; 1620,03 [s, δ (C=N)_{imina}]; 1472,00 [m, ν (C–O)]; 698,29 [m, ν (C–H)_{alifático}].

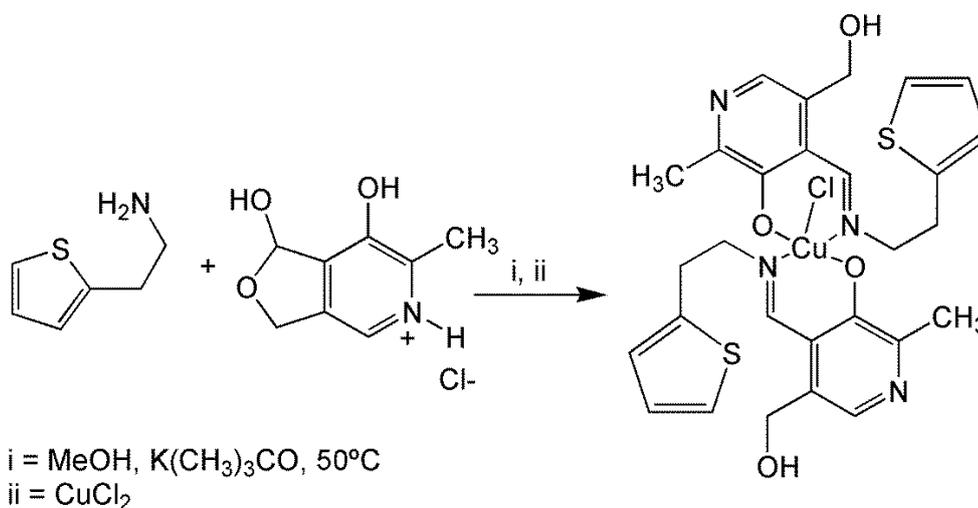
Esquema 18: Esquema reacional complexo C3.

Fonte: Construção do autor.

4.3.2.4 Complexo C4:

- Reação *in situ*: 2-tiofenoetilamina (47 µL, d= 1,08 g/mL), cloridrato de piridoxal (0,081 g), terc-butóxido de potássio (0,053 g) e 10 mL de metanol. Após 15 minutos foi adicionado cloreto de cobre (II) dihidratado (0,034 g). Não houve a formação de precipitado, sendo o solvente da solução evaporado lentamente, o que levou a formação de cristais verdes após 7 dias. Rendimento cristalino de 47%. P.F.: 192°C (dec); Anal. Elem.: C₂₈H₃₀N₄O₄S₂CuCl; M.M. = 649,66 g/mol⁻¹; Calculada: C 51,76; H 4,65; N 8,62 - Encontrada: C 51,77; H 4,66; N 8,68; UV/VIS λ_{máx.}: 257,20 e 386,49 nm; ε: 5.910 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 3271,32 [m, ν(O-H)_{álcool}]; 1630,63 [s, δ(C=N)_{imina}]; 1507,91 [m, ν(C-O)]; 844,96 [m, ν(C-H)_{alifático}]; 756,61 [m, ν(C-N)].

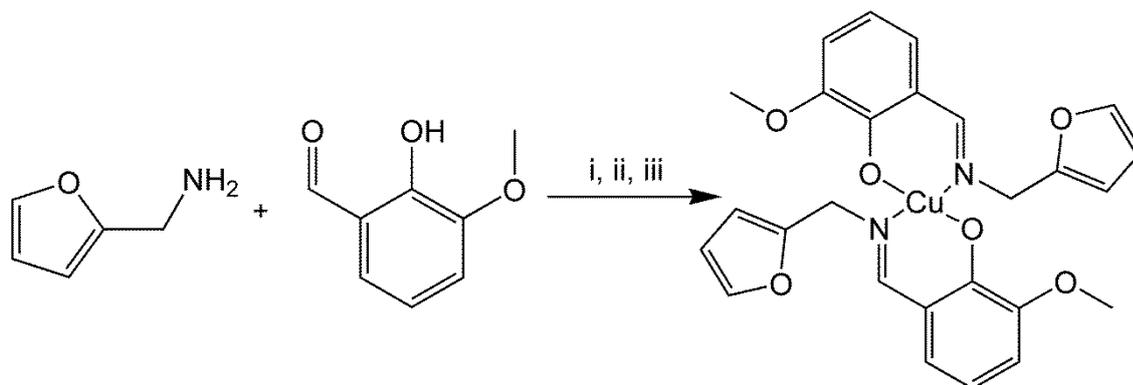
Esquema 19: Esquema reacional complexo C4.



Fonte: Construção do autor.

4.3.2.5 Complexo C5:

- Reação *in situ*: fufurilamina (37 μ L, $d = 1,05$ g/mL), orto-vanilina (0,060 g), trietilamina (56 μ L) e 10 mL de metanol. Após adicionou-se acetato de cobre (II) (0,039 g). Depois de 1 hora observou-se a formação de precipitado, sendo o mesmo solubilizado em THF. Os fracos com as soluções provenientes da reação de complexação foram colocados em evaporação lenta, havendo a formação de cristais verdes após 7 dias na solução proveniente do precipitado. Rendimento cristalino de 51%. P.F.: 217°C (dec); Anal. Elem.: $C_{26}H_{24}N_2O_6Cu$; M.M. = 524,01 g/mol⁻¹; Calculada: C 59,59; H 4,61; N 5,34; Encontrada: C 60,61; H 4,79; N 5,48; UV/VIS $\lambda_{m\acute{a}x.}$: 280,39 e 378,45 nm; ϵ : 6.179 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] $2,7534 \times 10^{-5}$); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 1620,17 [s, $\delta(C-N)_{imina}$]; 1476,79 [m, $\nu(C-O)$]; 1548,17 [m, $\nu(C=O)$]; 741,27 [m, $\nu(C-H)$ alifático].

Esquema 20: Esquema reacional complexo C5.

i = MeOH, (Et₃)N, 50°C

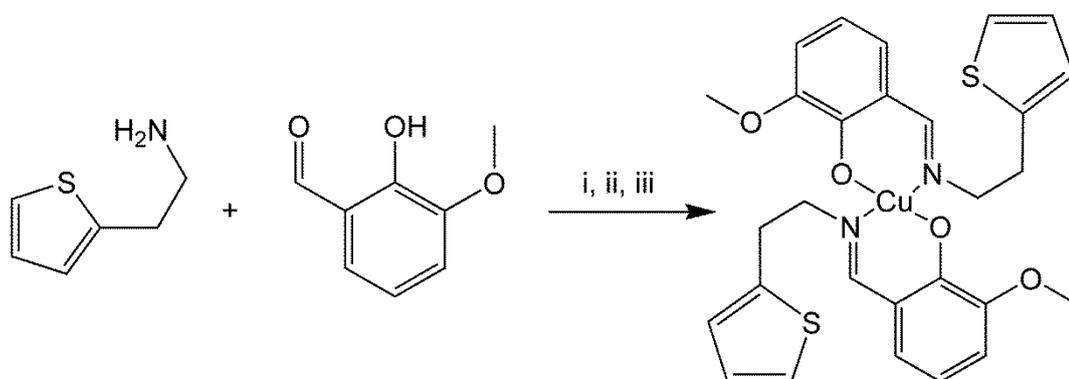
ii = Cu(CH₃COO)₂ · 2H₂O

Fonte: Construção do autor.

4.3.2.6 Complexo C6:

- Reação *in situ*: 2-tiofenoetilamina (46,8 µL, d= 1,08 g/mL), orto-vanilina (0,060 g), trietilamina (56 µL) e 10 mL de metanol. Em seguida adicionou-se acetato de cobre (II) (0,039 g). Após o tempo reacional foi realizada a filtração, assim separando a solução do precipitado, o qual foi solubilizado em THF. Passando 10 dias de evaporação do solvente houve a formação de cristais verdes provenientes da solução inicial. Rendimento cristalino de 65 %. P.F.: 184°C (dec); Anal. Elem.: C₂₈H₂₈N₂O₄S₂Cu; M.M. = 584,19 g/mol⁻¹; Calculada: C 57,56; H 4,82; N 4,79 - Encontrada: C 58,21; H 4,94; N 4,66; UV/VIS λ_{máx.}: 280,37 e 370,06 nm; ε: 6.401 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 1623,68 [s, δ(C-N)_{imina}], 1470,79 [m, ν(C-O)]; 1538,79 [m, ν(C=O)]; 750,88 [m, ν(C-H)_{alifático}], 728,38 [m, ν(C-N)].

Esquema 21: Esquema reacional complexo C6.



i = MeOH, (Et₃)N, 50°C

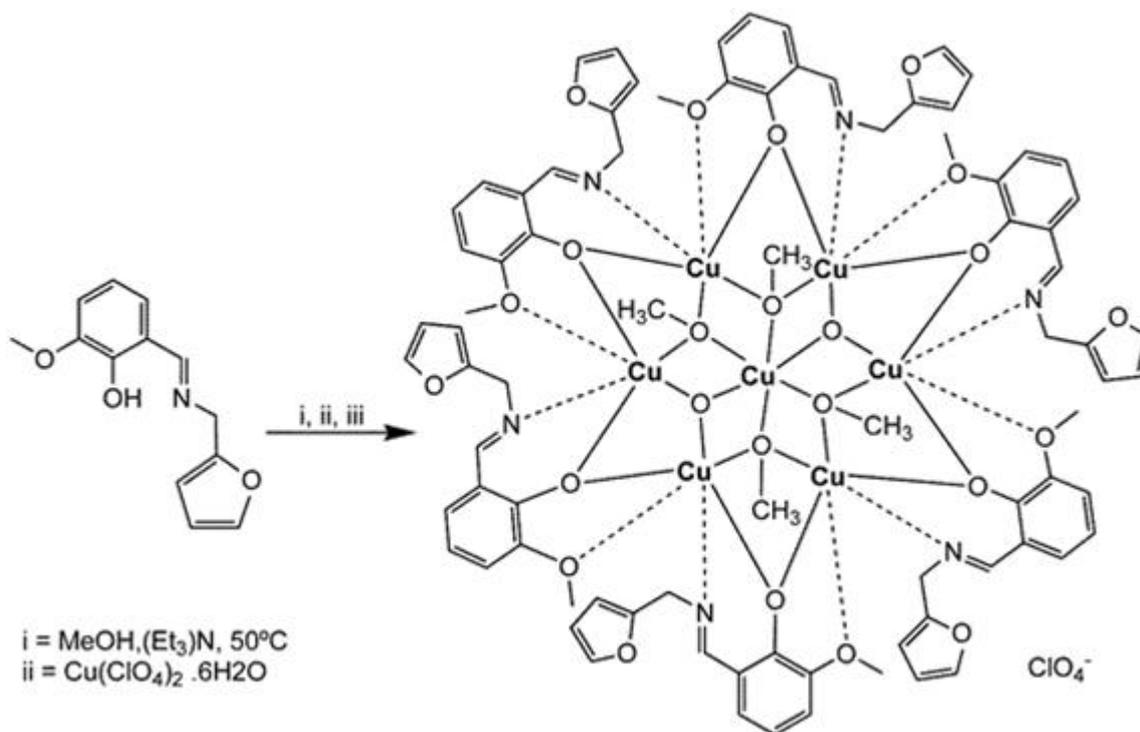
ii = Cu(CH₃COO)₂ · 2H₂O

Fonte: Construção do autor.

4.3.2.7 Complexo C7:

- Reação convencional: ligante L5 (2-Hidroxi-3-metoxibenzilideno etano furano) (0,0929 g), trietilamina (56 µL) em 10 mL de metanol. Após 15 minutos foi adicionado ao sistema perclorato de cobre (II) (0,074 g). Sendo realizada a filtração e solubilização em THF do precipitado formado após o tempo reacional. Passados 2 dias de evaporação do solvente houve a formação de cristais verdes provenientes do precipitado solubilizado. Rendimento cristalino de 25 %. P.F.: 160°C (dec); Anal. Elem.: C₈₂H₈₄N₆O₃₀Cu₇Cl; M.M. = 2113,55 g/mol⁻¹; Calculada: C 46,59; H 3,99; N 3,97 - Encontrada: C 44,31; H 4,56; N 3,25; UV/VIS λ_{máx.}: 295,78 nm; ε: 8.651 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 1618,24 [s, δ(C-N)_{imina}]; 1544,80 [m, ν(C-O)]; 738,97 [m, ν(C-H)_{alifático}]; 463,73 [m, ν(C-N)].

Esquema 22: Esquema reacional complexo C7.

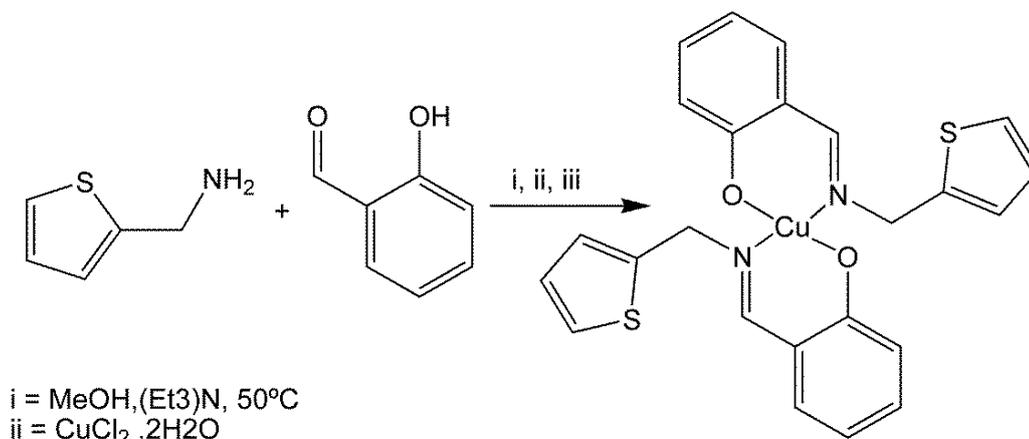


Fonte: Construção do autor.

4.3.2.8 Complexo C8:

- Reação *in situ*: 2-tiofenometilamina (41 µL, d= 1,10 g/mL), aldeído salicílico (42 µL, d= 1,15 g/mL), trietilamina (56 µL). Em seguida foi adicionado cloreto de cobre (II) dihidratado (0,034 g), sendo observado posteriormente, a formação de precipitado, que foi solubilizado em THF. Depois de 6 dias de evaporação houve a formação de cristais verdes na solução inicial. Rendimento cristalino de 41%. P.F.: 204°C (dec). Anal. Elem.: C₂₄H₂₀N₂O₂S₂Cu; M.M. = 496,04 g/mol⁻¹; Calculada: C 58,11; H 4,06; N 5,64 - Encontrada: C 58,23; H 4,17; N 5,89; UV/VIS λ_{máx.}: 369 nm; ε: 6.507 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 1622,17 [s, δ(C-N)_{imina}]; 1538,82 [m, ν(C-O)]; 756,68 [m, ν(C-H)_{alifático}]; 701,32 [m, ν(C-N)].

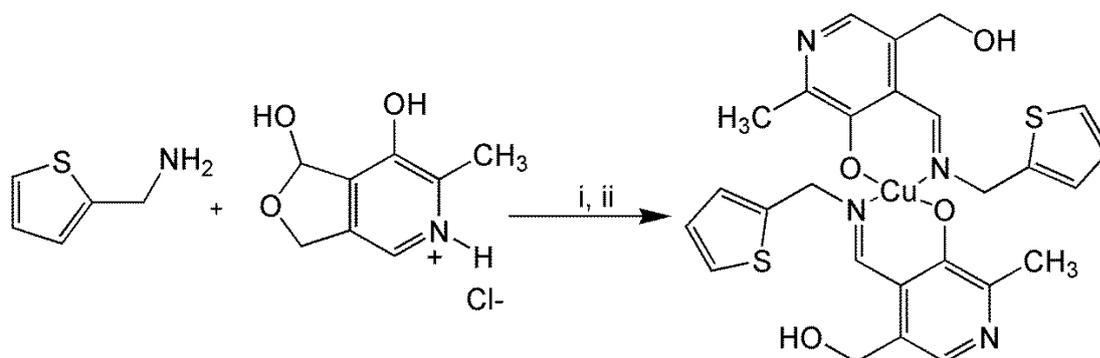
Esquema 23: Esquema reacional complexo C8.



Fonte: Construção do autor.

4.3.2.9 Complexo C9:

- Reação *in situ*: 2-tiofenometilamina (41 µL, d= 1,10 g/mL) e cloridrato de piridoxal (0,0814 g) em 10 mL de metanol com trietilamina (56 µL). Após adicionou-se acetato de cobre (II) dihidratado (0,039 g), ocorrendo a formação de precipitado avermelhado escuro, o qual foi separado por filtração da solução inicial. O precipitado foi solubilizado em acetonitrila e a solução inicial foram deixados em evaporação lenta. Após 24 dias observou-se a formação de cristais verdes na solução preparada a partir do precipitado. Rendimento cristalino 53%. P.F.: 192°C (dec); Anal. Elem.: C₂₆H₂₈N₄O₅S₂Cu; M.M. = 604,17 g/mol⁻¹; Calculada: C 51,68; H 4,33; N 9,27 - Encontrada: C 51,46; H 4,41; N 9,26; UV/VIS λ_{máx.}: 313,42 nm; ε: 8.021 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 3393 [m, ν(O-H)álcool]; 1623 [s, δ(C-N)_{imina}], 1551 [m, ν(C-O)]; 706 [m, ν(C-H)_{alifático}].

Esquema 24: Esquema reacional complexo C9.

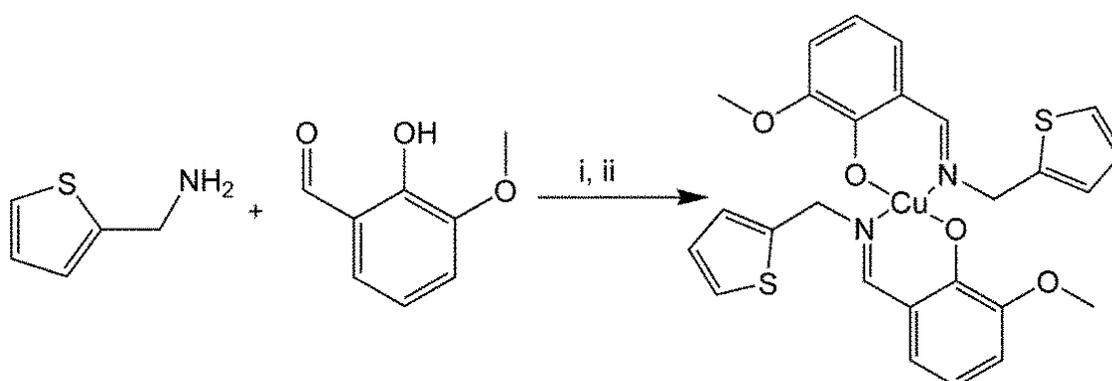
i = MeOH, Et₃N, 50 °C

ii = Cu(CH₃COOH)₂·2H₂O

Fonte: Construção do autor.

4.3.2.10 Complexo C10:

- Reação *in situ*: 2-tiofenometilamina (41 µL, d= 1,10 g/mL), orto-vanilina (0,060 g) e trietilamina (56 µL) em 10 mL de metanol. Posteriormente foi adicionado perclorato de cobre (II) hexahidratado (0,074 g), não havendo a formação de precipitado e após 6 dias de evaporação ocorrendo a formação de cristais verdes. Rendimento cristalino de 61%. P.F.: 201°C (dec); Anal. Elem.: C₂₆H₂₄N₂O₄S₂Cu; M.M. = 556,13 g/mol⁻¹; Calculada: C 56,15; H 4,34; N 5,03 - Encontrada: C 56,18; H 4,31; N 5,10; UV/VIS λ_{máx.}: 302,43 e 378,97 nm; ε: 6.112 M⁻¹.cm⁻¹ (DMSO [] 2,7534x10⁻⁵); IR (Pastilhas de KBr, cm⁻¹): 1623 [s, δ(C=N)_{imina}]; 1537 [m, ν(C–O)]; 748 [m, ν(C–H)_{alifático}]; 700 [m, ν(C–N)].

Esquema 25: Esquema reacional complexo C10.

i = MeOH, (Et₃)N, 50°C

ii = Cu(ClO₄)₂·6H₂O

Fonte: Construção do autor.

5. Apresentação dos resultados

5. Apresentação dos resultados

5.1. Resultados cristalográficos

Ao decorrer dessa seção apresenta-se as discussões sobre os dados cristalográficos dos complexos obtidos, sendo os mesmos agrupados conforme o grupo espacial ao qual pertencem, além disso, os grupos estão dispostos conforme o aumento simétrico destes. Os parâmetros cristalográficos estão apresentados no anexo 7.6.

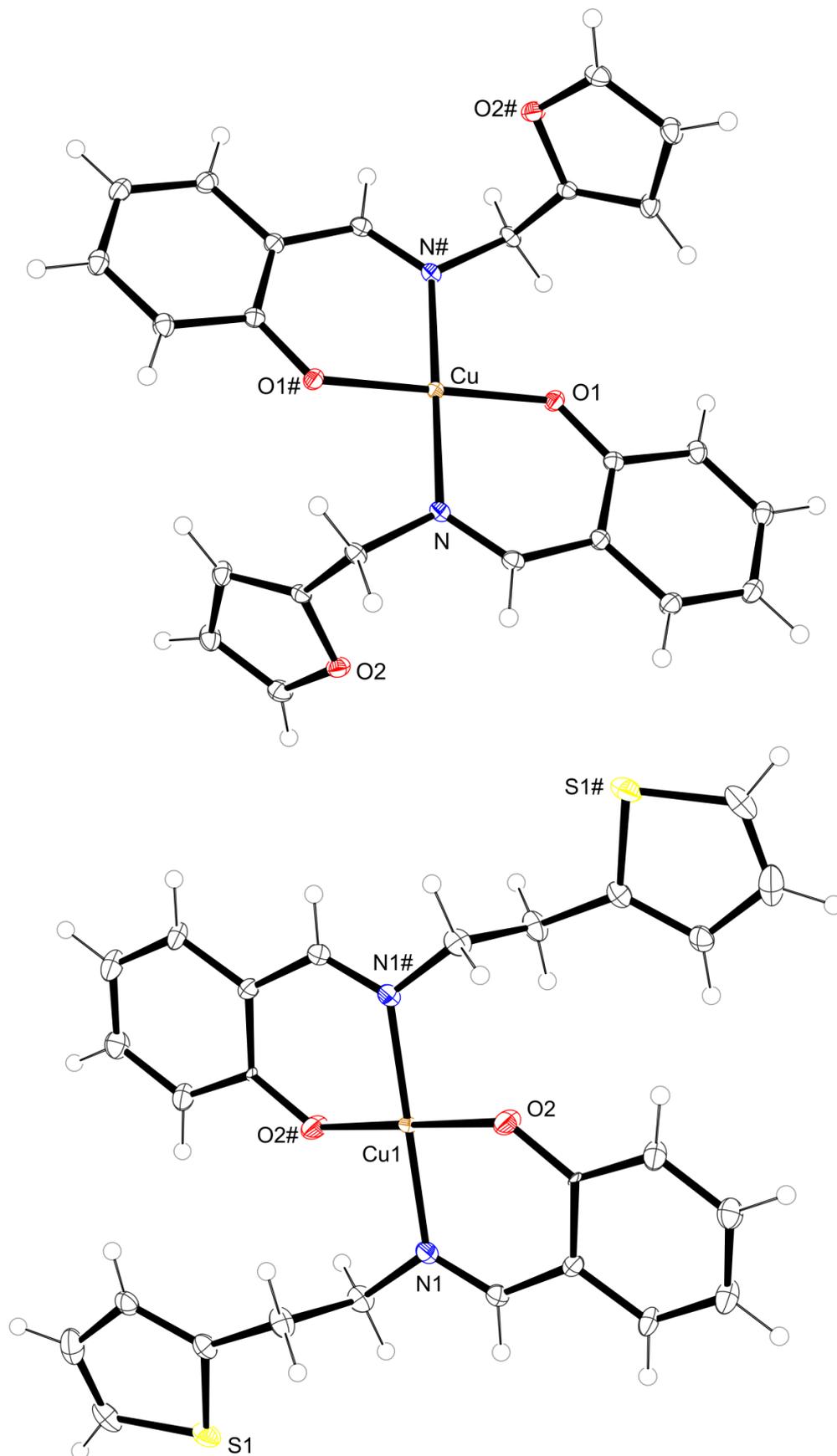
5.1.1. Grupo espacial $P\bar{1}$

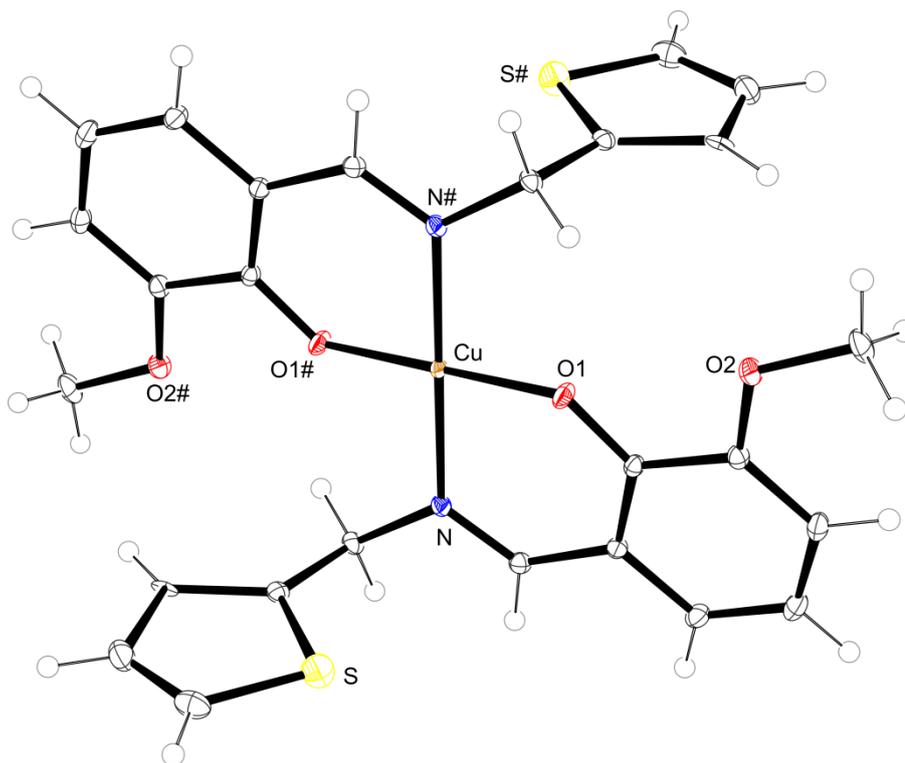
Primeiramente serão discutidos os complexos **C1**, **C3**, **C7** e **C10**, que segundo a análise de raios X em monocristal cristalizaram no sistema triclinico, grupo espacial centrossimétrico $P\bar{1}$ (nº 2 da *International Tables of Crystallography*)⁷⁸.

De acordo com a análise cristalográfica realizada dos complexos citados acima, mostram-se a ausência sistemática nas condições de reflexão da classe integral (hkl) coletadas indicando assim, um tipo de Bravais P para suas celas unitárias. A representação do empacotamento da estrutura cristalina na cela unitária na análise das operações de simetria são centros de inversão $\bar{1}$ na origem da cela unitária em [0 0 0].

A representação ORTEP da estrutura molecular dos complexos **C1**, **C3** e **C10**, estão despostas na figura 20 na respectiva ordem de cima para baixo, onde é possível observar que os ligantes atuam de forma polidentada coordenados ao centro metálico por um nitrogênio N da imina e um oxigênio O fenolato, a esfera de coordenação completa-se com o oxigênio fenolato e nitrogênio imínico de outra molécula de ligante. Os complexos apresentam número de oxidação II (configuração d^9) com geometrias quadráticas distorcidas.

Figura 20: Projeção da estrutura molecular dos complexos **C1**, **C3** e **C10**, respectivamente. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. Operação de simetria $-x, 1-y, 1-z$ (#).

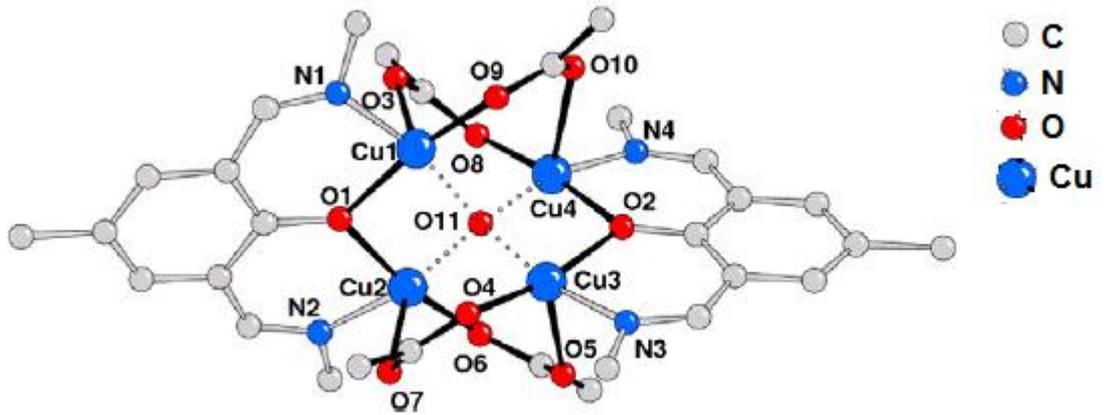




Fonte: Construção do autor.

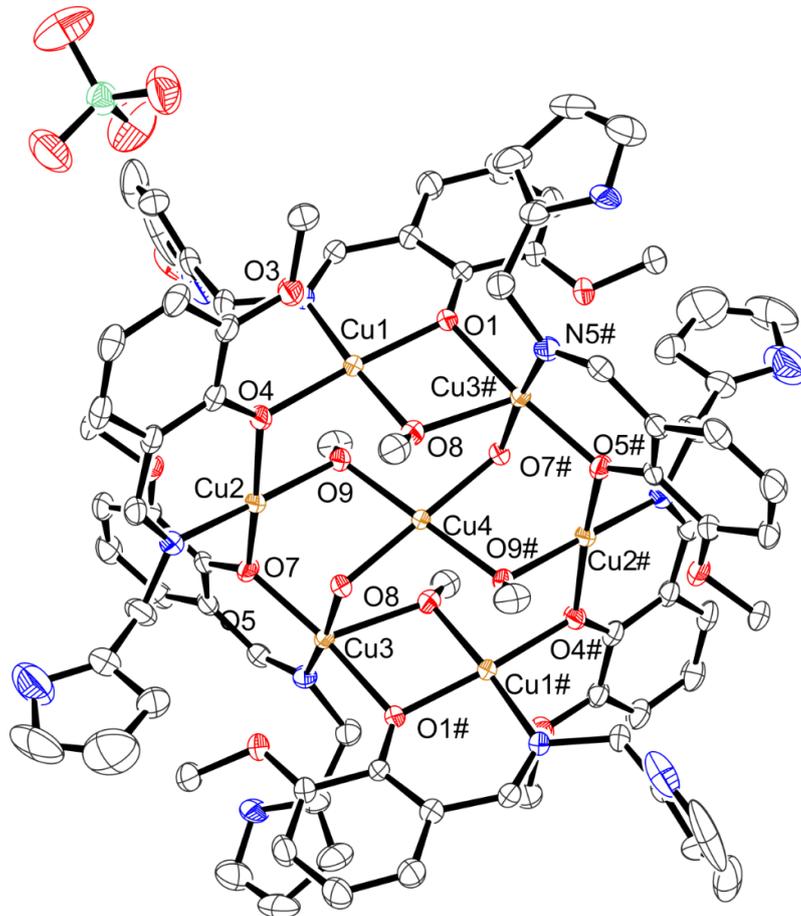
Na figura 22 têm-se a representação ORTEP da estrutura molecular do complexo **C7**, onde o mesmo foi obtido através de um possível processo de autoassociação⁷⁹, onde o oxigênio fenolato e o oxigênio da função metóxido estão associados aos metais através de ligações do tipo μ , assim possibilitando a coordenação dos 7 íons de Cu^{II} na molécula. Um exemplo de um complexo supramolecular de cobre foi sintetizado por Das⁸⁰ e col. (2012), onde na estrutura molecular (figura 21) têm-se a presença de 4 íons de Cu^{II} coordenados com átomos de nitrogênio imínicos e de oxigênio provenientes do ânion acetato, onde cada átomo de oxigênio está coordenado a dois átomos de cobre distintos, assim realizando ligações em ponte μ . O ligante L5 atua de maneiras distintas nas reações *in situ* e reações tradicionais para complexação com Cu^{II} onde na reação *in situ* o ligante coordena o íon metálico de forma monodentada, diferentemente da reação convencional onde a cinética reacional leva a formação do heptâmero. O complexo C7 apresenta número de oxidação II (configuração d^9) com geometria octaédrica distorcida.

Figura 21: Estrutura molecular de complexo com quatro átomos de cobre(II).



Fonte: Adaptado de Das e col. (2012).

Figura 22: Projeção da estrutura molecular do complexo C7. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. Não foram representados os hidrogênios e solvatos de cristalização para melhor visualização. Operação de simetria $1-x, 1-y, -z$ (#).



Fonte: Construção do autor.

As distâncias das ligações referentes às esferas de coordenação dos complexos **C1**, **C3**, **C7** e **C10** estão na Tabela 4. Estes valores estão de acordo com os valores encontrados na literatura para ligações N(imina)-Cu^{II} e O(fenolato)-Cu^{II}.

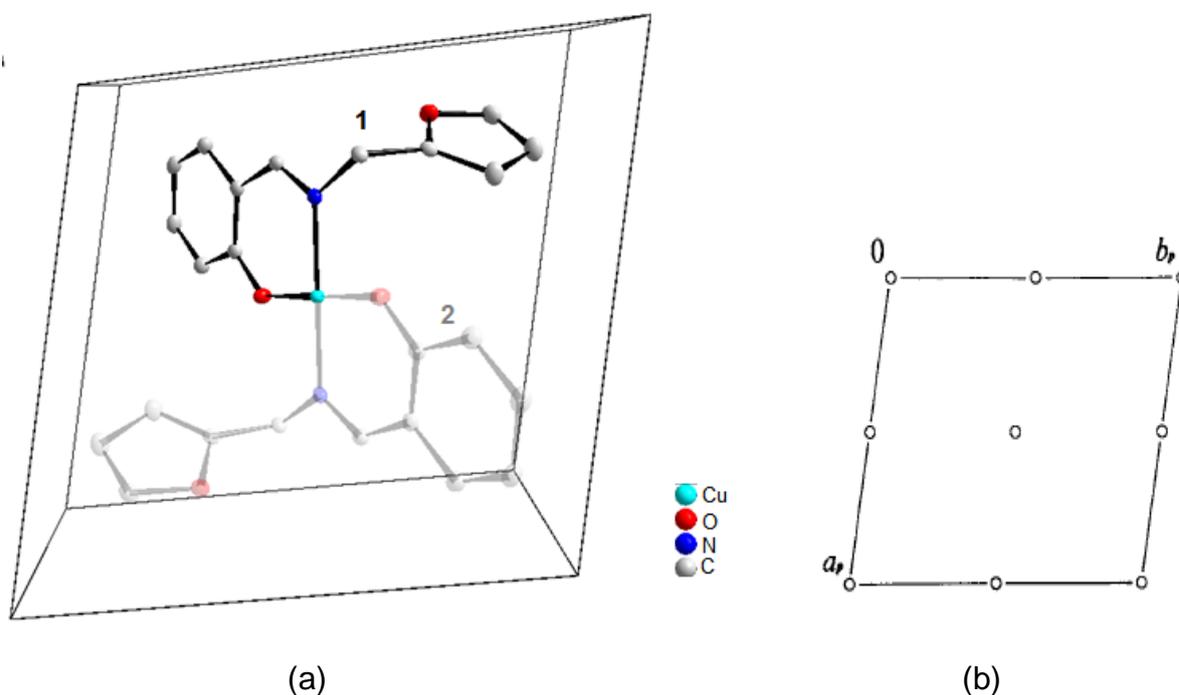
Tabela 4: Distâncias (Å) ligações C1, C3, C7 e C10.

Ligação	C1	C3	C7	C10	Referência ^{65, 81}
Cu-N (N imínico)	1.9982	2.013(9)	1.983(4)	1.9936(19)	2.008 e 1,99
Cu-O (fenolato)	1.8942	1.905(8)	1.965(3)	1.8940(17)	1.995 e 1,87

O complexo **C1** foi escolhido para representar a projeção do conteúdo da cela no plano *ab* e o pictograma do grupo espacial $P\bar{1}$ retirado da *International Tables for Crystallography*⁷⁸.

A figura 23, apresenta a representação do operador de simetria contido no grupo espacial $P\bar{1}$ e a projeção da cela unitária do complexo **C1** na direção cristalográfica [100]. A unidade assimétrica da molécula, representada pelo número 1 está associada com a unidade de número 2 por meio de um centro de inversão localizado sob o átomo de cobre, como observado no diagrama de operadores de simetria do grupo espacial $P\bar{1}$.

Figura 23: Projeção do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C1 no plano cb (a), diagrama de operadores de simetria do grupo espacial $P\bar{1}$ (b). Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos.



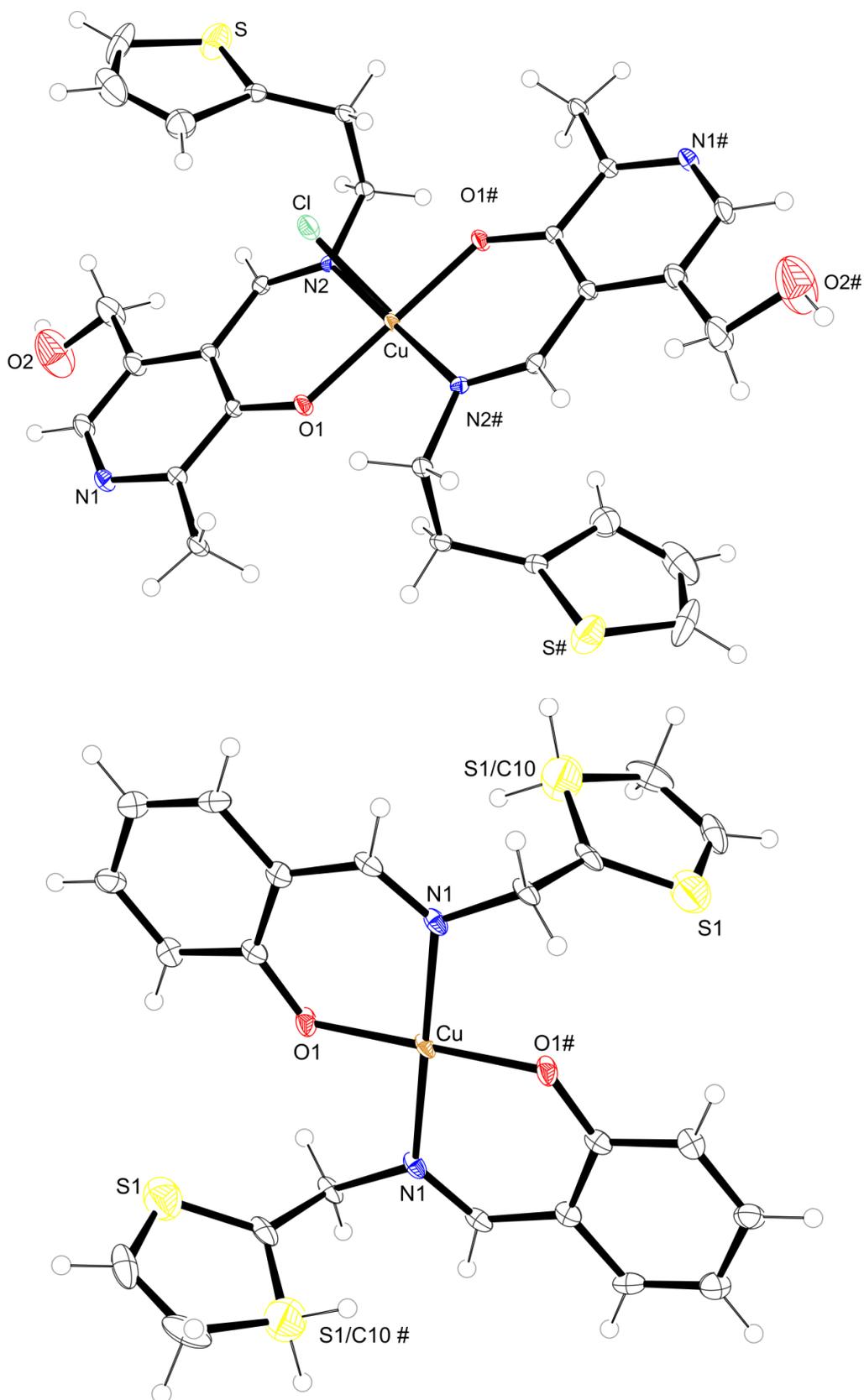
Fonte: Construção do autor.

5.1.2. Grupo espacial $P2_1/n$

Os complexos **C4** e **C8** cristalizaram no sistema cristalino monoclinico, grupo espacial $P2_1/n$ (n° 11 da *International Tables of Crystallography*)⁷⁸ e foi definido pela ausência de extinções sistemáticas nas reflexões da classe integral (hkl) indicando um tipo de Bravais P para a cela unitária, enquanto as condições de reflexão zonais ($h0l$, $0kl$, $hk0$) e seriais ($0k0$, $h00$, $00l$) estão vinculadas aos elementos de simetria c , n e 2_1 . O grupo espacial é centrossimétrico, com simetria de Laue $2/m$.

A representação ORTEP da estrutura molecular do complexo **C4** e **C8** (figura 24, ordem respectiva de cima para baixo), apresenta a coordenação dos ligantes ao centro metálico, por meio do nitrogênio da imina e do oxigênio fenolato, completando-se a esfera de coordenação com outra molécula do mesmo ligante assim, os complexos apresentam número de oxidação II (configuração d^9), onde o complexo **C4** possui geometria pirâmide de base quadrada distorcida e o complexo **C8** com geometria quadrática distorcida.

Figura 24: Projeção da estrutura molecular do complexo C4 e C8, respectivamente. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. O complexo C8 apresenta desordem do enxofre do tiofeno. Operação de simetria x, y, z (#).



Fonte: Construção do autor.

A tabela 5 apresenta as distâncias das ligações Cu-N(imínico) e Cu-O(fenolato) referentes à esfera de coordenação dos complexos **C4** e **C8**, as quais estão de acordo com os valores encontrados na literatura^{82,83}.

Tabela 5: Comprimento das ligações da esfera de coordenação dos complexos C4 e C8.

Ligação	Complexo 4	Complexo 8	Referências ^{82,83}
Cu-N (N imínico)	2.014	2.003	2,382 e 2,025
Cu-O (fenolato)	1.920	1.897	1,958 e 1,970

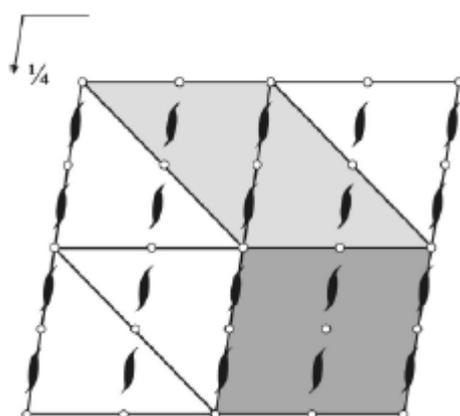
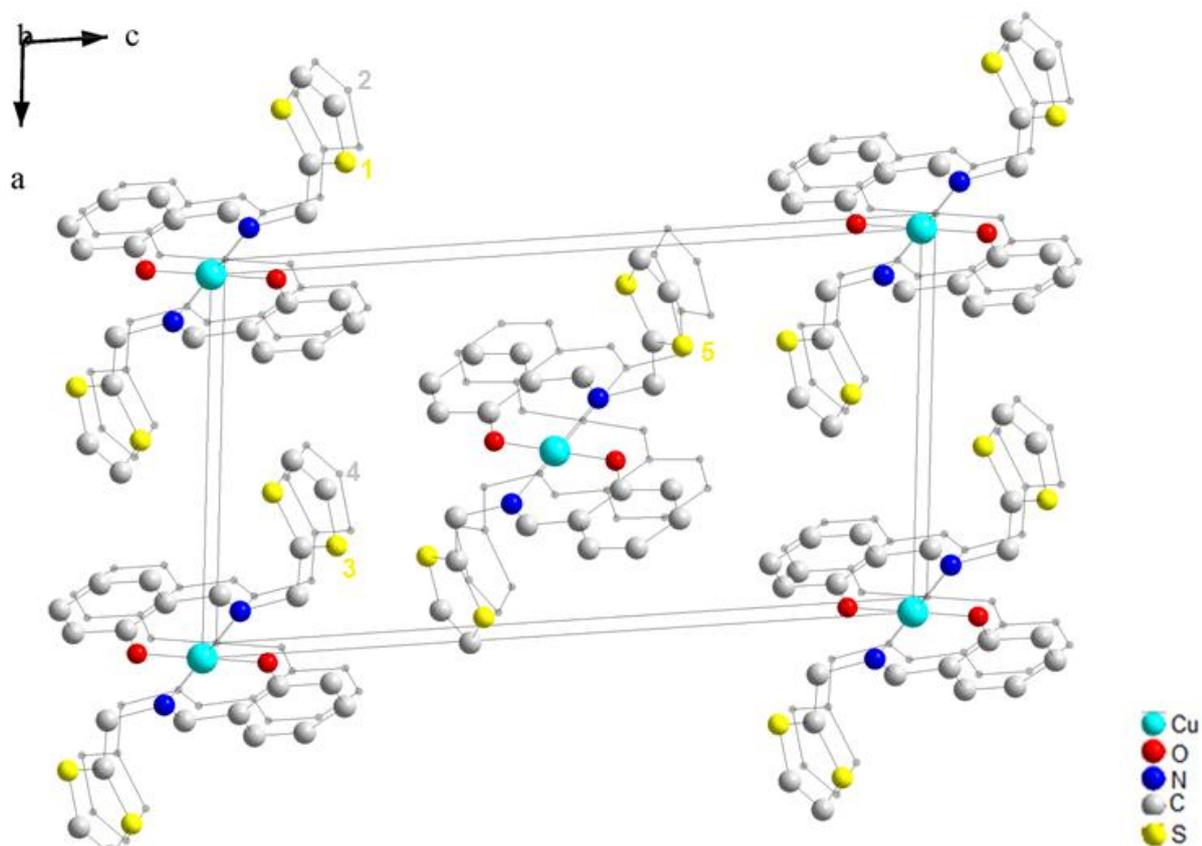
Como os complexos **C4** e **C8** pertencem ao mesmo grupo espacial, o complexo **C8** foi selecionado para representar a projeção do conteúdo da cela no plano *ca* e o pictograma do grupo espacial $P2_1/n$ foi retirado da *International Tables for Crystallography*⁷⁸, figura 25. As condições de reflexão observadas para a determinação do grupo espacial estão listadas na tabela 6.

Tabela 6: Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do grupo espacial $P2_1/n$.

Domínio da condição	Reflexão	Condição de reflexão	Interpretação
Integral	hkl	-	P
Zonal	$h0l$	$h + l = 2n$	Operador n
Serial	$0k0$	$k = 2n$	Operador 2_1

A figura 25, representa os operadores de simetria contidos no grupo espacial $P2_1/n$ e a projeção da cela unitária do complexo **C4** na direção cristalográfica [010]. Assim, observa-se que a molécula 1 está relacionada com a molécula 2 por meio de um centro de inversão. A molécula 1 relaciona-se com a molécula 3 de por meio de um eixo de rotação-translação 2_1 , além de um glide plane na direção [010], originando assim molécula 5, que está localizada no plano *ac*. Por fim, a molécula 3 está associada com a molécula 4 por um centro de inversão.

Figura 25: Projeção do empacotamento cristalino na célula unitária (a) e diagrama de operadores de simetria (b) do complexo C4 no plano ca , grupo espacial $P2_1/n$. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos.



Fonte: Construção do autor.

5.1.3. Grupo espacial $P2_1/c$

A partir da análise de raios X em monocristal conclui-se que o complexo **C5** cristalizou no sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1/c$ (n° 14 da *International Tables of Crystallography*)⁷⁸.

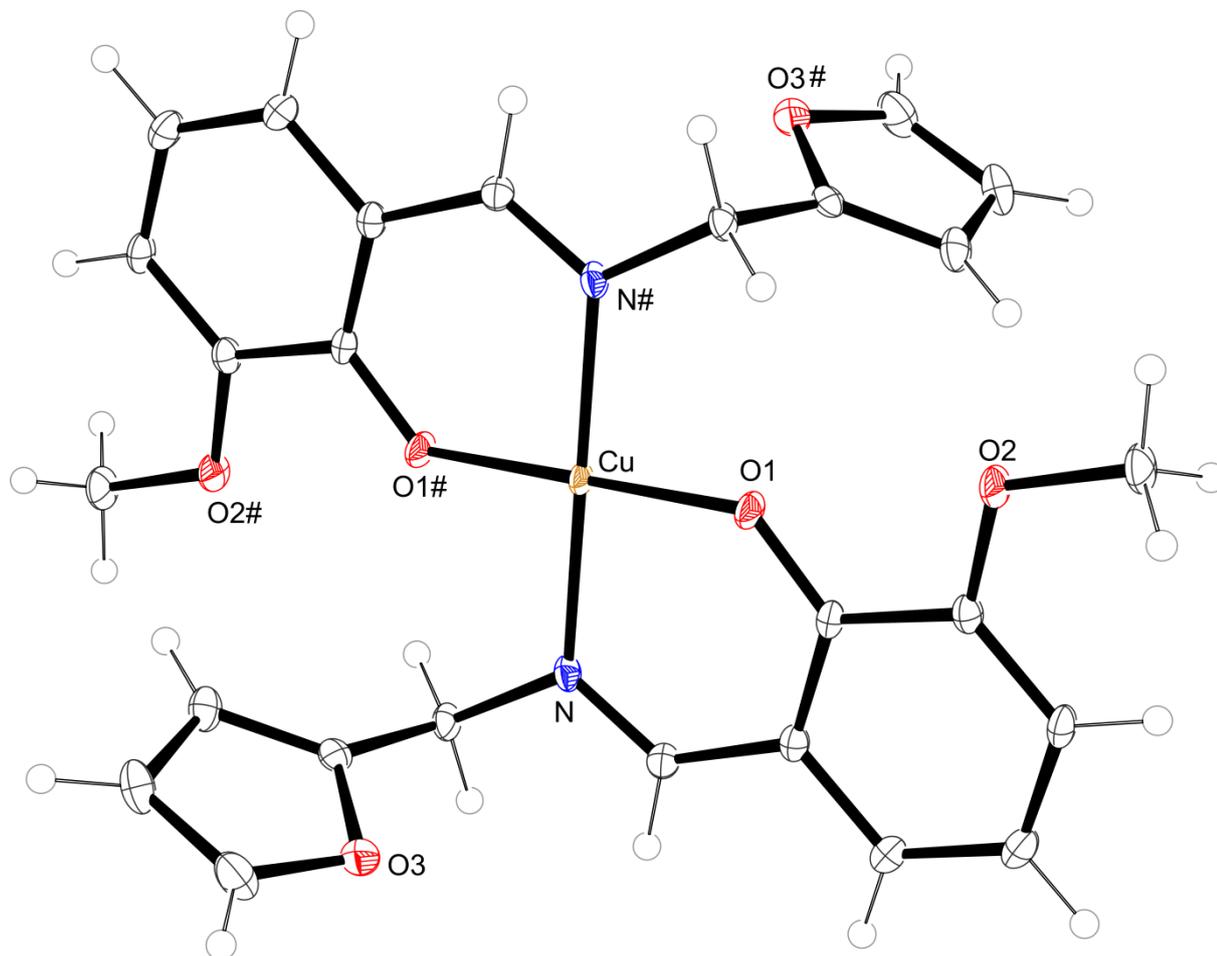
A ausência de extinções sistemáticas nas reflexões da classe integral (hkl) foi determinante para um tipo de Bravais P para a cela unitária. As condições das reflexões zonais (h0l, 0kl, hk0) e seriais (0k0, h00, 00l) estão vinculadas aos operadores de simetria c e 2_1 . O grupo espacial $P2_1/c$ é centrossimétrico e apresenta simetria de Laue $2/m$.

O complexo **C5** apresenta geometria quadrática distorcida e número de oxidação II (configuração d^9) estando coordenado ao centro metálico por um N da imina e um O do fenolato, a esfera de coordenação desses complexos completam-se com outra molécula do ligante L5, figura 26. As distâncias das ligações principais são: Cu-N 2.002 Å, Cu-O1 1.9042 Å, estando de acordo com os valores encontrados na literatura^{89,90}.

Tabela 7: Comprimento das ligações da esfera de coordenação dos complexos C5.

Ligação	Complexo 5	Referências ^{89,90}
Cu-N (N imínico)	2.002	2,009 e 2,015
Cu-O (fenolato)	1.9042	1,903 e 1,939

Figura 26: Projeção da estrutura molecular do complexo C5. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. Operação de simetria x, y, z (#).



Fonte: Construção do autor.

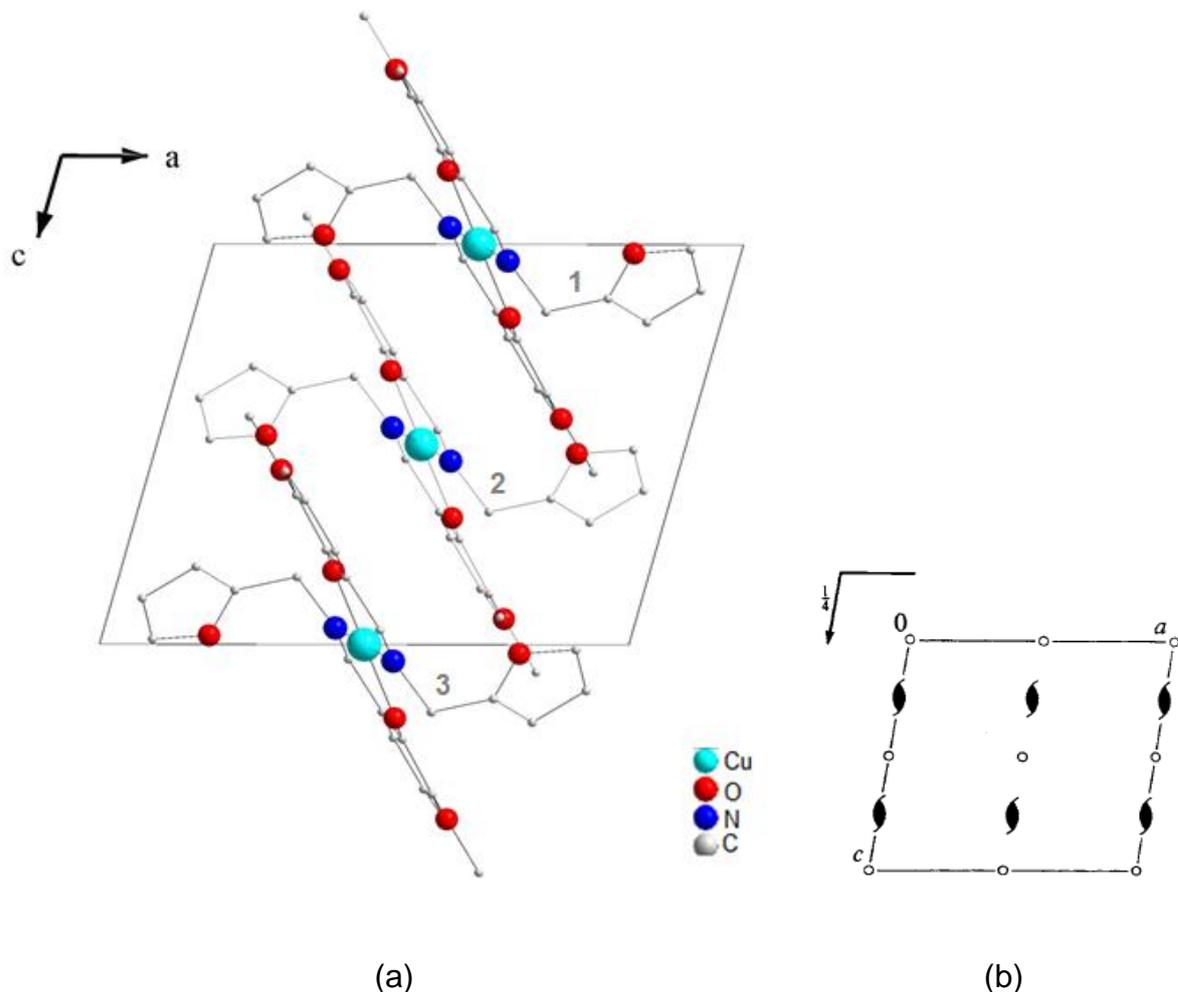
A figura 27 apresenta a projeção do conteúdo da cela no plano ca do complexo **C5** e o pictograma do grupo espacial $P2_1/c$ retirado da *International Tables for Crystallography*⁷⁸. A tabela 8 apresenta as condições de reflexões para o grupo $P2_1/c$.

Tabela 8: Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do grupo espacial $P2_1/c$.

Domínio da condição	Reflexão	Condição de reflexão	Interpretação
Integral	Hkl	-	P
Zonal	$h0l$	$l = 2n$	$c \perp [0\ 1\ 0]$
Serial	$0k0$	$k = 2n$	$2_1 // [0\ 1\ 0]$
Serial	$00l$	$l = 2n$	$2_1 // [0\ 0\ 1]$

A figura 27, mostra a representação dos operadores de simetria contidos no grupo espacial $P2_1/c$ e a projeção da cela unitária do complexo **C5** na direção cristalográfica [001]. Observa-se que as unidades assimétricas da molécula 1 relacionam-se por meio de um centro de inversão. Além disso, a molécula 1 relaciona-se com a molécula 2 por um eixo de rotação-translação 2_1 . Isto significa que a molécula 1, a $\frac{1}{2}$ unidade de cela acima do plano ac , sofre uma rotação de ordem 2 seguida de uma translação na direção [001] assim tendo assim, a molécula 2.

Figura 27: Projeção do empacotamento cristalino na cela unitária (a) e diagrama de operadores de simetria (b) do complexo **C5** no plano ab , grupo espacial $P2_1/c$. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos.



Fonte: Construção do autor.

5.1.4. Grupo espacial $C2/c$

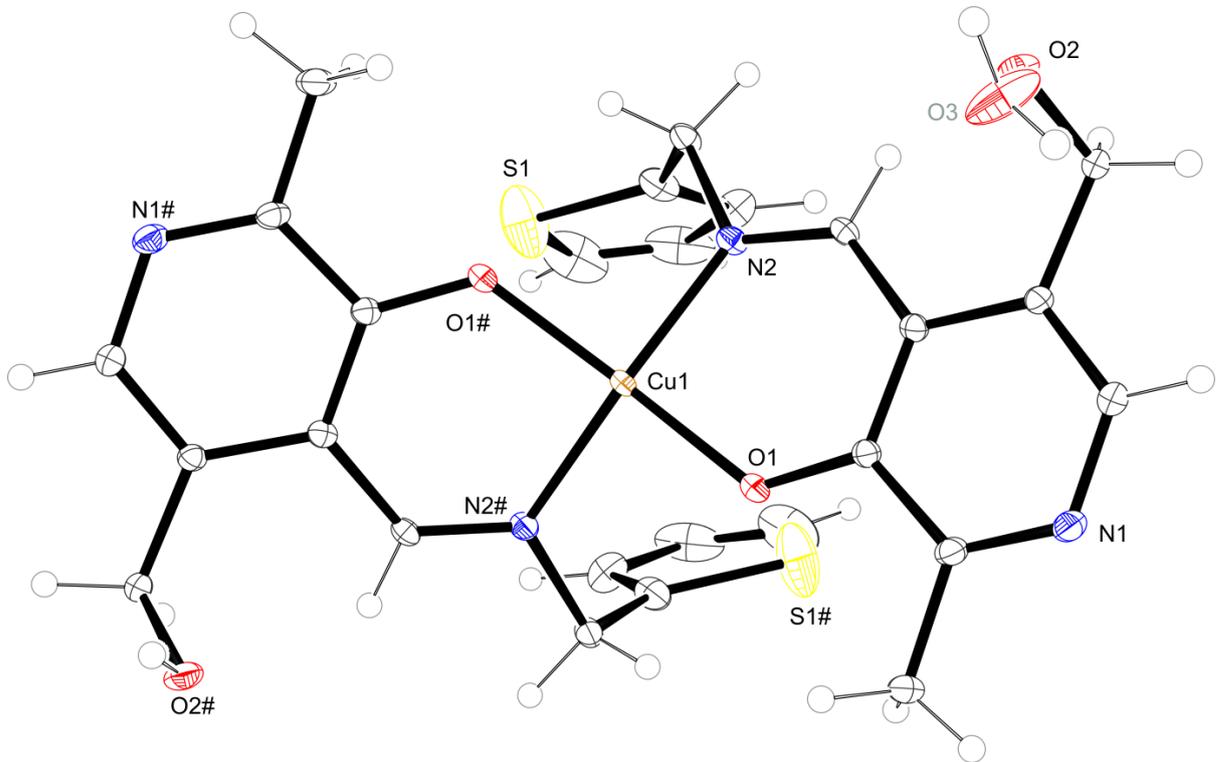
A estrutura do complexo **C9** resolveu-se no sistema cristalino monoclinico, grupo espacial centrossimétrico $C2/c$, N° 15 da *International Tables of Crystallography*⁷⁸ com simetria Laue $2/m$. As extinções sistemáticas das reflexões da classe integral (hkl) indicam um tipo de Bravais C para a cela unitária, enquanto as extinções das reflexões zonais ($h0l$, $0kl$, $hk0$) e seriais ($0k0$, $h00$, $00l$) vinculam-se aos elementos de simetria c , b , n e 2_1 .

O complexo **C9** apresenta geometria quadrática distorcida e número de oxidação II (configuração d^9). A esfera de coordenação é satisfeita pela coordenação do centro metálico a um N da imina, um O do fenolato, completando-se com outra molécula do ligante L8, figura 28. As distâncias das ligações principais são: Cu-N2 1.961 Å, Cu-O1 1.897 Å, estando de acordo com os valores encontrados na literatura^{84,85}.

Tabela 9: Comprimento das ligações da esfera de coordenação do complexo C9.

Ligação	Complexo 9	Referências ^{84,85}
Cu-N (N imínico)	1,961	1,958 e 1,944
Cu-O (fenolato)	1,897	1,906 e 1,890

Figura 28: Projeção da estrutura molecular do complexo C9. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. Operação de simetria 1-x, y, ½-z (#).



Fonte: Construção do autor.

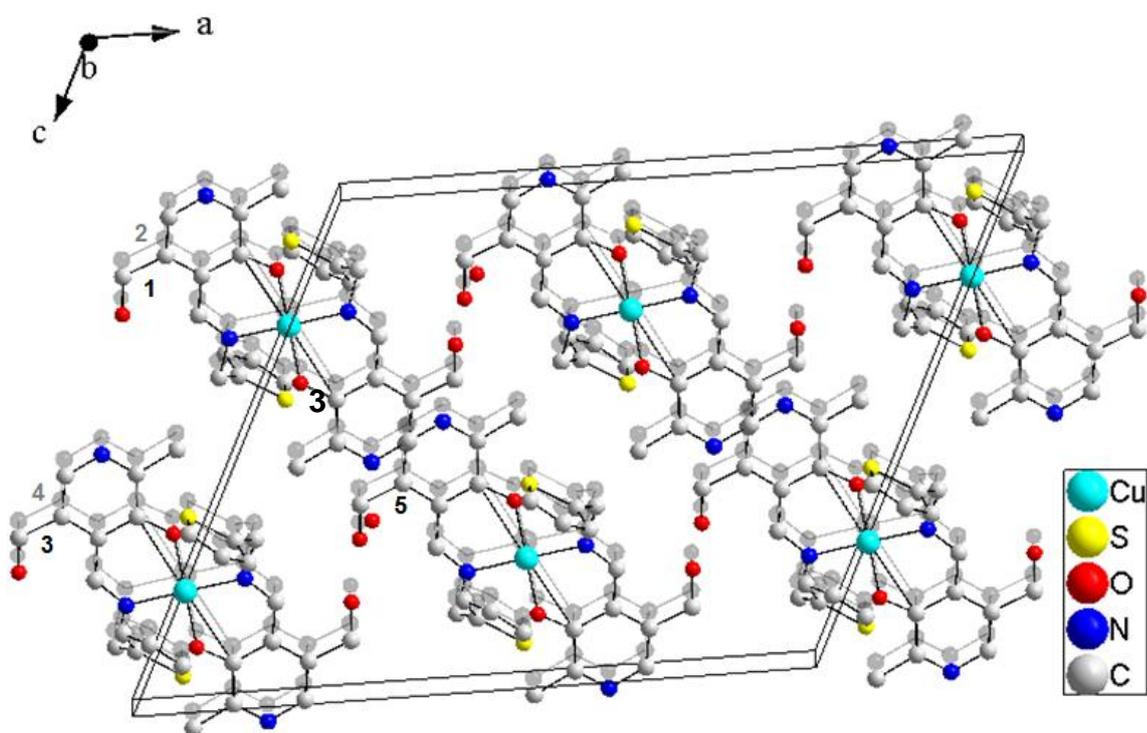
Na figura 29, têm-se projeção do conteúdo da cela no plano *ca* do complexo **C9** e o pictograma do grupo espacial *C2/c* retirado da *International Tables for Crystallography*⁷⁸. A tabela 10 apresenta as condições de reflexões para o grupo *C2/c*.

Tabela 10: Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do grupo espacial *C2/c*.

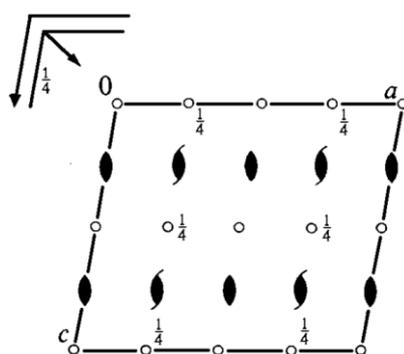
Domínio da condição	Reflexão	Condição de reflexão	Interpretação
Integral	hkl	$h+l = 2n$	C
Zonal	$h0l$	$l = 2n$	$c \perp [0\ 1\ 0]$
Zonal	$0kl$	$k = 2n$	$b \perp [1\ 0\ 0]$
Zonal	$hk0$	$h+k = 2n$	$n \perp [0\ 0\ 1]$
Serial	$0k0$	$k = 2n$	$2_1 // [0\ 1\ 0]$
Serial	$h00$	$h = 2n$	$2_1 \perp [1\ 0\ 0]$
Serial	$00l$	$l = 2n$	$2_1 \perp [0\ 0\ 1]$

A projeção de empacotamento na figura 29 apresenta os elementos de simetria contidos nesse grupo para o complexo **C9**, onde observa-se que a molécula 1 está relacionada com a molécula 2 através de um centro de inversão. Já, a molécula 1 relaciona-se com a molécula 3 por um eixo de rotação de ordem 2. Por conseguinte, a molécula 3 associa-se com a 4 por outro centro de inversão. Além disso, a molécula 1 relaciona-se com a molécula 5 por um centro de inversão situada a $\frac{1}{4}$ de cela.

Figura 29: Projeção do empacotamento cristalino na cela unitária no plano *ac* (a) e diagrama de operadores de simetria (b) do complexo C9, grupo espacial *C2/c*. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos.



(a)



(b)

5.1.5. Grupo espacial *Pnna*

Através da análise de raio X em monocristal o complexo **C2** cristalizou-se no sistema ortorrômbico, grupo espacial *Pnna* (n° 52 da *International Tables of Crystallography*)⁷⁸.

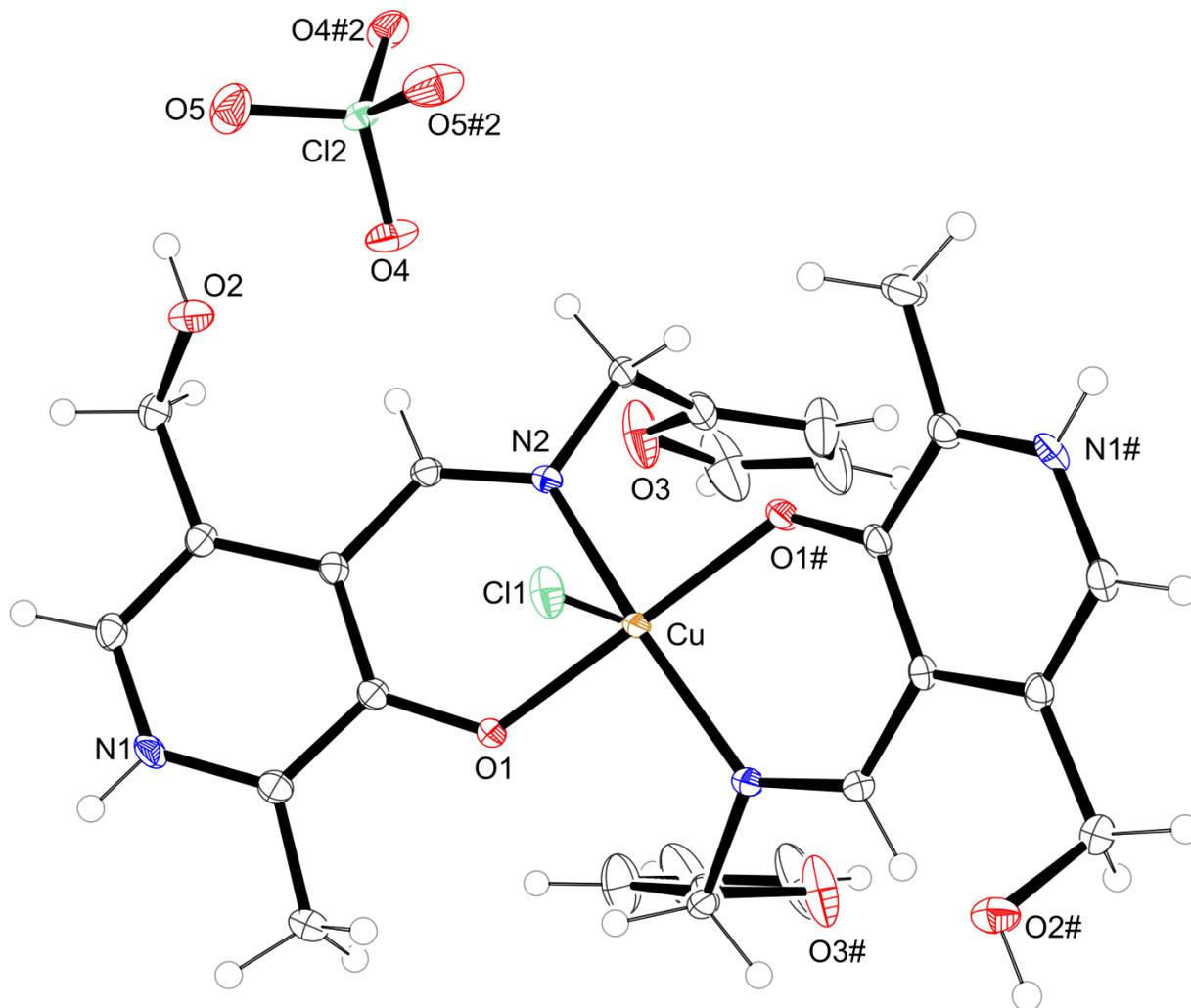
A ausência de extinções sistemáticas nas reflexões da classe integral (hkl) foi determinante para um tipo de Bravais *P* para a cela unitária. As condições das reflexões zonais (0kl, k0l, hk0) e seriais (0k0, h00, 00l) estão vinculadas aos operadores de simetria $2/n$, $2_1/n$ e $2/a$. Esse grupo é centrossimétrico e apresenta simetria de Laue *mmm*.

A representação ORTEP da estrutura do complexo C2 mostra o ligante L2 coordena o íon de cobre por um nitrogênio N da imina e um oxigênio O do fenolato, sendo a esfera de coordenação completa com outra molécula de ligante, além da coordenação ao cloro, figura 30. O complexo C2 apresenta os N piridínicos protonados, tendo a presença de um cloro e de um perclorato na esfera de coordenação, justificando o número de oxidação II (configuração d^9) com geometria pirâmide de base quadrada distorcida. As distâncias das ligações principais são: Cu-N2 1.993 Å, Cu-O1 1.913 Å, Cu-Cl1 2.6839 Å estando de acordo com os valores encontrados na literatura ^{71,84,86,87,88}.

Tabela 11: Comprimento das ligações da esfera de coordenação dos complexos C2.

Ligação	Complexo 2	Referências
Cu-N (N imínico)	1,993	2,008 ⁷¹ e 1,9450 ⁸⁶
Cu-O (fenolato)	1,913	1,995 ⁸⁴ e 1,9217 ⁸⁶
Cu-Cl	2,6839	2,5509 ⁸⁸

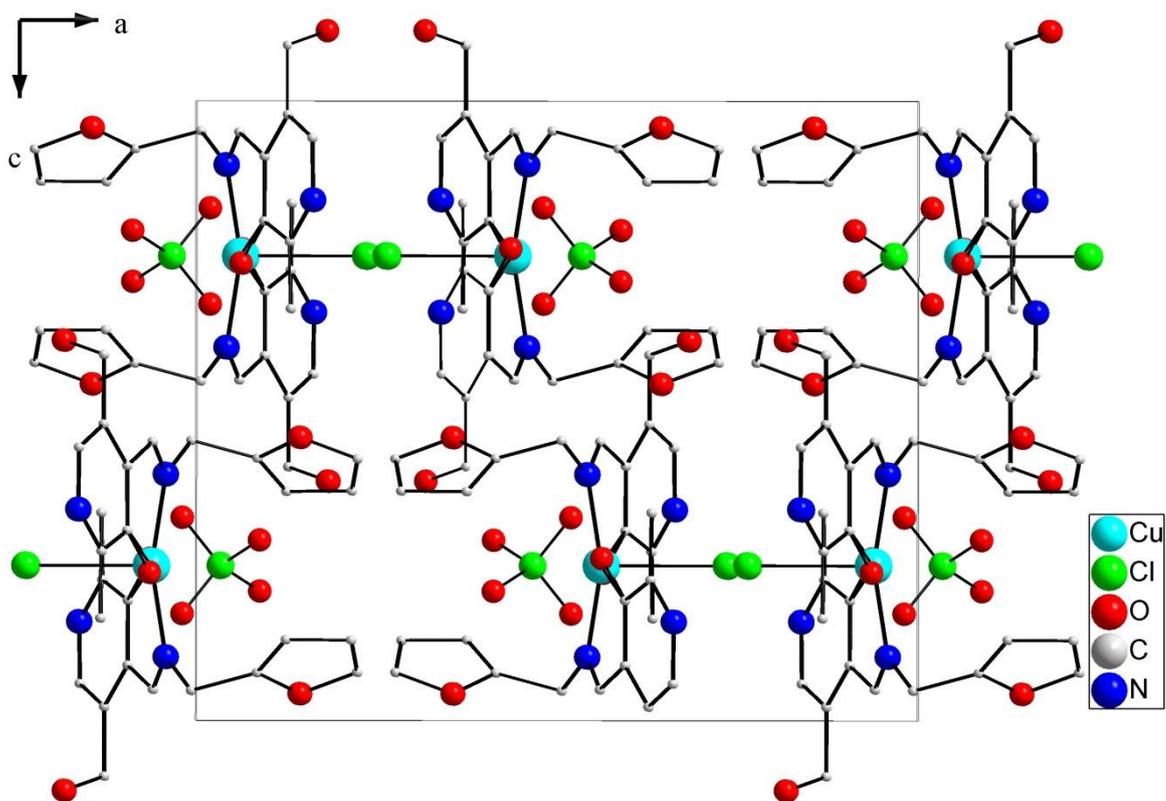
Figura 30: Projeção da estrutura molecular do complexo C2. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. Operação de simetria $x, \frac{1}{2}-y, \frac{1}{2}-z$ (#).



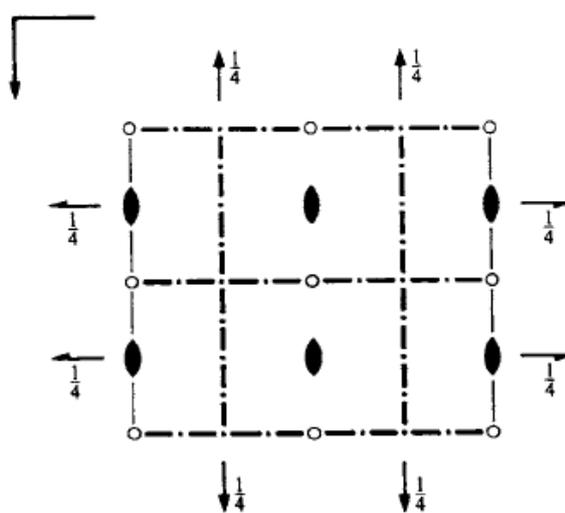
Fonte: Construção do autor.

A figura 31 representa a projeção do conteúdo da cela do complexo C2 e o pictograma do grupo espacial *Pnna* retirado da *International Tables for Crystallography*⁷⁸.

Figura 31: Projeção do empacotamento cristalino na célula unitária do complexo C2 (a) e diagrama de operadores de simetria (b) do complexo C2. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos.



(a)



(b)

Fonte: Construção do autor.

5.1.6. Grupo espacial *Pbca*

Através da análise de raio X em monocristal o complexo **C6** cristalizou-se no sistema ortorrômbico, grupo espacial *Pbca* (n° 61 da *International Tables of Crystallography*)⁷⁸.

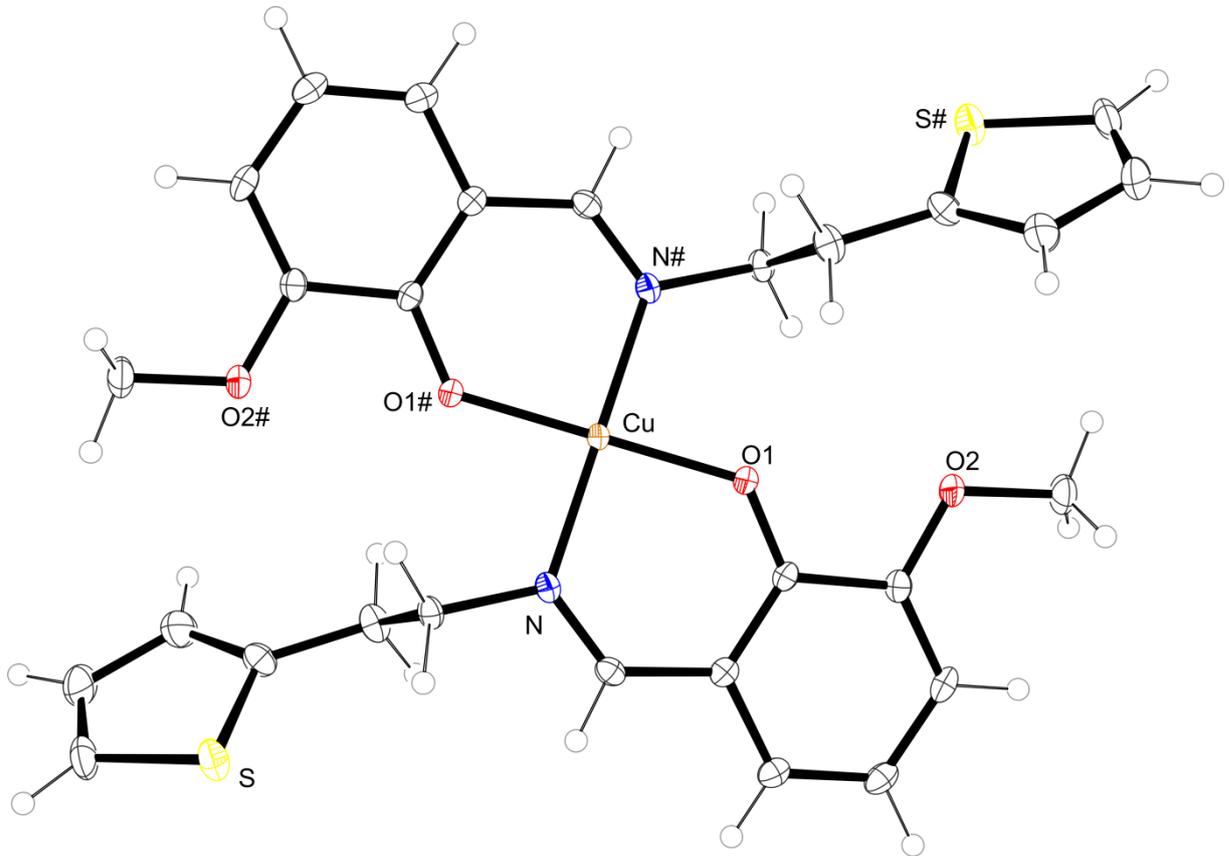
A ausência de extinções sistemáticas nas reflexões da classe integral (hkl) foi determinante para um tipo de Bravais *P* para a cela unitária. As condições das reflexões zonais (h0l, 0kl, hk0) e seriais (0k0, h00, 00l) estão vinculadas aos operadores de simetria 2_1 e *a,b,c*. Esse grupo é centrossimétrico e apresenta simetria de Laue *mmm*.

A representação ORTEP da estrutura do complexo C6 mostra que o ligante L6 coordena o cobre por um nitrogênio N da imina e um oxigênio O1 do fenolato, a esfera de coordenação completa-se com outra molécula de ligante, figura 32. O complexo C6 apresenta número de oxidação II (configuração d^9) com geometria quadrática distorcida. As distâncias das ligações principais são: Cu-N 1,979 Å, Cu-O1 1,891 Å, estando de acordo com os valores encontrados na literatura^{90,71}.

Tabela 12: Comprimento das ligações da esfera de coordenação dos complexos C6.

Ligação	Complexo 6	Referências
Cu-N (N imínico)	1,979	2,0175 ⁹⁰ e 2,008 ⁷¹
Cu-O (fenolato)	1,891	1,9217 ⁹⁰ e 1,995 ⁷¹

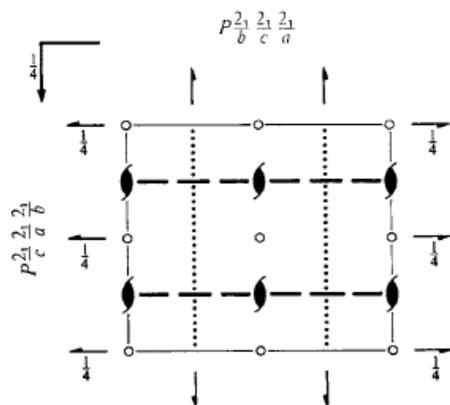
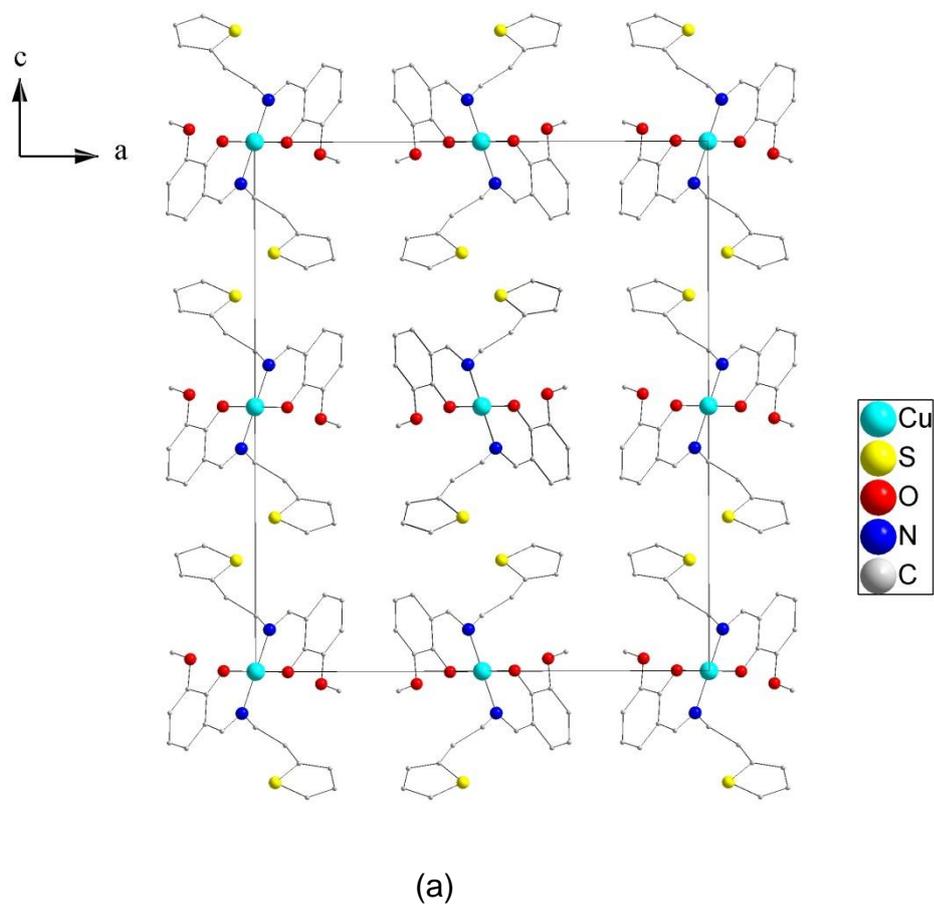
Figura 32: Projeção da estrutura molecular do complexo C6. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. Operação de simetria 1-x, 1-y, 1-z (#).



Fonte: Construção do autor.

A figura 33 representa a projeção do conteúdo da cela do complexo C6 e o pictograma do grupo espacial *Pbca* retirado da *International Tables for Crystallography*⁷⁸.

Figura 33: Projeção do empacotamento cristalino na célula unitária do complexo C6 no plano ca (a) e diagrama de operadores de simetria (b) do complexo C6. Para melhor visualização os hidrogênios foram omitidos e para os carbonos reduziram-se as elipsóides.



Fonte: Construção do autor.

Tabela 13: Condições de reflexão observadas para a rede com simetria ortorrômbica do grupo espacial $Pbca$.

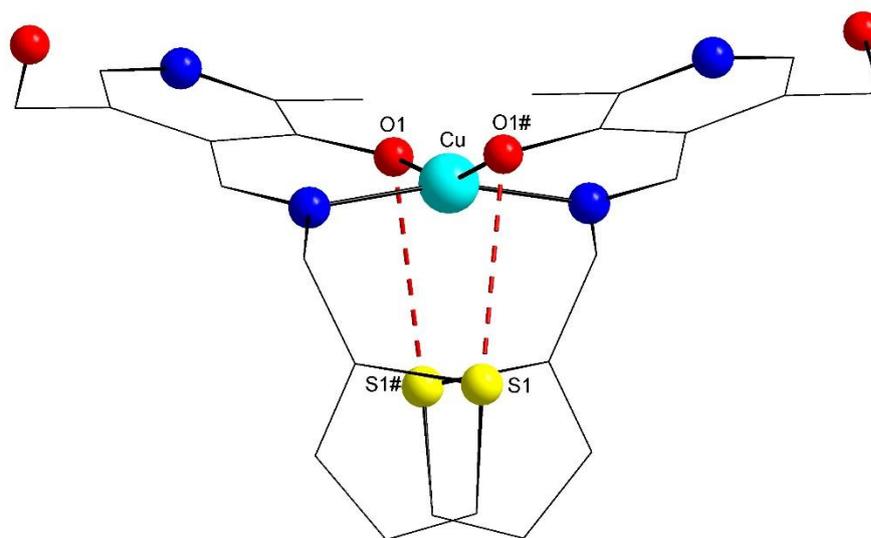
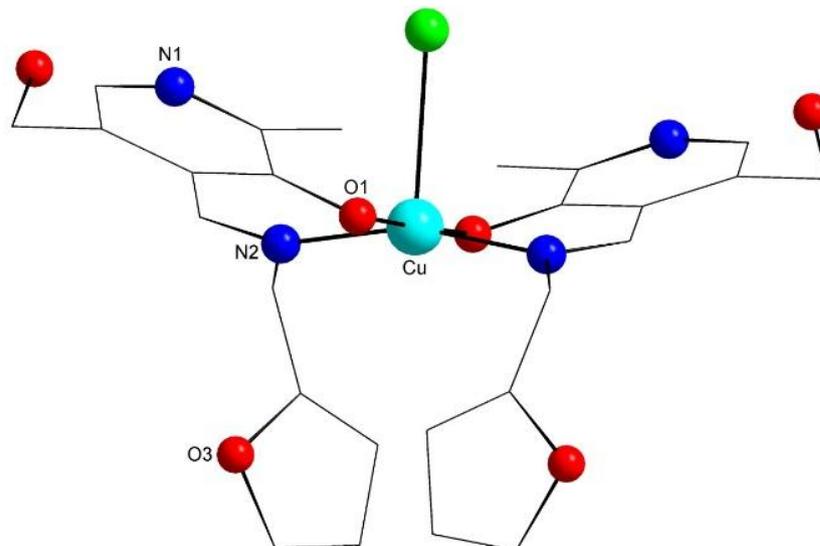
Domínio da condição	Reflexão	Condição de reflexão	Interpretação
Integral	hkl	-	P
Zonal	$0kl$	$k = 2n$	Operador b
Zonal	$h0l$	$l = 2n$	Operador c
Zonal	$hk0$	$h = 2n$	Operador a
Serial	$h00$	$h = 2n$	Operador 2_1
Serial	$0k0$	$k = 2n$	Operador 2_1
Serial	$00l$	$l = 2n$	Operador 2_1

Os ângulos das ligações dos átomos em cada complexo estão dispostos na tabela 14. Como é possível observar, na maioria dos complexos os ângulos de ligações O(1)-Cu-O(3) e N(2)-Cu-N(2) são similares, estando em torno de 180° , por consequência as geometrias apresentam distorções espaciais menos evidentes. Porém, os complexos **C2**, **C7** e **C9** apresentaram variação nesses ângulos. No caso do complexo **C7**, trata-se de um heptâmero, onde as unidades assimétricas de reprodução estão ligadas por ligações μ do oxigênio da função fenolato e do oxigênio da função metoxi, assim, por consequência, ocorre esta distorção nas ligações.

No caso do complexo **C2**, esperava-se que houvesse apenas a coordenação dos ligantes de forma bidentada, totalizando uma geometria de coordenação quadrática similar aos exemplos anteriores, no entanto, ocorre à coordenação de um terceiro ligante, um cloreto. Assim, existe uma alteração da planaridade da ligação N(2)-Cu-N(2) apresentando uma alteração de 8° fora do plano o que modifica sensivelmente o ângulo de ligação (figura 34).

Por fim, para o complexo **C9**, apesar da ausência de ligações envolvendo um átomo de cloro, como no exemplo do complexo C2, ocorrem alterações no plano das ligações tanto para os ângulos N(2)-Cu-N(2) como O(1)-Cu-O(3) de forma ainda mais evidente. No entanto, neste caso, esta alteração é explicada pelas interações não-clássica S1-O1 (ilustradas em vermelho tracejado). Tais alterações podem ser vista na figura 34.

Figura 34: Distorções nos complexos C2 e C9, respectivamente.



Fonte: Construção do autor.

Tabela 14: Ângulo das ligações dos complexos C1 - C10

Ligação	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	Ref.
O(1)-Cu-N(2)	91,82	90,40	89,50	89,40	91,50	91,68	91,50	91,70	92,92	91,49	91,79 ⁹⁵ 90,26 ⁹⁷
O(1)-Cu-O(3)	180,00	178,50	180,00	180,00	180,00	180,00	171,40	180,00	158,38	180,00	172,76 ⁸⁸ 180,00 ⁸⁹
N(2)-Cu-N(2)	180,00	162,50	180,00	180,00	180,00	180,00	*	180,00	163,32	180,00	180,00 ^{98,90}
O(1)-Cu-Cl	*	89,25	*	*	*	*	*	*	*	*	87,03 ⁹⁶
N(2)-Cu-Cl	*	98,75	*	*	*	*	*	*	*	*	98,93 ⁹¹ 98,40 ⁹²

5.2. Análise estrutural de complexos e ligantes por meio da espectroscopia vibracional na região do infravermelho:

Por meio da utilização da técnica de espectroscopia vibracional no IV observar-se a inexistência de bandas características a aldeídos e aminas tanto nos complexos como nos ligantes, essas bandas estariam presentes na região 1700 cm^{-1} para o estiramento $\text{C}=\text{O}$ ⁹³ de aldeídos e $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ de aminas primárias ($-\text{NH}_2$)⁹⁴.

Além disso, têm-se a presença de bandas características de iminas, o que indica que todo o material de partida para formação dos ligantes foi consumido durante a reação. Esses estiramentos se dão entre $1592\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ ⁹⁵, sendo observados neste trabalho entre os valores $1617,69\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$. Por meio da inserção do metal espera-se que os estiramentos de iminas sofram um decréscimo de frequência, indicando a polarização da ligação⁹⁵⁻⁹⁶.

Os ligantes sintetizados a partir do piridoxal, têm-se estiramentos das ligações O-H ⁹⁷ na faixa de 3200 cm^{-1} , ocorrendo uma diminuição na frequência do estiramento da banda de O-H quando estes ligantes são complexados.

Tabela 15: Valores estiramentos $\text{C}=\text{N}$ dos espectros IV dos ligantes e complexos

Ligantes	Estiramento $\text{C}=\text{N}$ (cm^{-1})	Complexos	Estiramento $\text{C}=\text{N}$ (cm^{-1})
L1	1632,67	C1	1623,68
L2	1650,05	C2	1624,27
L3	1633,39	C3	1620,03
L4	1643,10	C4	1630,63
L5	1631,33	C5	1620,17
L6	1630,75	C6	1623,68
L7	1633,39	C7	1618,24
L8	1650,05	C8	1622,17
L9	1631,33	C9	1617,69
		C10	1617,69

5.3. Análise estrutural de complexos e ligantes por meio da espectroscopia RAMAN:

Os espectros RAMAN caracterizam compostos sólidos por meio da dispersão da luz, permitindo o estudo das rotações e vibrações moleculares ⁹⁸. Assim sendo, os ligantes obtidos nesse trabalho se apresentam como óleo, não foram caracterizados por essa técnica.

Já os complexos foram caracterizados por espectroscopia RAMAN evidenciando bandas características de grupos funcionais presentes nesses compostos, os quais foram observados também na espectroscopia do infravermelho⁹⁹.

Como apresentado na tabela 16, com os espectros RAMAN do complexo observa-se bandas na região 1605 cm^{-1} até 1657 cm^{-1} ν (C=N) referente a grupos iminas.

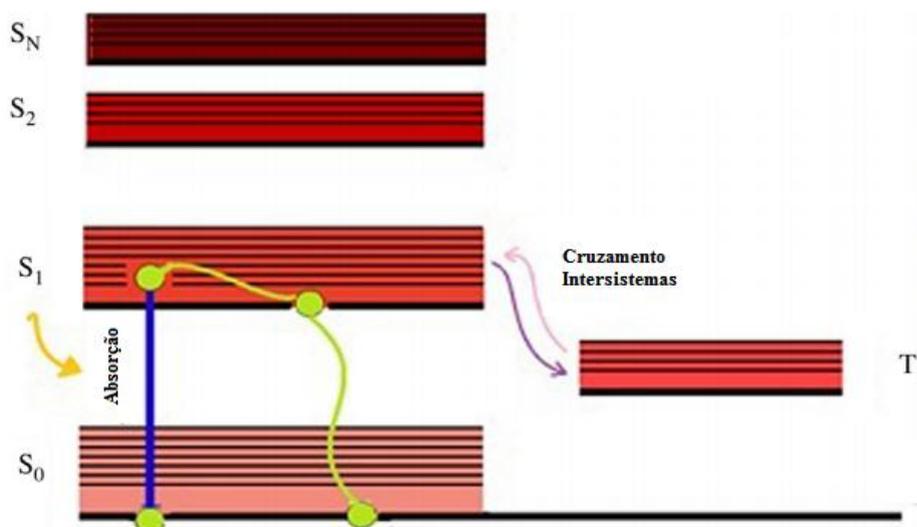
Tabela 16: Estiramentos C=N dos espectros RAMAN dos complexos.

Complexos	Estiramento C=N (cm^{-1})
C1	1622
C2	1622
C3	1657
C4	1622
C5	1626
C6	1625
C7	-
C8	1605
C9	1623
C10	1619

Outro comportamento interessante observado na espectroscopia RAMAN é o complexo C7 (heptâmero) que apresenta características fluorescentes o que pode mascarar as bandas vibracionais dificultando sua caracterização. Essa fluorescência se deve ao aumento do número de elétrons disponíveis, assim proporcionado pelo aumento da densidade eletrônica dos sete centros metálicos. Dessa forma, como apresentado no diagrama de Jablonski (figura 35), esses elétrons podem passar de

um estado fundamental S_0 para um estado singlete S_1 retornando ao seu estado inicial liberando energia fluorescente neste retorno¹⁰⁰, caso ocorresse uma passagem desses elétrons para um estado tripleto T_1 ocorreria a liberação de energia fosforescente na regressão ao estado fundamental S_0 .

Figura 35: Diagrama de Jablonski, onde: S_N : estado singlete qualquer; S_2 : segundo estado singlete, S_1 : primeiro estado singlete; S_0 : estado fundamental e T_1 : estado tripleto.



Fonte: Adaptado de Misra¹⁰¹ (2019).

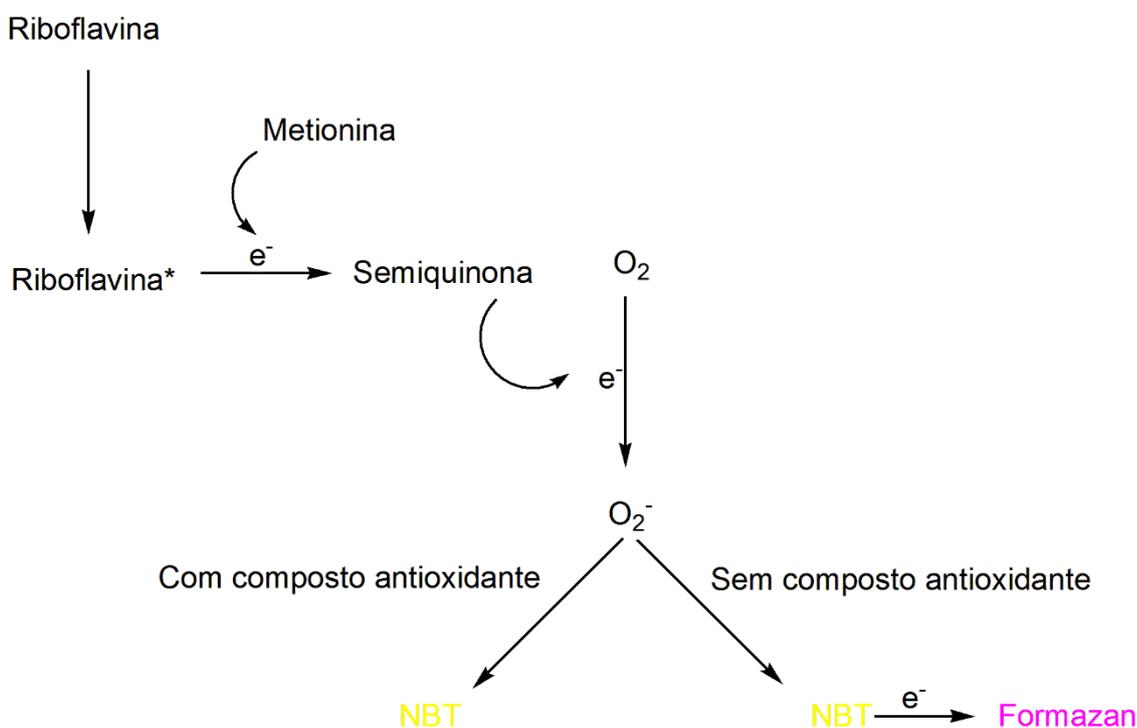
Na espectroscopia Raman, emprega-se uma fonte monocromática de radiação (laser) que interage com os elétrons mais externos dos compostos. A qual faz com que os elétrons sejam passados de um estado vibracional n_0 para um estado excitado virtual, retornando a um estado de maior energia que o n_0 , sendo a vibração das ligações dos complexos obtida através da diferença de energia entre os estados vibracionais inicial e final (Efeito Stokes)¹⁰². Porém em alguns casos, os elétrons são excitados para um segundo estado eletrônico. Nesse estado ocorre uma perda de energia na forma não radiante (fluorescência), decaindo novamente ao estado eletrônico inicial, porém excitado no que diz respeito ao nível vibracional. Sendo essa energia não radiante 10^6 vezes maior que o fenômeno de espalhamento Raman, assim mascarando o espectro como no caso do complexo **C7**.

5.4. Avaliação da atividade mimética ao sítio ativo da enzima superóxido dismutase

A avaliação da atividade mimética da enzima superóxido dismutase dos complexos baseou-se na fotorredução do indicador NBT (azul de nitrotetrazólio) através da ação do íon superóxido. Assim, se o composto apresentar atividade antioxidante, o mesmo irá interferir na reação entre o íon superóxido e o NBT, evitando a formação do composto *formazan* (coloração roxa) proveniente desta reação. Porém, se o composto não apresentar atividade antioxidante ocorrerá a formação do *formazan* através da reação entre o superóxido e o NBT^{99,103}.

A metodologia inicia-se com a excitação da riboflavina através da irradiação de uma lâmpada fluorescente. Através dessa excitação, a riboflavina torna-se capaz de interagir com a metionina ocasionando a formação de uma semiquinona, que na sequência reage com o oxigênio do ar gerando o superóxido. Já o superóxido formado pode reagir com o NBT assim obtendo-se o *formazan*, ou ocorre a reação com o composto sintetizado, evitando a formação do *formazan*¹⁰³(Esquema 26).

Esquema 26: Ensaio utilizando o NBT para avaliar a atividade catalítica da enzima SOD-1.



Inicialmente empregou-se o branco com apenas o DMF, seguido da análise da mistura reacional que é composta por 2,4 mL de solução tampão de fosfato de sódio (BSP), $9,53 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de metionina, $3,8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de NBT. A análise foi realizada em triplicata com diferentes diluições do composto analisado (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, 0,78125%). A solução foi preparada com 50 μL da amostra diluída em DMF (1 mg / 1 mL). A reação foi monitorada espectrofotometricamente em 560 nm e adicionou-se $3,2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de riboflavina. A leitura foi realizada inicialmente e após 15 minutos de irradiação por uma lâmpada fluorescente foi realizada uma nova leitura.

A partir dos dados coletados pode-se fazer uma relação entre a absorção final e a absorção inicial, sendo possível calcular a porcentagem de inibição, como apresenta a equação abaixo:

$$\frac{\frac{\Delta Abs}{t}(\text{sem complexo}) - \frac{\Delta Abs}{t}(\text{com complexo})}{\frac{\Delta Abs}{t}(\text{sem complexo})} \cdot 100$$

O valor de IC_{50} demonstra a concentração mínima necessária do mimético para inibir 50% a redução do NBT. A partir dos valores de IC_{50} obtêm-se o valor da constante cinética de McCord-Fridovich (k_{McCF}), específica para o detector NBT, onde o NBT apresenta valor sua constante de k_{NBT} ($pH = 7,8$) = $5,94 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$.

$$k_{McCF} = \frac{k_{\text{detector}} \cdot [\text{detector}]}{IC_{50}}$$

Os valores de IC_{50} e de k_{McCF} dos ligantes e complexos estão descritos na tabela 17:

Tabela 17: Resultados IC₅₀ e de kMcCF; Os destaques na coloração verde representam os melhores valores de IC₅₀.

Composto	IC ₅₀	kMcCF
L1	5,88	0,38
L2	4,02	0,56
L3	5,38	0,41
L4	3,95	0,57
L5	5,67	0,39
L6	4,84	0,46
L7	5,09	0,44
L8	3,81	0,59
L9	4,96	0,45
C1	0,98	2,30
C2	0,21	10,74
C3	0,61	3,70
C4	0,17	13,27
C5	0,87	2,59
C6	0,68	3,31
C7	0,41	5,50
C8	0,59	3,82
C9	0,16	14,10
C10	0,57	3,96
Cu/Zn SOD	0,0012 - 0,00081	
CuCl ₂	1,39	

5.5 Voltametria Cíclica

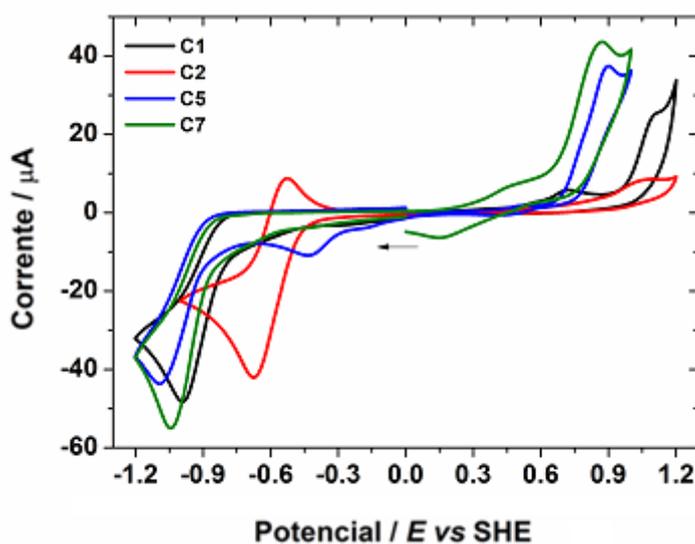
Os complexos foram submetidos a análise voltamétrica para quantificar seus potenciais redox, onde pode-se observar que quanto menor for os valores de potenciais de redução do Cu^{II}/Cu^I pode indicar uma melhor atividade mimética.

Com os dados obtidos na região catódica os potenciais na faixa de -0,60 V (redução) a -1,10 V (oxidação) podem ser atribuídos ao par redox Cu^{II}/Cu^I ¹⁰⁵, sendo o complexo **C2** o que possui maior facilidade em se reduzir com potencial de redução de -0,602 V. Já o complexo **C5** apresentou o potencial de redução de -

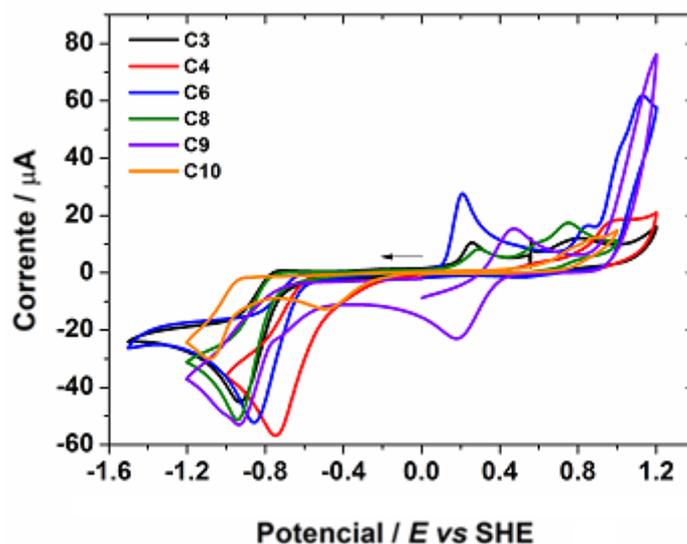
1,091 V, sendo este o mais elevado potencial de redução dos complexos. Além de que, na região anódica (oxidação) os potenciais na faixa de +0,20 a +0,35 V pode ser atribuídos a re-oxidação das espécies de Cu^{I} a Cu^{II} em solução, seguido da oxidação na faixa de +0,70 a +1,11 V, que pode estar relacionado à oxidação do ligante coordenado ao centro de cobre.

A figura 36 mostra os voltamogramas cíclicos dos complexos e a tabela 18 todos os valores potenciais, em Volts versus SHE.

Figura 36: (a) Voltamograma cíclico comparativo dos complexos C1, C2, C5 e C7. (b) Voltamograma cíclico comparativo dos complexos C3, C4, C6, C8, C9 e C10.



(a)



(b)

Tabela 18: Dados eletroquímicos dos complexos.

Complexo	E_{red1}	E_{red2}	E_{oxid1}	E_{oxid2}	E_{oxid3}
C1	-0.990 V ^a	-----	+0.717 V ^b	+1.097 V ^b	-----
C2	-0.602 V ^c	-----	+1.069 V ^b	-----	-----
C3	-0.931 V ^a	-----	+0.257 V ^b	+0.805 V ^b	-----
C4	-0.746 V ^a	-----	+0.972 V ^b	-----	-----
C5	-1.091 V ^a	-----	+0.893 V ^b	-----	-----
C6	-0.856 V ^a	-----	+0.207 V ^b	+0.840 V ^b	+1.113 V ^b
C7	-1.044 V ^a	-----	+0.861 V ^b	-----	-----
C8	-0.943 V ^a	-----	+0.289 V ^b	+0.749 V ^b	-----
C9	-0.936 V ^a	-----	+0.323 V ^c	-----	-----
C10	-1.077 V ^a	-0.491 V ^a	+0.872 V ^b	-----	-----

^a E_{pa} = potencial do pico anódico; ^b E_{pc} = potencial do pico catódico

Através dos dados da voltametria cíclica pode-se constatar que alguns dos resultados da atividade catalítica podem estar diretamente relacionados com os complexos formados a partir do cloridrato de piridoxal, já que esses apresentaram os valores mais próximos de potencial de redução ao par redox Cu^{II}/Cu^I.

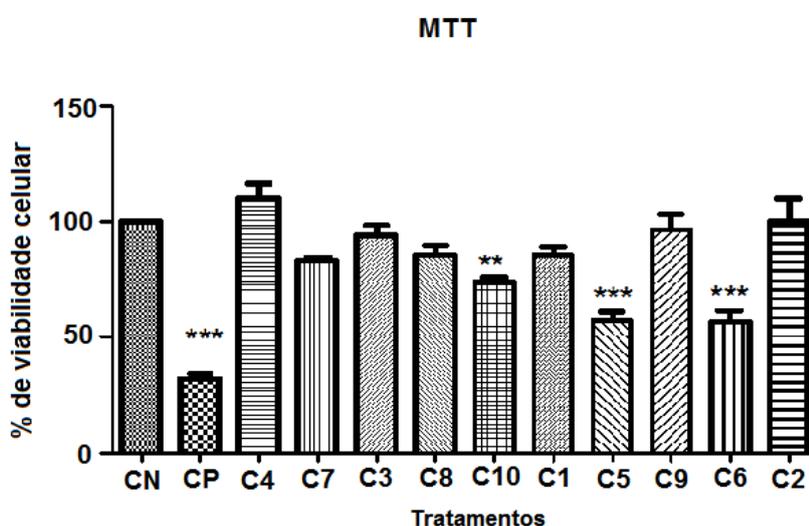
5.6. Análise dos efeitos citotóxicos causados pelos compostos em células.

5.6.1. Teste de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio):

Para determinação da viabilidade celular que os complexos apresentam realizou-se o teste de MTT que demonstra a viabilidade celular através da evidenciação do aparecimento da coloração roxa no ensaio, assim podendo ser quantificada por espectrofotometria e sendo denotado que valores de absorvância baixos indicam uma diminuição na taxa de proliferação celular¹⁹. Os resultados do MTT em sua forma livre após 24 horas de incubação, com resultados expressos em porcentagem em relação ao controle estão expressos na figura 37, onde observa-se que os compostos de coordenação **C10**, **C5** e **C6** que tiveram % de viabilidade celular igual a 80, 60 e 50 respectivamente, assim estes complexos apresentaram uma diminuição na quantidade da viabilidade celular como o controle positivo (30%), dessa forma esses compostos geram apoptose celular. Em 2016, Shokohi-pour¹⁰⁶ e colaboradores sintetizaram um ligante do tipo base de Schiff através da

condensação entre gabapentina e 2-hidroxi-1-naftaldeído, sendo posterior complexado com acetato de cobre(II) tetra hidratado. O complexo foi submetido ao ensaio de MTT em CMSP, onde os resultados denotaram que o composto de coordenação gera a apoptose celular, onde na concentração de 1×10^{-6} M, têm-se a diminuição na viabilidade celular para 10%. Assim, esse resultado apresenta valor mais baixo de viabilidade celular do que os complexos sintetizados nesse trabalho onde a menor taxa equivale a 50% para o complexo **C6**.

Figura 37: Ensaio MTT



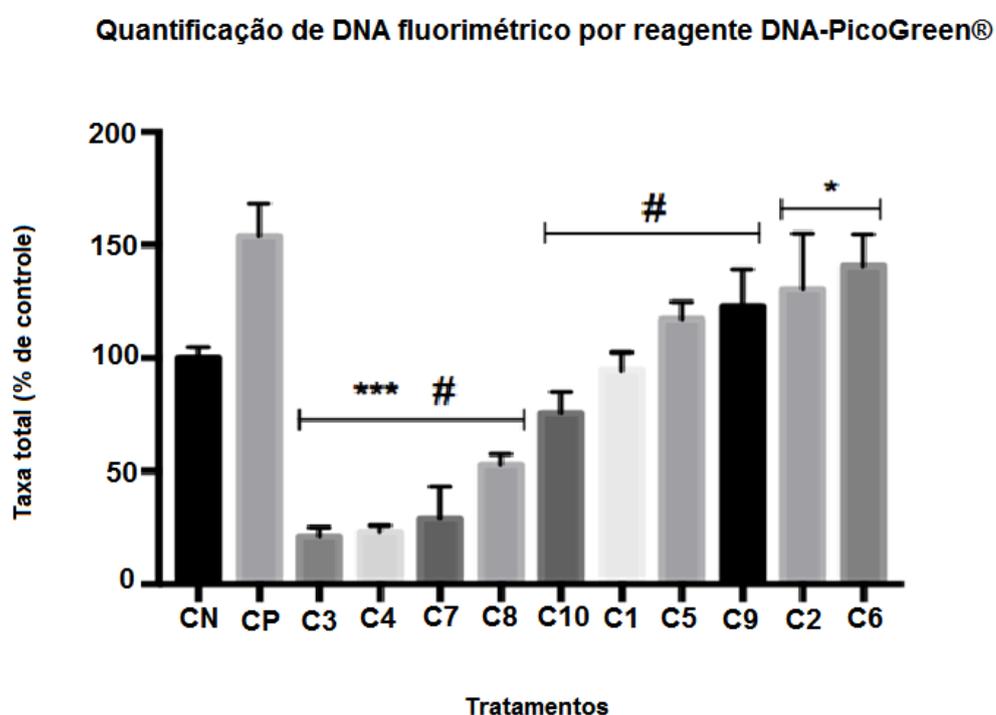
Ensaio MTT com 24h de incubação. Resultados expressados em porcentagem ao controle negativo. Os dados estão apresentados em % do grupo de controle não tratado. Os dados foram expressos como desvio padrão médio. As análises foram realizadas por 1-via ANOVA seguido por Dunnett's. Valores com $p < 0,05$ estavam estatisticamente significante. Ser * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$.**

5.6.2. Ensaio de quantificação de DNA fluorimétrico por reagente DNA-PicoGreen®:

No que se refere a determinação dos possíveis efeitos danosos ao DNA realizou-se o teste fluorimétrico por *DNA-PicoGreen®*, onde o corante fluorocromo (*PicoGreen®*) pode formar um complexo estável com DNA de cadeia dupla em condições alcalinas, assim essa característica de seletividade é utilizada para evidenciar a desnaturação do DNA que se dá com a diminuição da intensidade do sinal fluorimétrico proporcional ao aumento do ssDNA (DNA de fita simples) e do

teor de mononucleotídeos¹⁰⁷. Neste ensaio os complexos **C2** com taxa total de 145% e **C6** que apresentou taxa total igual a 148% apresentando resultados equivalentes ao do controle positivo que teve taxa de 150%, assim esses compostos causam danos no DNA de fita dupla (Figura 38). Já os complexos **C3**, **C4**, **C7** e **C8** não apresentaram equivalência nem ao controle positivo nem ao negativo, não havendo nesse caso a cisão da cadeia dupla de DNA na presença desses compostos. Esse ensaio foi realizado pela primeira vez para complexos de cobre nesse trabalho.

Figura 38: Teste DNA-Picogreen



PBMCs expostas em diferentes formulações por 24h. As amostras estão ordenadas em ordem crescente para melhor entendimento dos dados obtidos. Análise estatística foi realizada em ANOVA seguido por tukey post hot. * Análise estatística difere do controle negativo. # Análise estatística difere do controle positivo.

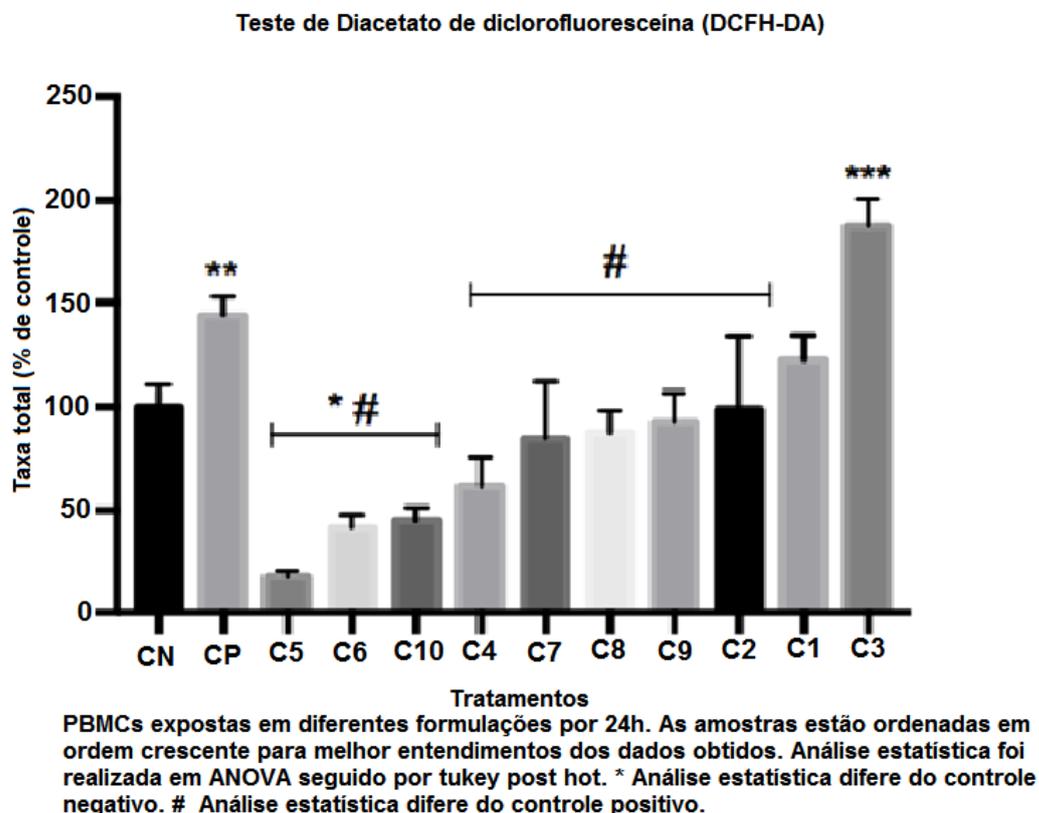
5.6.3. Teste de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA):

A avaliação da presença de espécies reativas de oxigênio no interior das células pode ser realizada através da adição de 2,7 diclorofluoresceína diacetato que no citoplasma, pode ser desacetilada por esterases sendo reduzida para diclorodihidrofluoresceína. Já a DCFH (Diclorodihidrofluoresceína) quando em contato com espécies reativas do oxigênio, converte-se em diclorofluoresceína que é facilmente visualizada, devido a sua fluorescência característica¹⁰⁸. Com os

resultados obtidos (figura 39) observa-se que apenas o complexo **C3** com taxa total de 180% apresentou formação de EROs equivalente ao controle positivo (presença de H₂O₂) que apresentou taxa de 150%. Dessa forma, ocorre a formação de peróxido de hidrogênio quando se tem a exposição do DCFH-DA ao composto **C3**. Ainda, observa-se que os compostos **C5**, **C6** e **C10** apresentaram análise estatística diferente tanto do controle positivo quanto do controle negativo, assim denotando que esses compostos foram mais satisfatórios na não produção de H₂O₂ do que mesmo o controle negativo. Conforme Polloni¹⁰⁹ e colaboradores (2019), o complexo de cobre(II) derivado da 1,10-fenantrolina foi submetido a mesma técnica, porém seus resultados induziram significativa formação intracelular de EROs, sendo observada em baixas concentrações do composto (1×10^{-6} e 10×10^{-6} M), assim os compostos obtidos nesse trabalho apresentaram resultados satisfatórios, onde as concentrações são mais elevadas do que as concentrações utilizadas por Polloni.

Realizando-se uma comparação com os resultados de DCFH-DA e MTT, os complexos **C5**, **C6** e **C10** não levam a formação de H₂O₂ porém geram apoptose celular, assim não sendo seguros a células. Além disso, comparando-se os resultados obtidos com o ensaio DCFH-DA e o teste de *DNA-Picogreen*®, têm-se que o complexo **C3** no *DNA-Picogreen*® não apresentou cisão da fita dupla do DNA, porém no ensaio de DCFH-DA levou a formação de H₂O₂, por conseguinte ERO. Assim, denota-se os resultados dúbios para esses compostos, já que em determinado teste apresentam bons resultados em outro não são promissores.

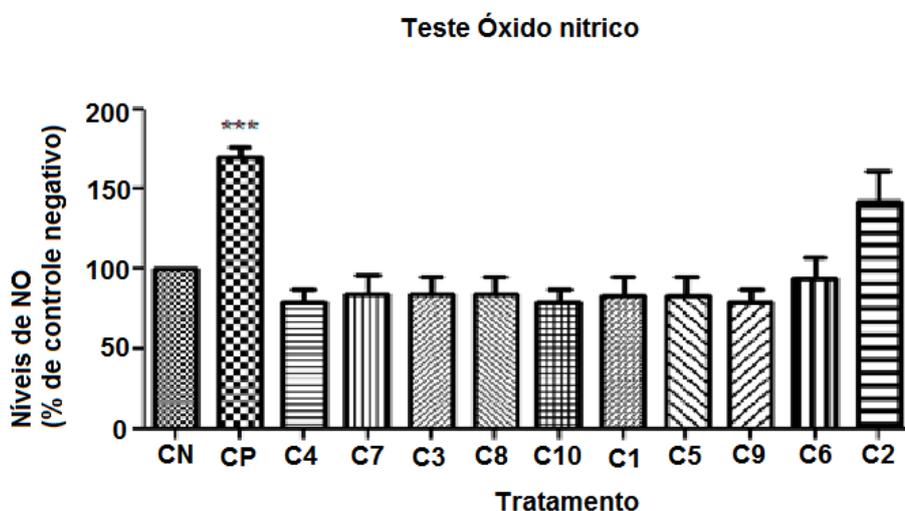
Figura 39: Teste de diacetato de diclorofluoresceína.



5.6.4. Teste de óxido nítrico:

Para análise da formação de nitrito realizou-se o teste de NO na presença do reagente de Griess¹¹⁰, o qual demonstra formação de nitrito com a variação da coloração que passa a ser rosa. Os testes realizados mostraram que em nenhum destes houve equivalência com o controle positivo (figura 40), o que explicita que não houve o aparecimento da cor rosa, assim não ocorrendo a formação de nitrito em solução e por consequência não havendo a formação de ERN. Segundo Rout¹¹¹ e colaboradores (2015) sintetizaram um complexo de cobre(II) a partir do hidrato do sal monossódico de azometina-H o qual foi submetido ao teste de óxido nítrico, o qual apresentou formação de NO quando em contato com o reagente de Griess, assim, diferentemente dos resultados obtidos com esse estudo.

Figura 40: Teste de Óxido Nitrico.



Ensaio NO com 24h de incubação. Resultados expressados em porcentagem ao controle negativo. Os dados estão apresentados em % do grupo de controle não tratado. Os dados foram expressos como desvio padrão médio. As análises foram realizadas por 1-via ANOVA seguido por Dunnett's. Valores com $p < 0,05$ estavam estatisticamente significante. Ser * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

Os resultados mais satisfatórios de IC_{50} obtidos nos testes de atividade catalítica da enzima SOD-1 foram com os complexos **C2**, **C4** e **C9**, e esses compostos nos testes de citotoxicidade apresentaram também bons resultados, com exceção do complexo **C2** que no ensaio de DNA-PicoGreen® leva a cisão da fita dupla de DNA sendo assim, o complexo **C2** apesar de apresentar um IC_{50} adequado na atividade catalítica, o mesmo não torna-se seguro a célula por ocasionar essa cisão ao dsDNA (DNA de fita dupla).

6. Conclusões

6. Conclusões e perspectivas

6.1: Conclusões

A partir dos objetivos traçados para esse trabalho, os resultados de síntese, caracterização, avaliação da atividade mimética da atividade catalítica da enzima superóxido dismutase e efeitos citotóxicos dos compostos obtidos, têm-se:

- I. Inicialmente sintetizou-se nove ligantes.
- II. A partir dos ligantes, foram sintetizados dez complexos utilizando perclorato de cobre (II) hexahidratado, acetato de cobre (II) dihidratado e cloreto de cobre (II) dihidratado. Os rendimentos que variaram de 25 a 64% e foram caracterizados por difração de raios X de monocristal, espectroscopia de infravermelho, Raman, ultravioleta-visível e eletroquímica.
- III. A síntese dos complexos resultou na formação de dez compostos sendo que o complexo **C7** possui estrutura supramolecular.
- IV. A avaliação da atividade mimética da SOD-1 foi analisada para todos os ligantes e complexos através da fotorredução do NBT. Os resultados para os complexos **C9**, **C4** e **C2** foram considerados promissores pois, apresentaram um valor de IC₅₀ de 0,16, 0,17 e 0,21 respectivamente, sendo esses complexos derivados do cloridrato de piridoxal. Assim, esses complexos revelaram-se como futuros candidatos para testes *in vivo*.
- V. Alguns dos resultados da avaliação da atividade mimética da SOD-1 estão diretamente relacionados aos potenciais redox obtidos através da técnica de voltametria cíclica.
- VI. Os testes de citotoxicidade celular apresentaram bons resultados para a maioria dos complexos obtidos neste trabalho. Sendo que apenas os complexos **C2** e **C6** causam danos ao DNA e os complexos **C10** e **C5** geram apoptose celular.
- VII. Já com os testes de produção espécies reativas de oxigênio e nitrogênio celular, apenas o complexo **C3** levou a formação de peróxido de hidrogênio quando há a exposição do DCFH-DA, e ainda nenhum dos complexos geraram ERNs.

VIII. Com os resultados dos testes de segurança farmacológica, observa-se que os complexos **C1**, **C7**, **C8**, **C4** e **C9** são seguros as células. Assim, os complexos **C4** e **C9** que possuem os melhores valores de IC_{50} são promissores para possíveis aplicações farmacológicas.

6.2 Perspectivas

Como os resultados da atividade antioxidante foram considerados promissores na metodologia de fotorredução do NBT, os compostos serão testados frente a outras metodologias complementares quanto à atividade antioxidante como a da xantina oxidase ou do sequestro do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

Além disso, serão realizados os testes de segurança farmacológica para as CMSP no período de 48 horas para na sequência realizar testes da atividade antitumoral *in vitro* dos complexos frente a células de câncer de mama.

Por fim, os complexos de cobre sintetizados podem apresentar tanto atividade antioxidante como pró-oxidante assim sendo, se torna interessante e necessário verificar a atividade dos compostos de coordenação como agentes pró-oxidantes, utilizando metodologias de oxidação de substratos como fenóis ou aminas aromáticas.

7. Anexos

7. Anexos

7.1 Espectros de Infravermelho

Figura 41: Espectro de infravermelho do ligante L1.

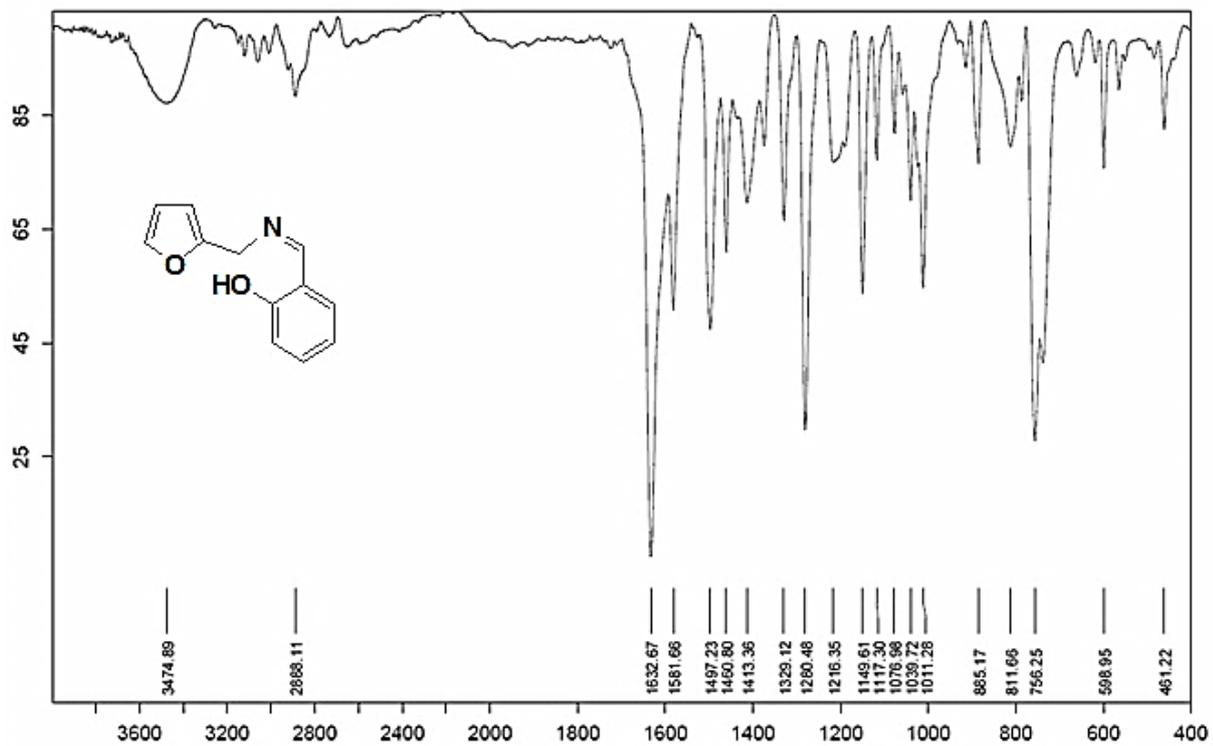


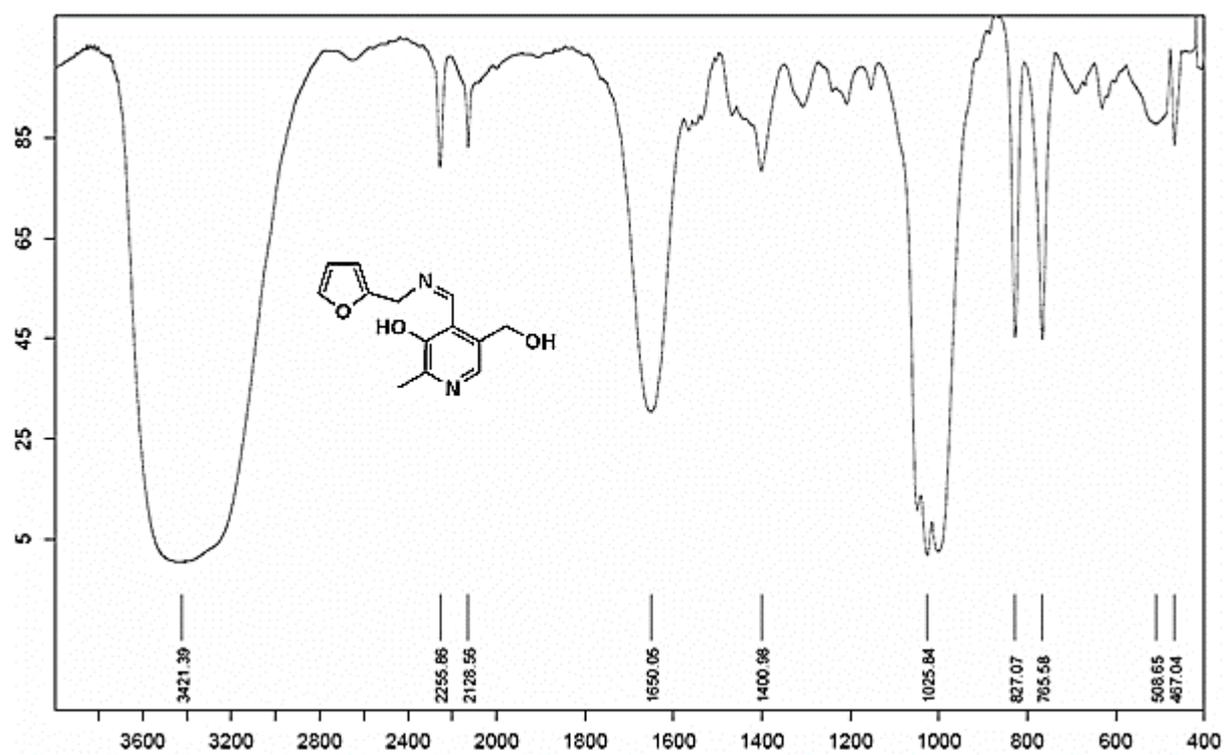
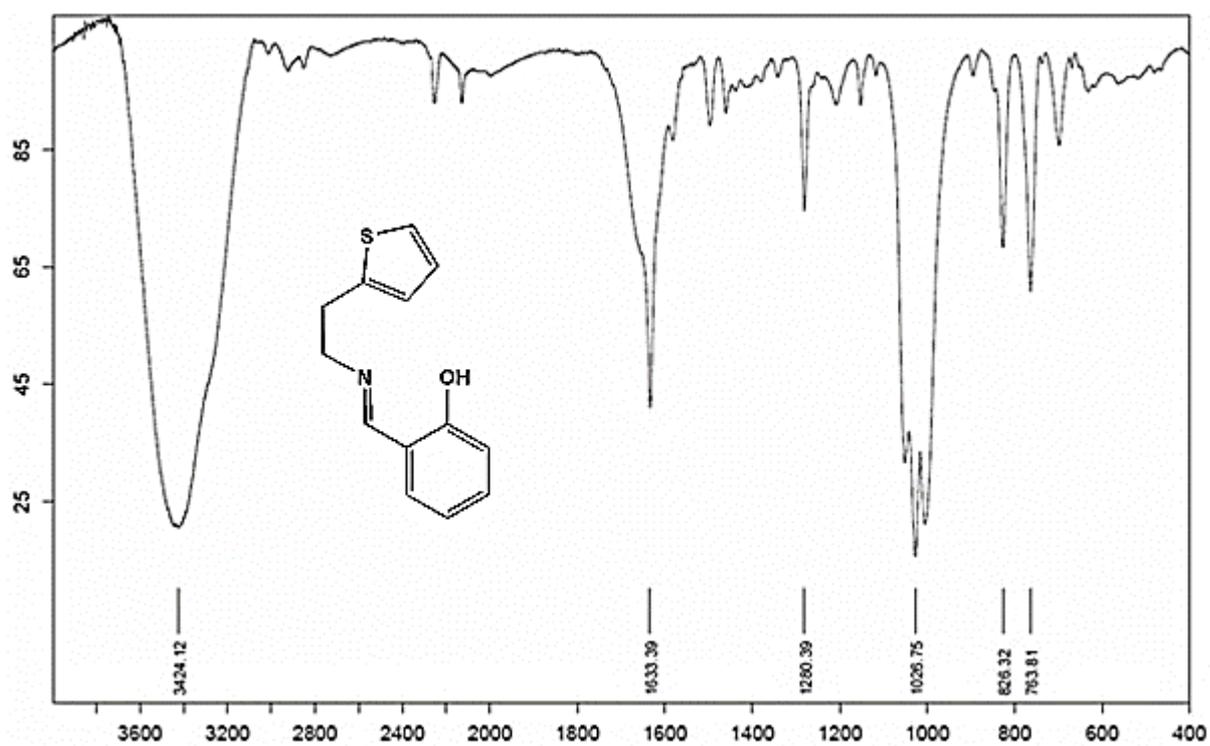
Figura 42: Espectro de infravermelho do ligante L2.**Figura 43:** Espectro de infravermelho do ligante L3.

Figura 44: Espectro de infravermelho do ligante L4.

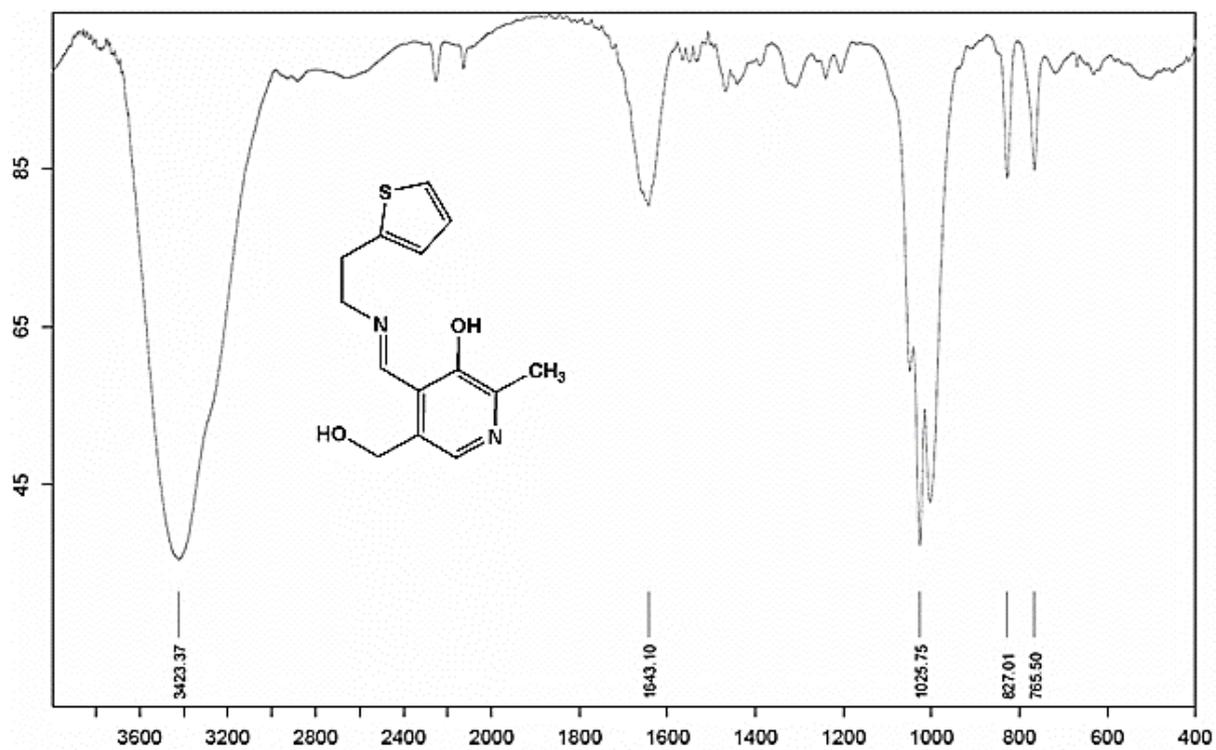


Figura 45: Espectro de infravermelho do ligante L5.

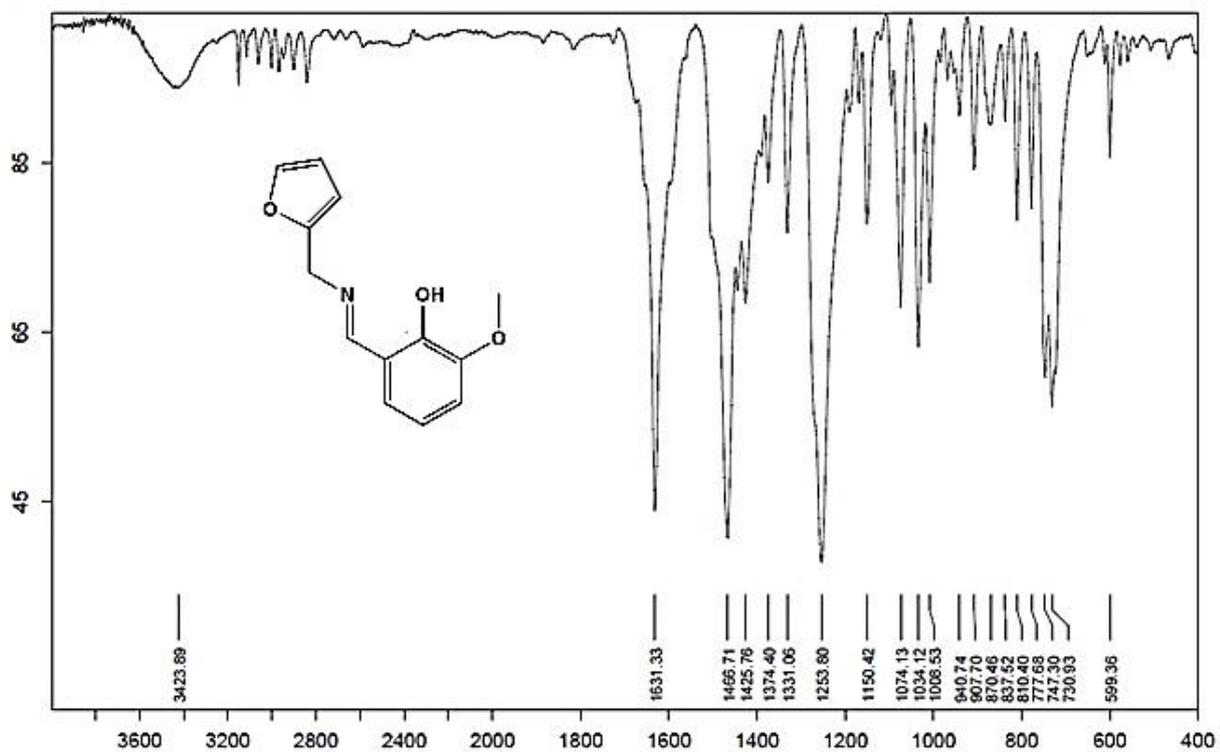


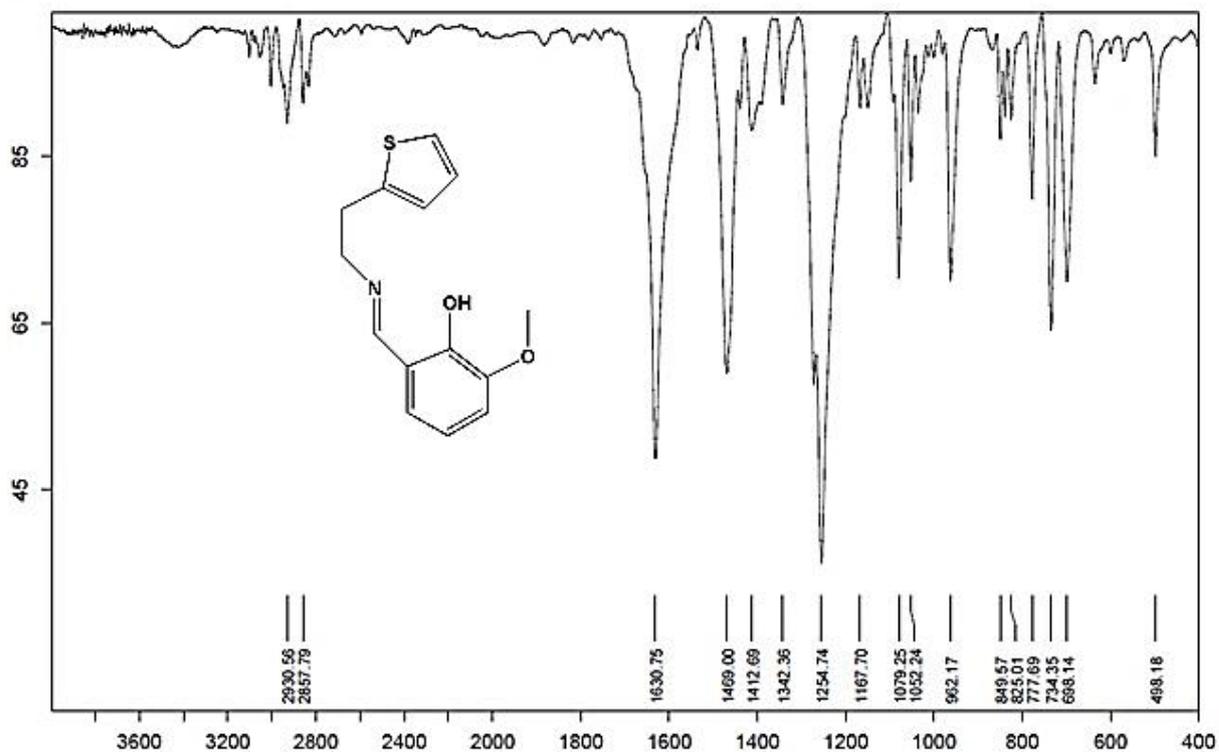
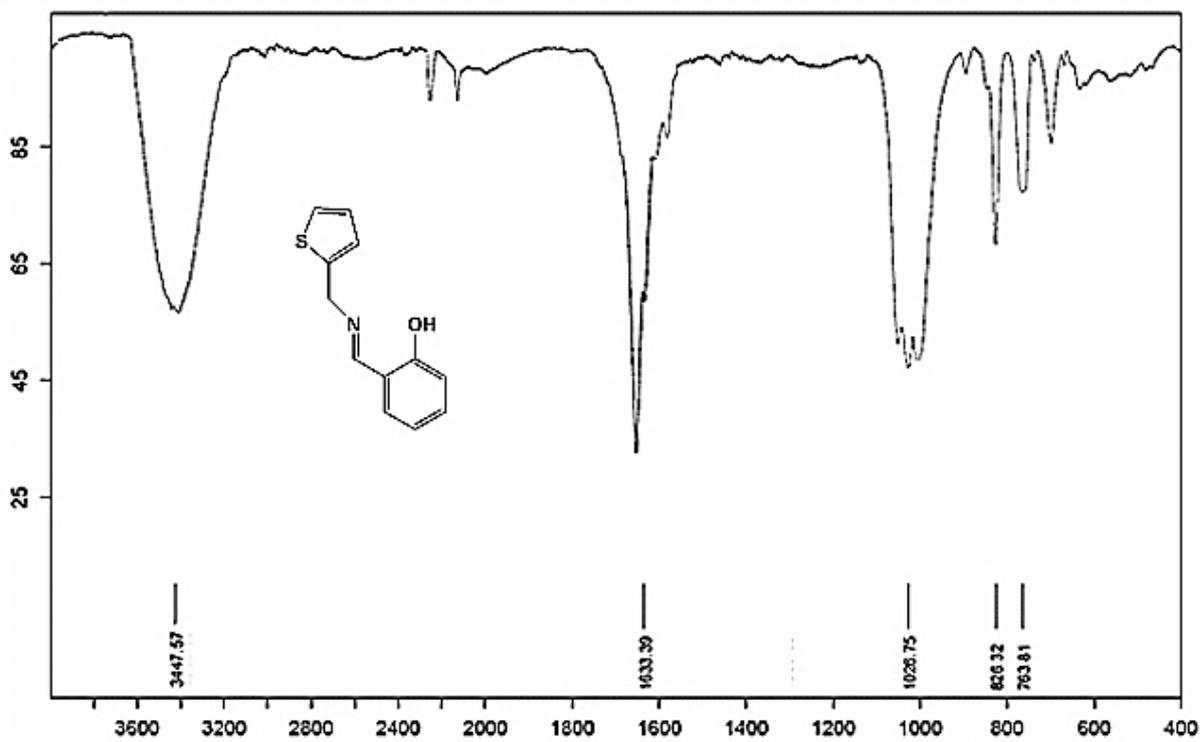
Figura 46: Espectro de infravermelho do ligante L6.**Figura 47:** Espectro de infravermelho do ligante L7.

Figura 48: Espectro de infravermelho do ligante L8.

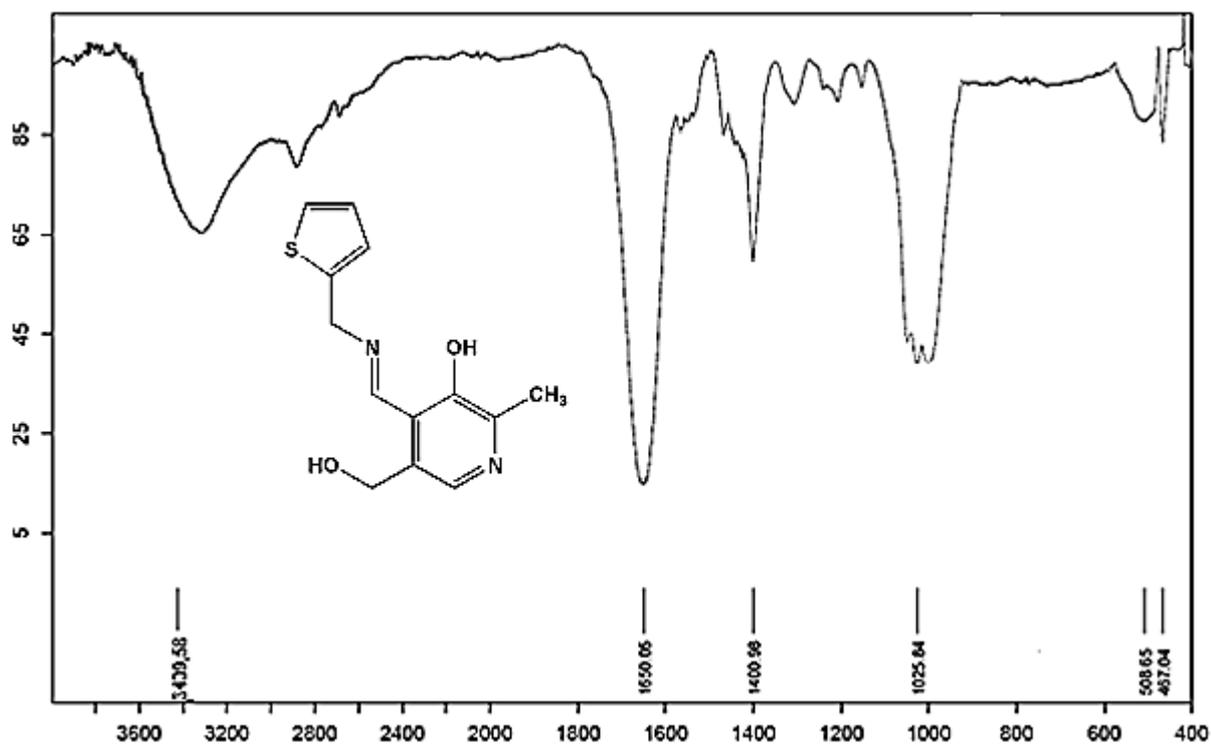


Figura 49: Espectro de infravermelho do ligante L9.

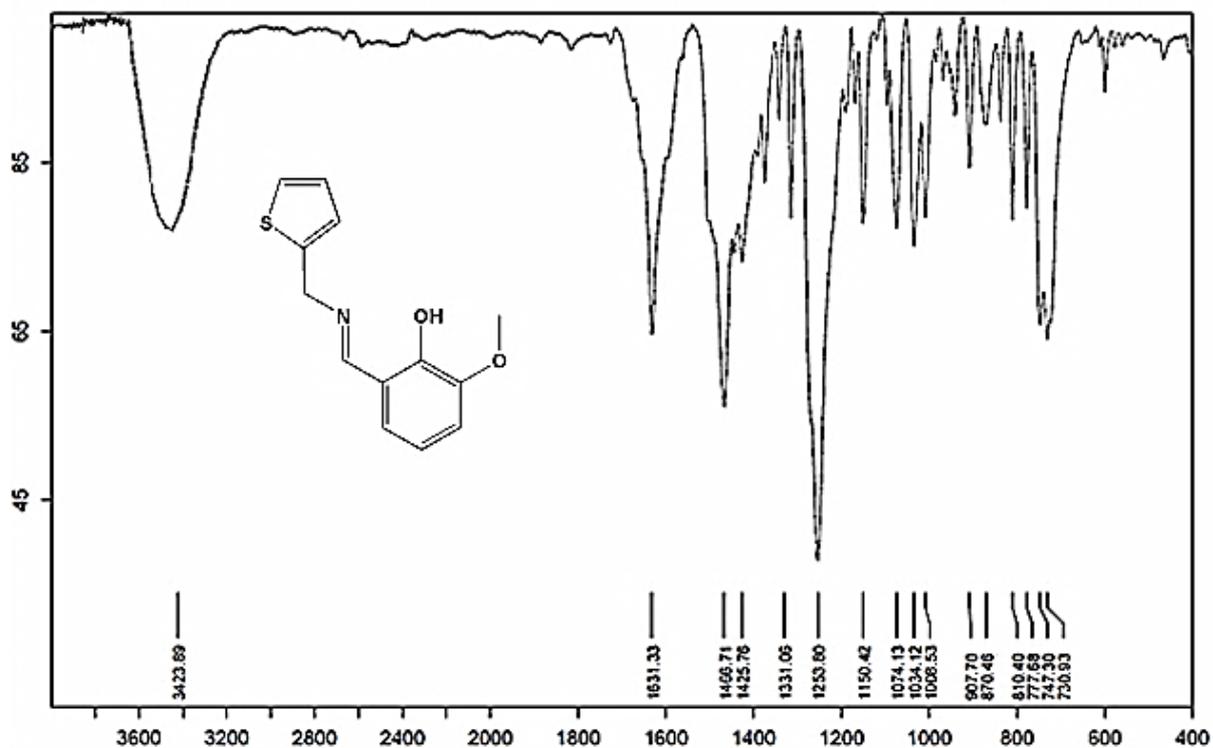


Figura 51: Espectro de infravermelho do complexo C2.

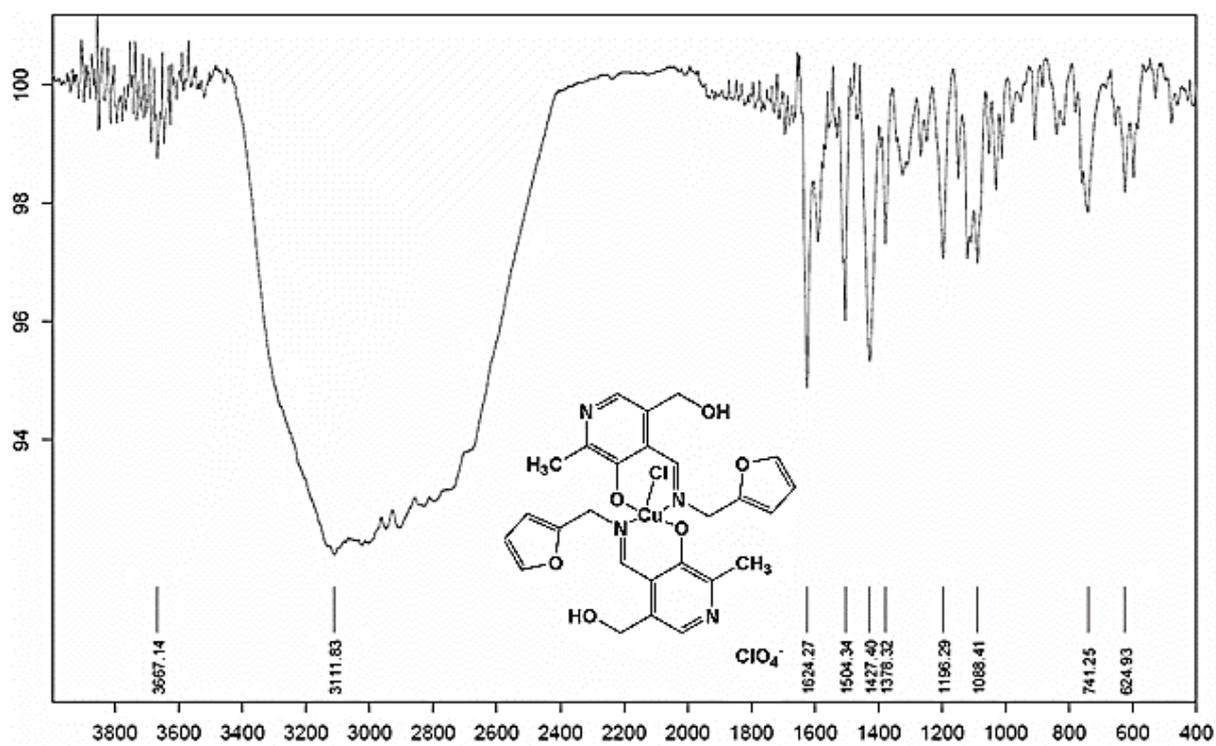


Figura 52: Espectro de infravermelho do complexo C3.

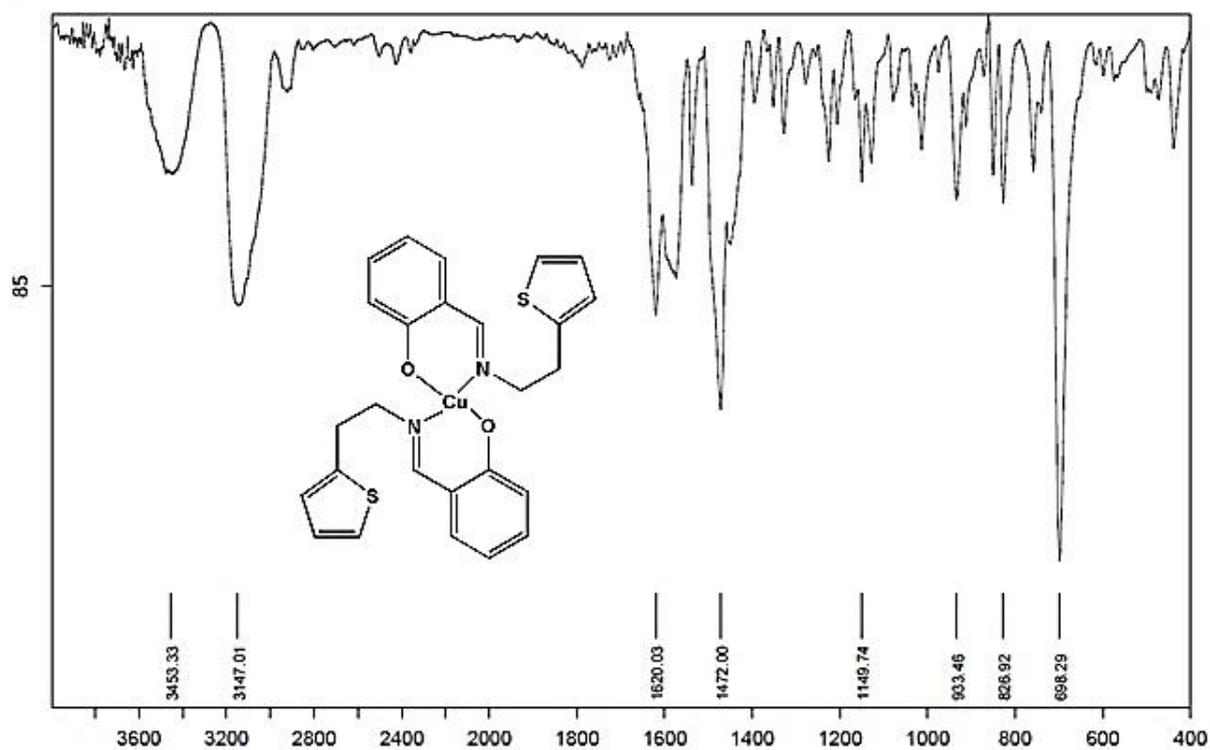


Figura 53: Espectro de infravermelho do complexo C4.

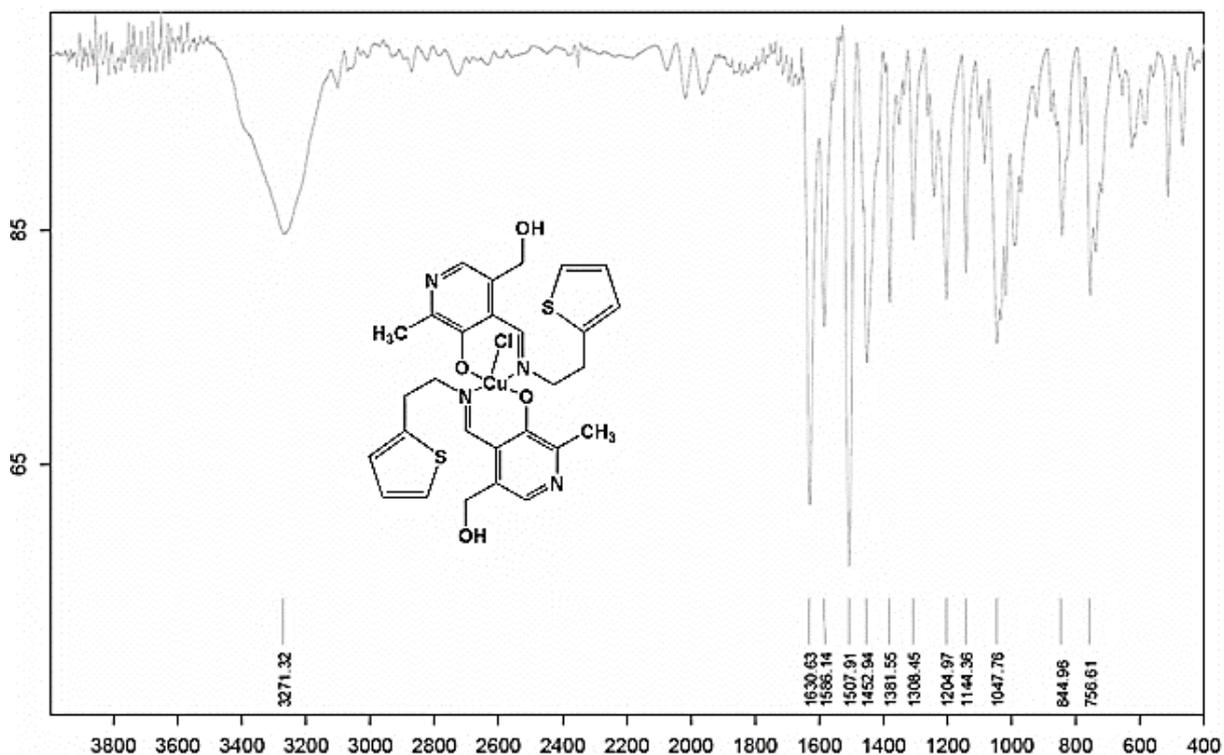


Figura 54: Espectro de infravermelho do complexo C5.

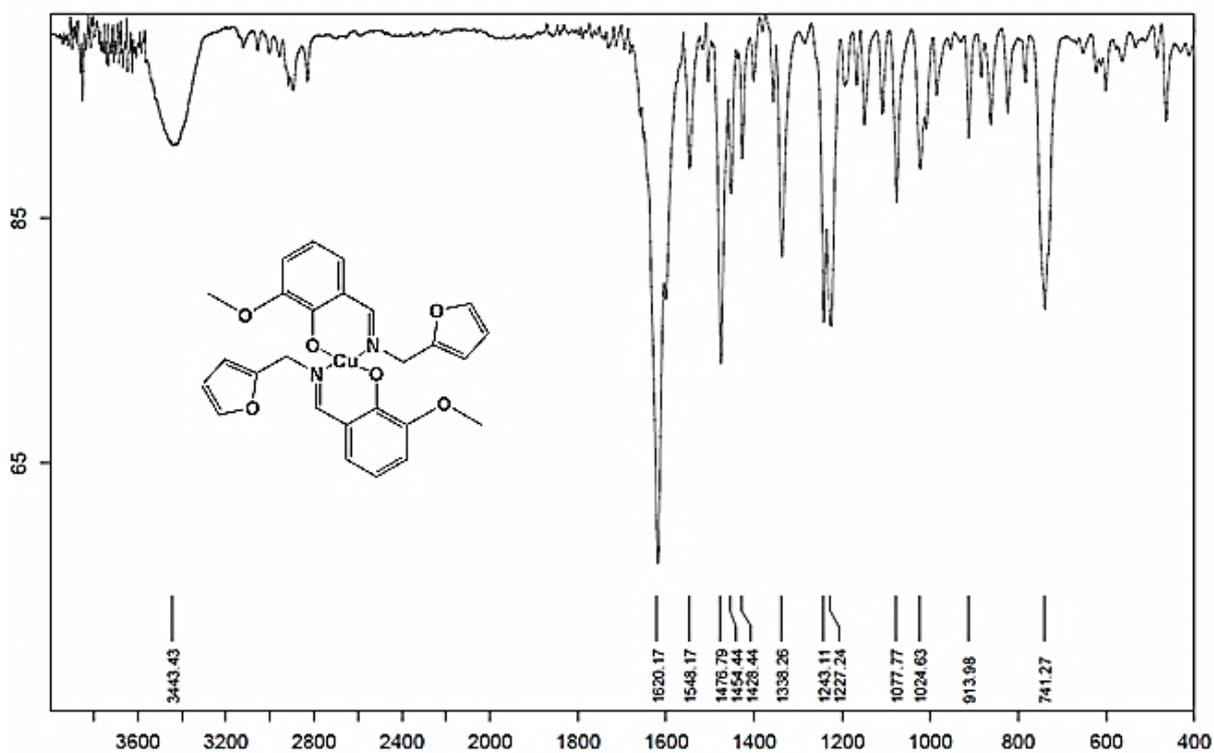


Figura 55: Espectro de infravermelho do complexo C6.

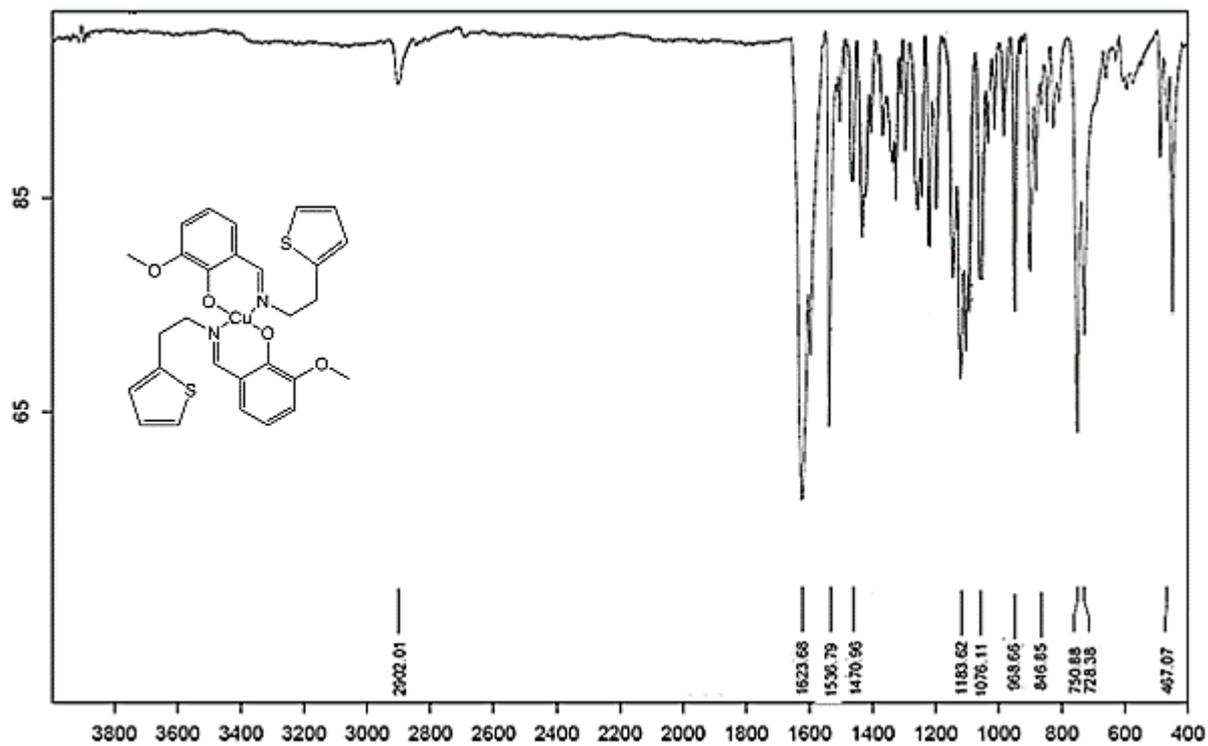


Figura 56: Espectro de infravermelho do complexo C7.

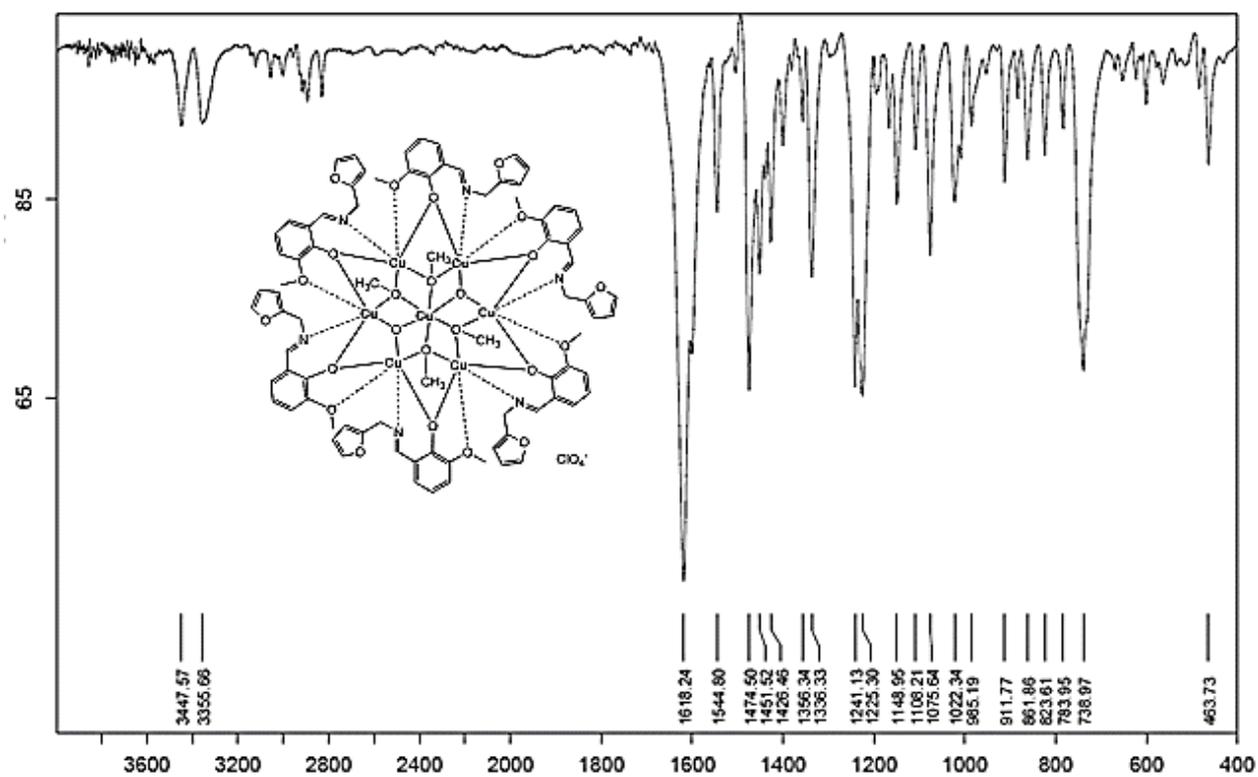


Figura 57: Espectro de infravermelho do complexo C8.

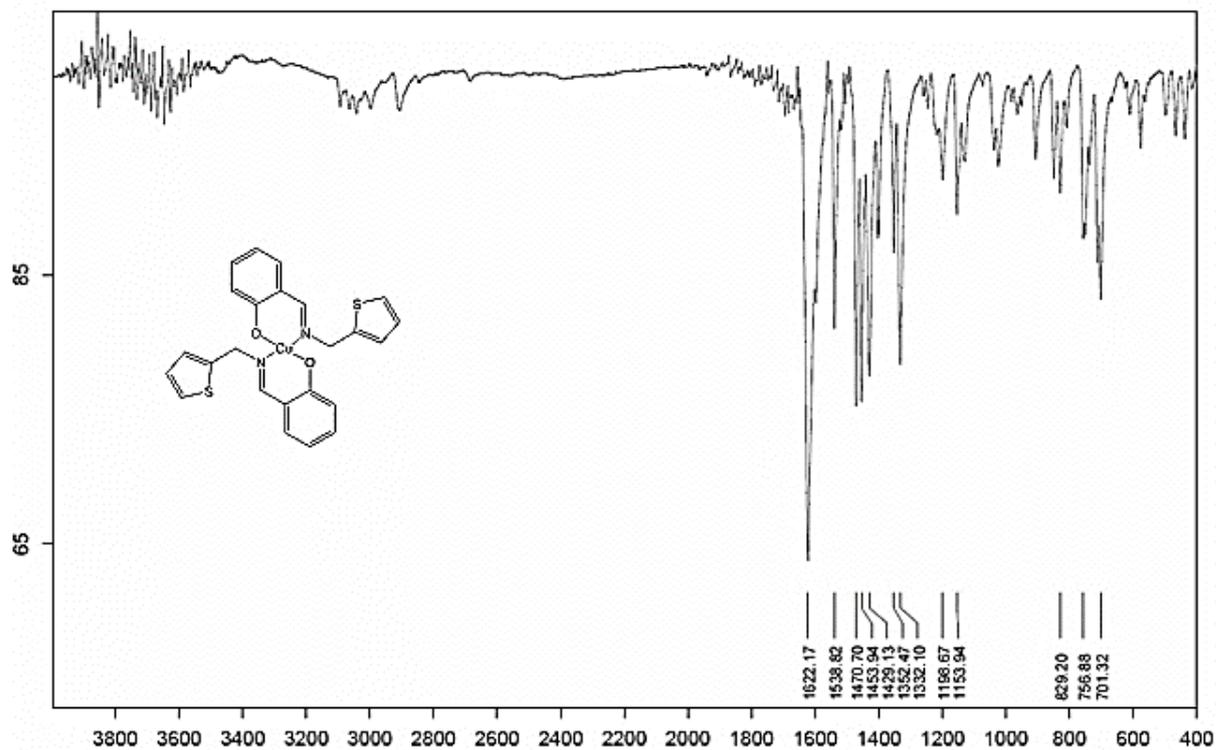


Figura 58: Espectro de infravermelho do complexo C9.

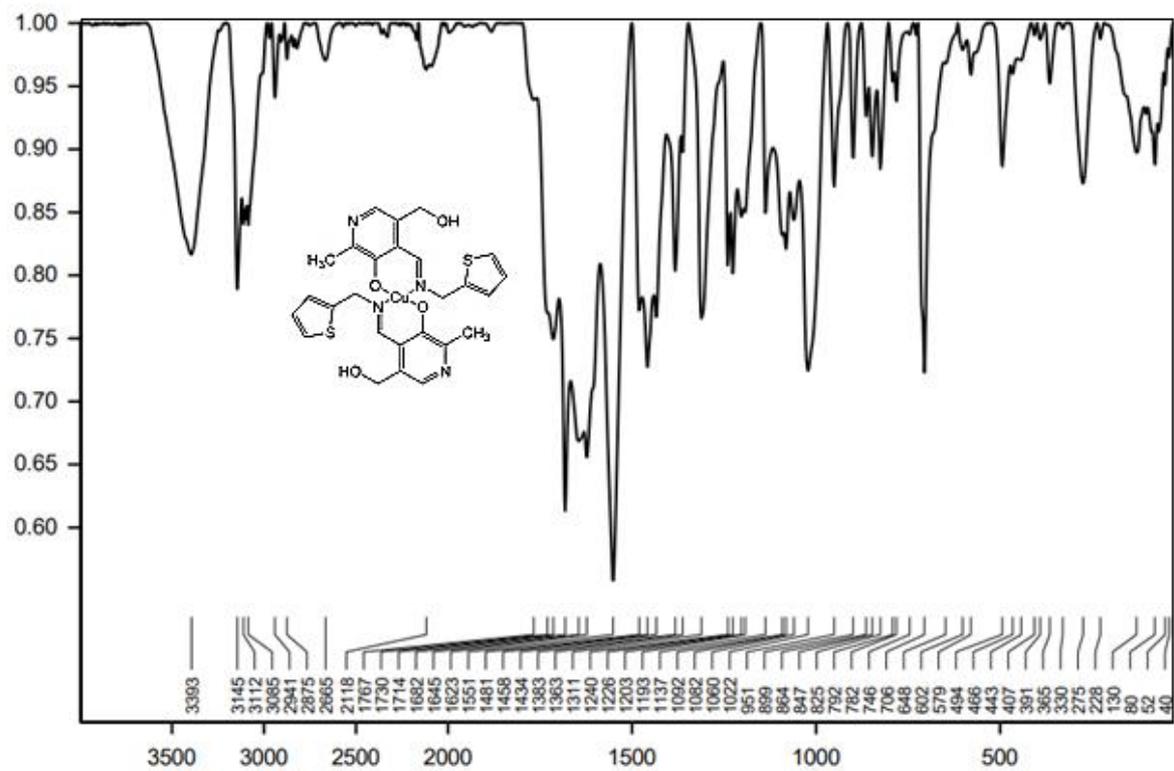
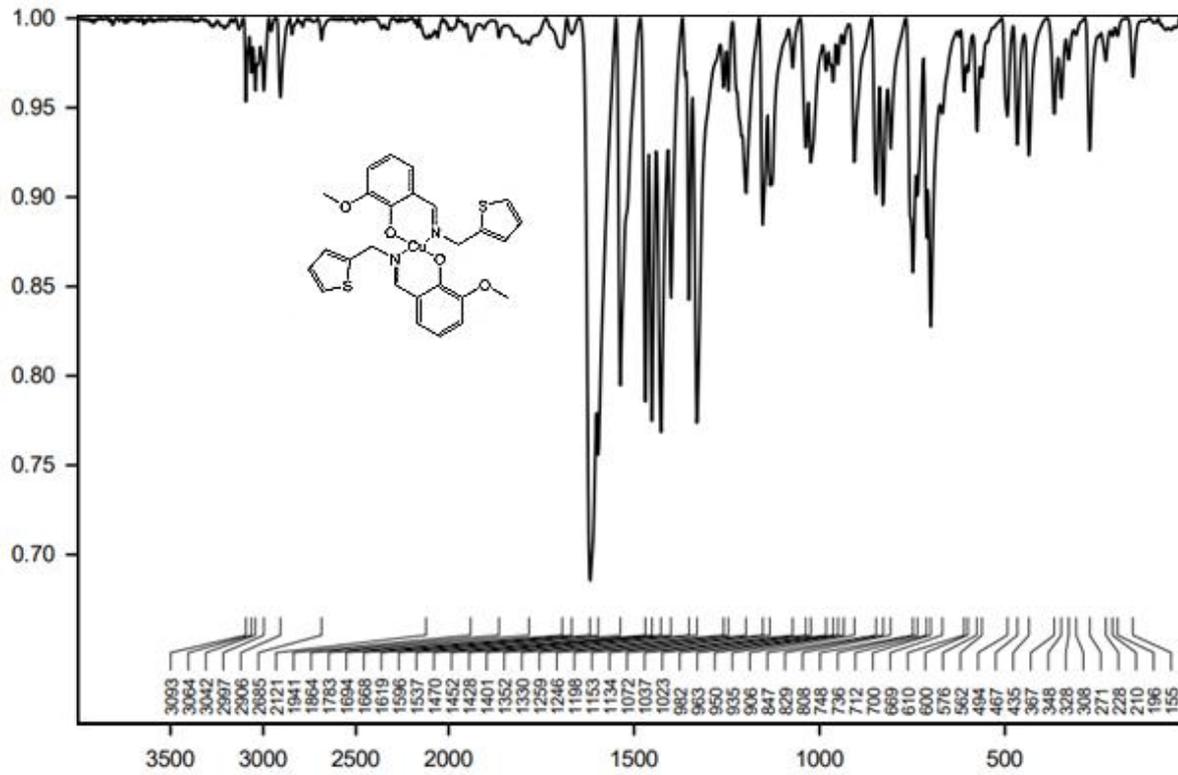


Figura 59: Espectro de infravermelho do complexo C10.

7.2 Espectros de espectroscopia RAMAN

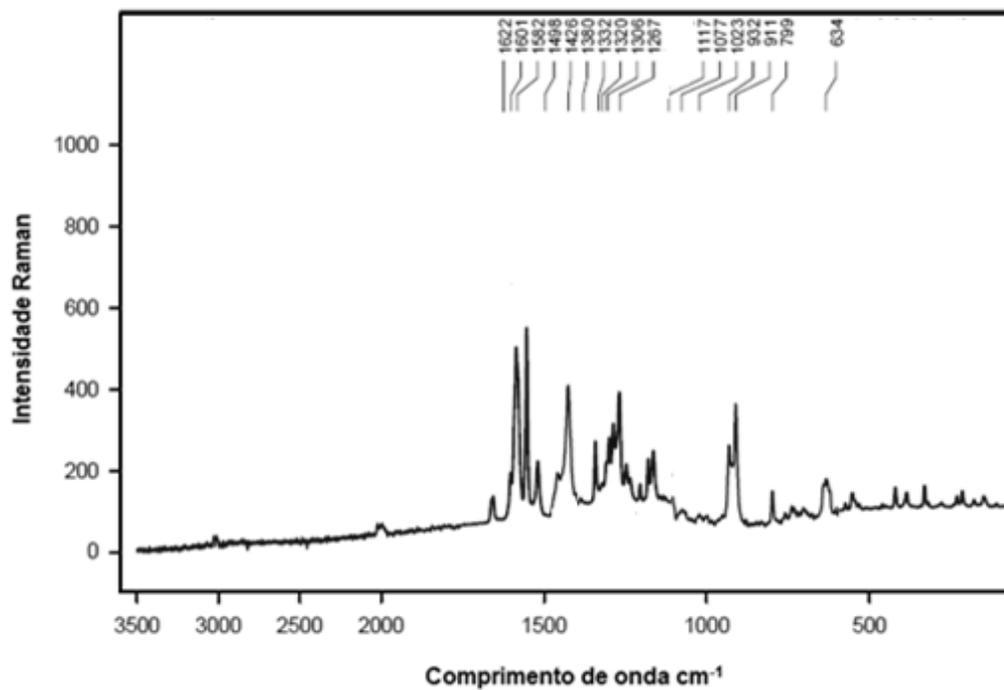
Figura 60: Espectro RAMAN complexo C1.

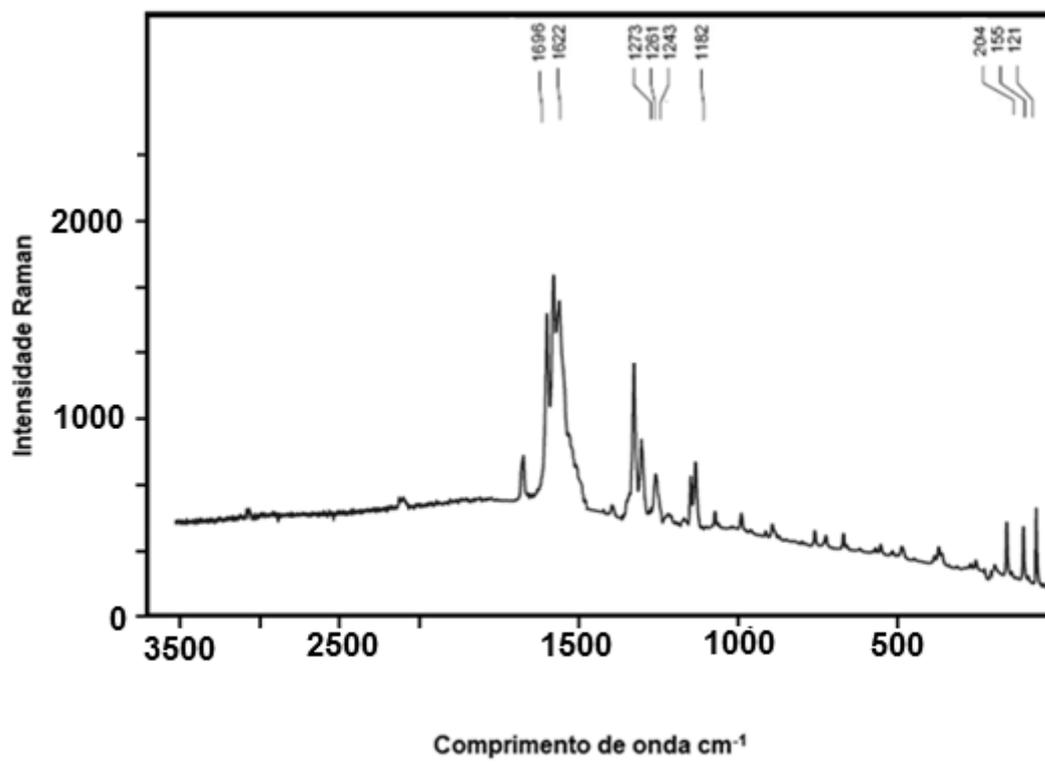
Figura 61: Espectro RAMAN Complexo C2.

Figura 62: Espectro RAMAN Complexo C3.

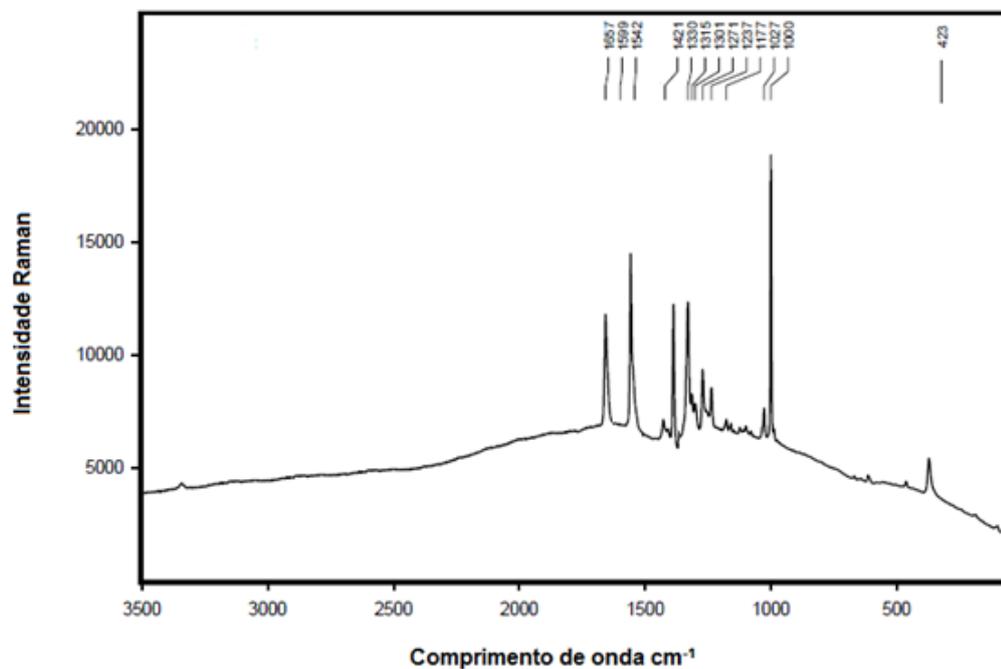


Figura 63: Espectro RAMAN Complexo C4.

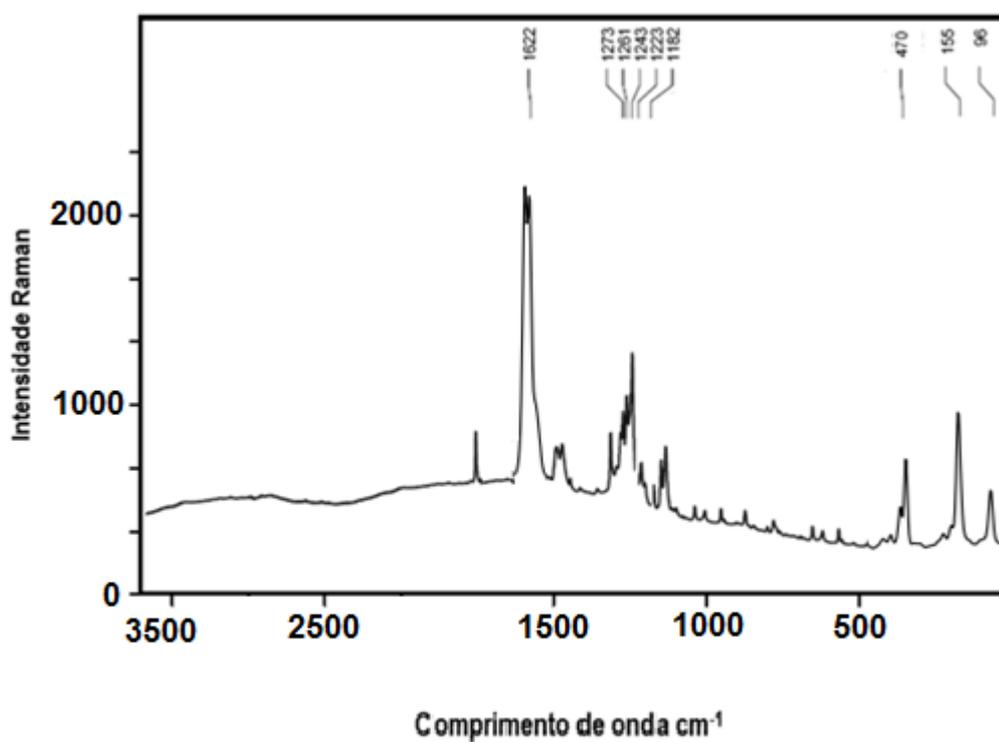


Figura 64: Espectro RAMAN Complexo C5.

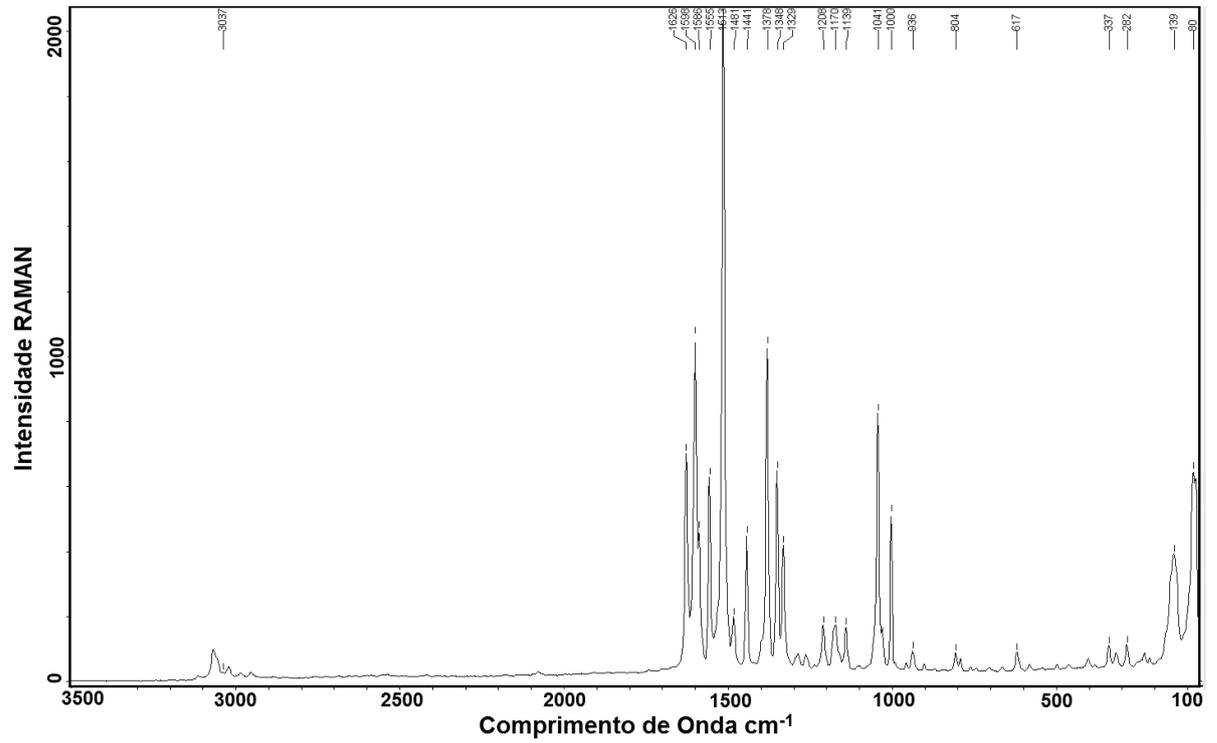


Figura 65: Espectro RAMAN Complexo C6.

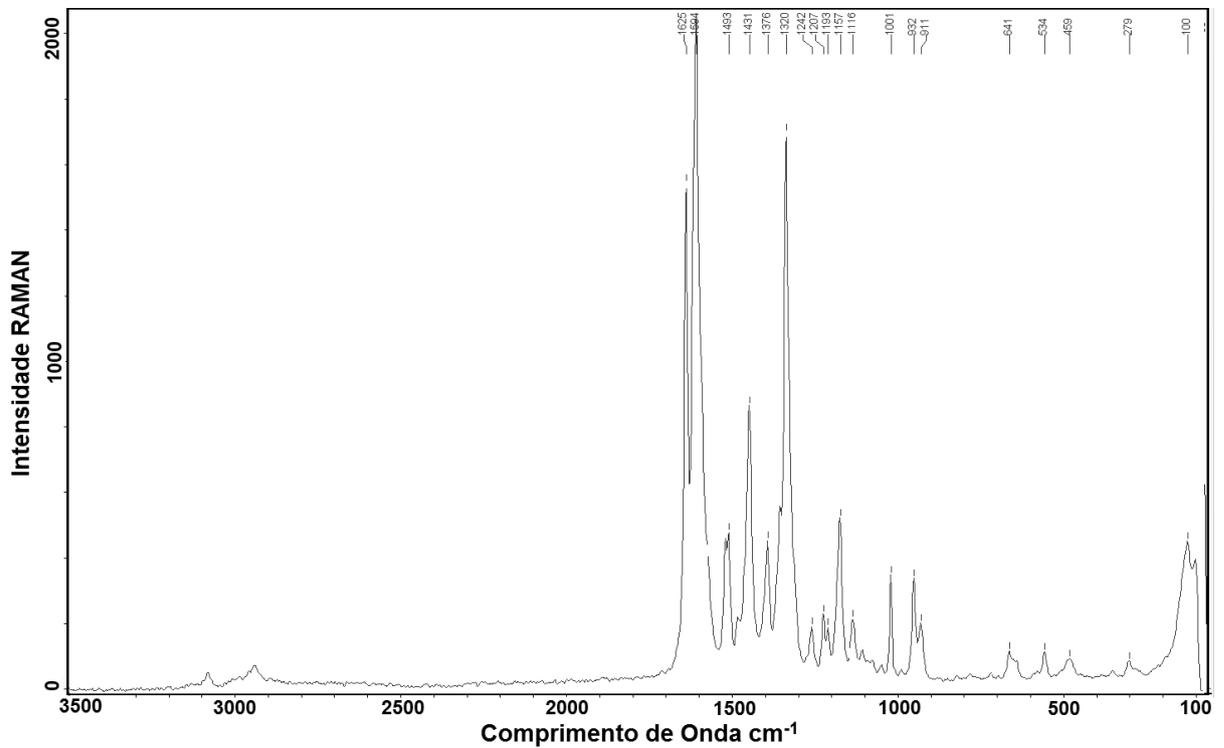


Figura 66: Espectro RAMAN Complexo C7.

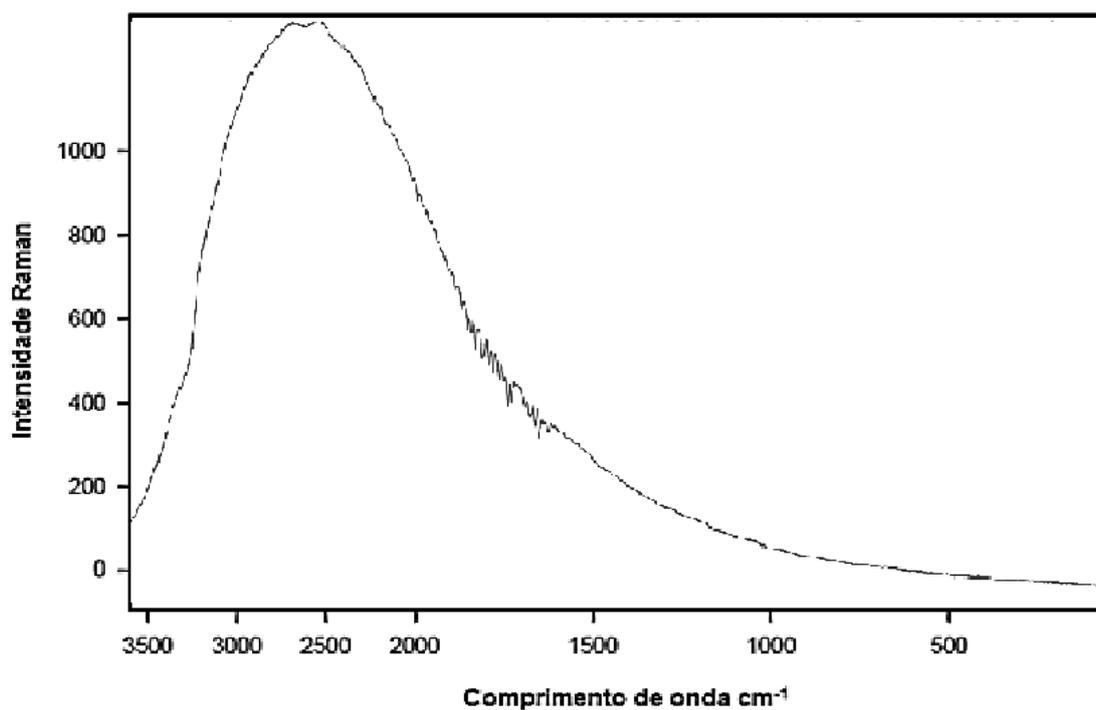


Figura 67: Espectro RAMAN Complexo C8.

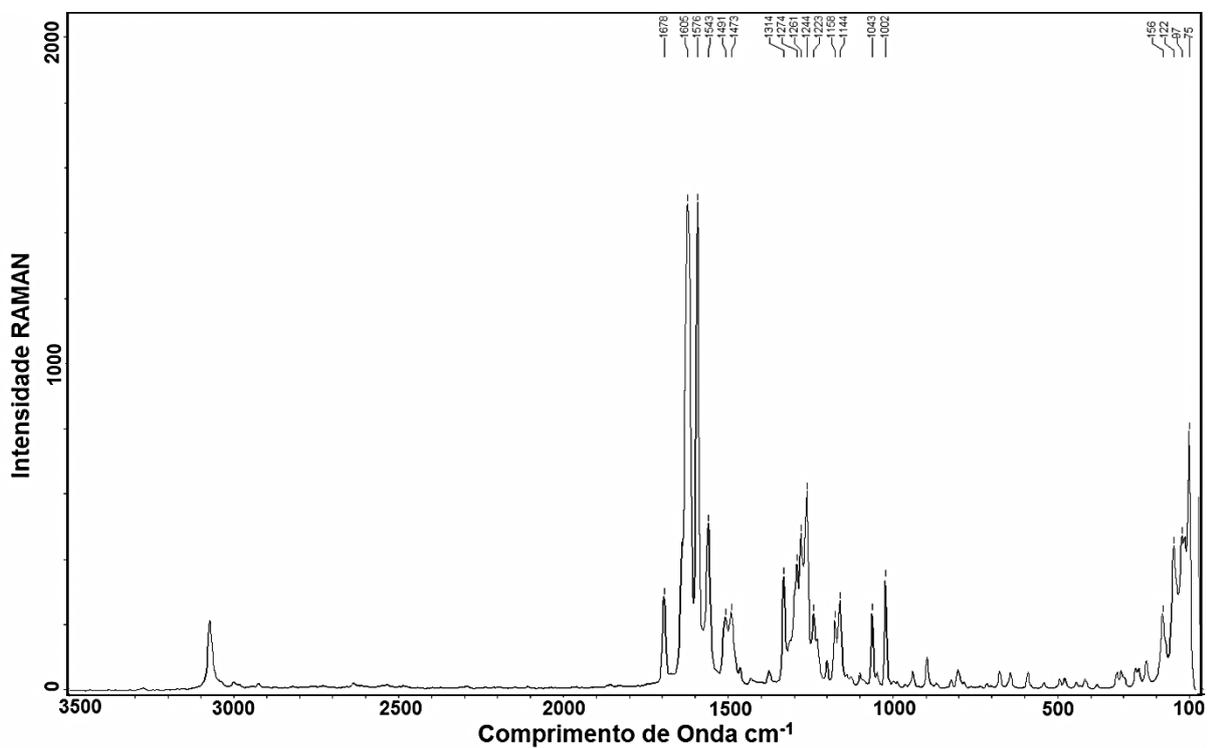


Figura 68: Espectro RAMAN Complexo C9.

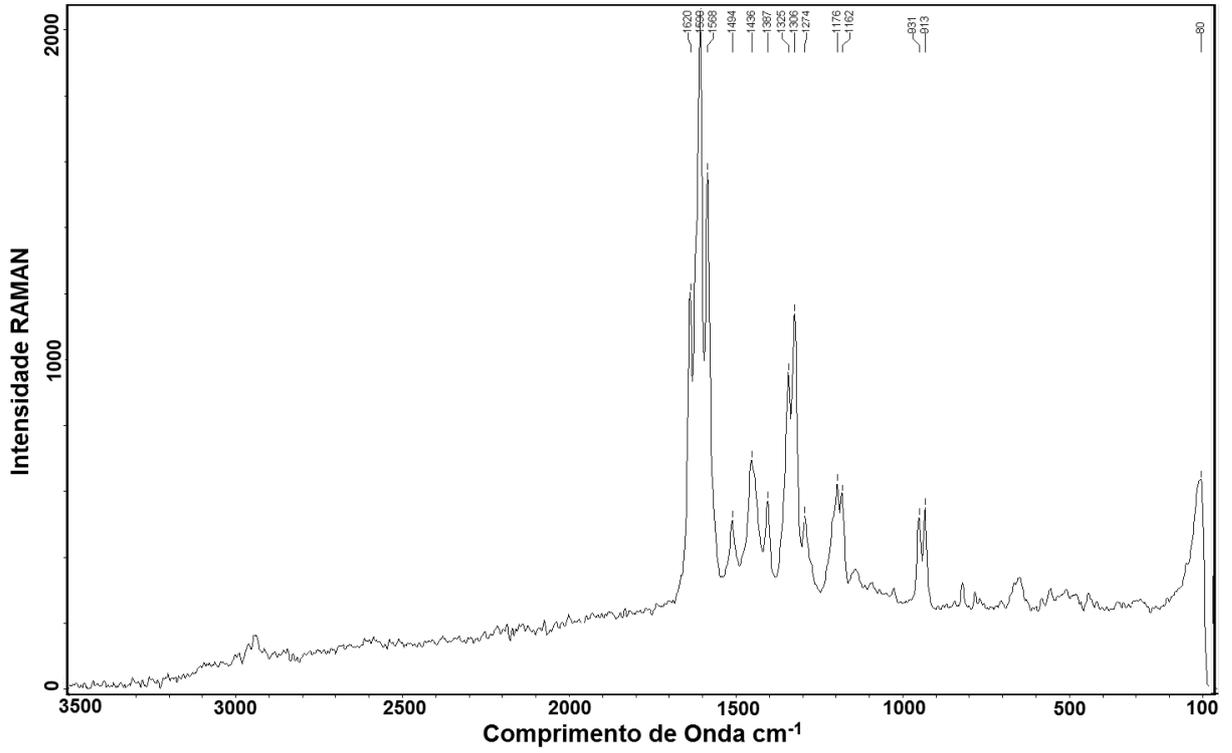
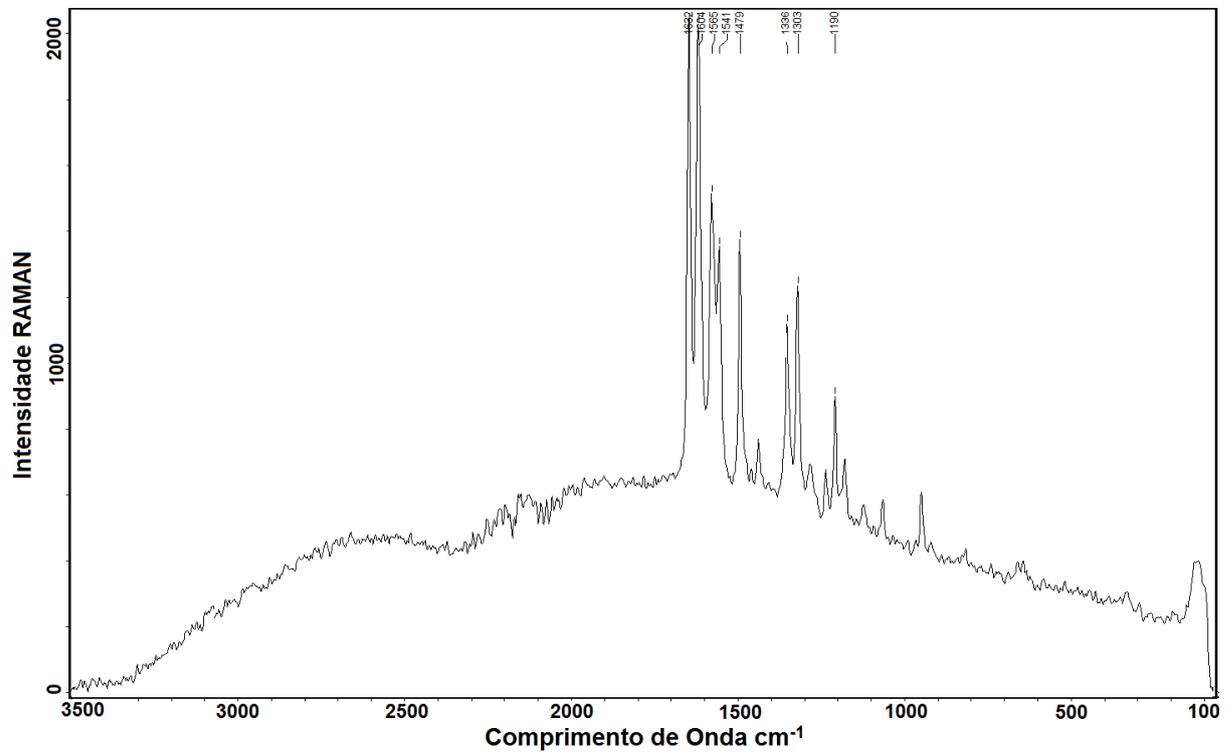


Figura 69: Espectro RAMAN Complexo C10.



7.3 Espectros de espectroscopia UV-Vis.

Figura 70: Espectro UV-Vis. Ligante L1.

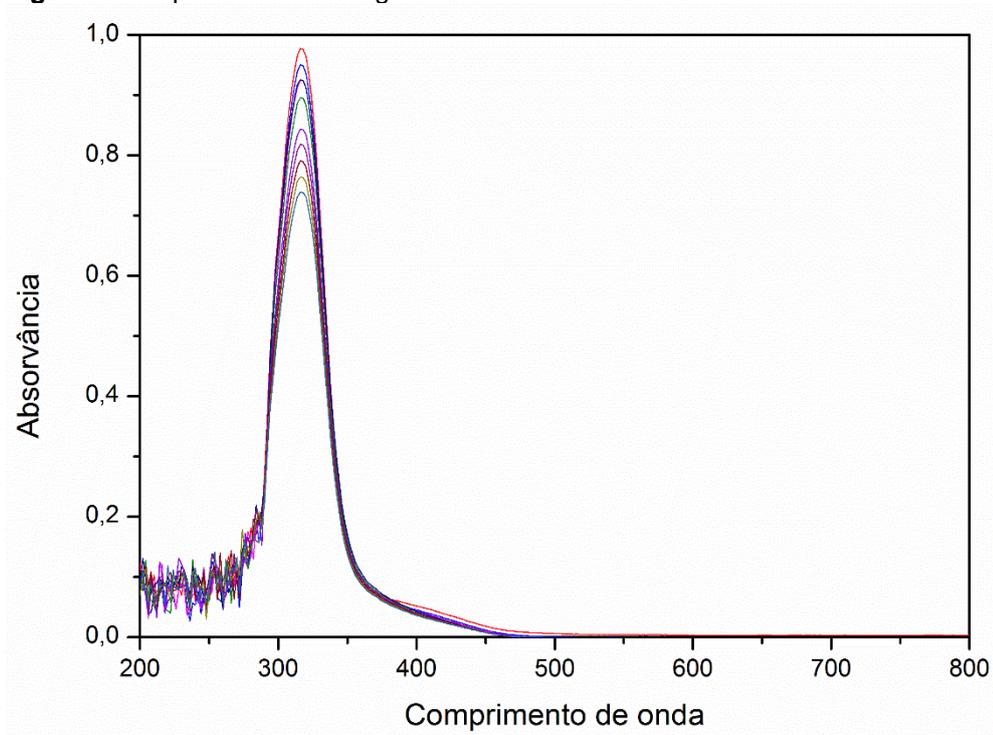


Figura 71: Espectro UV-Vis. Ligante L2.

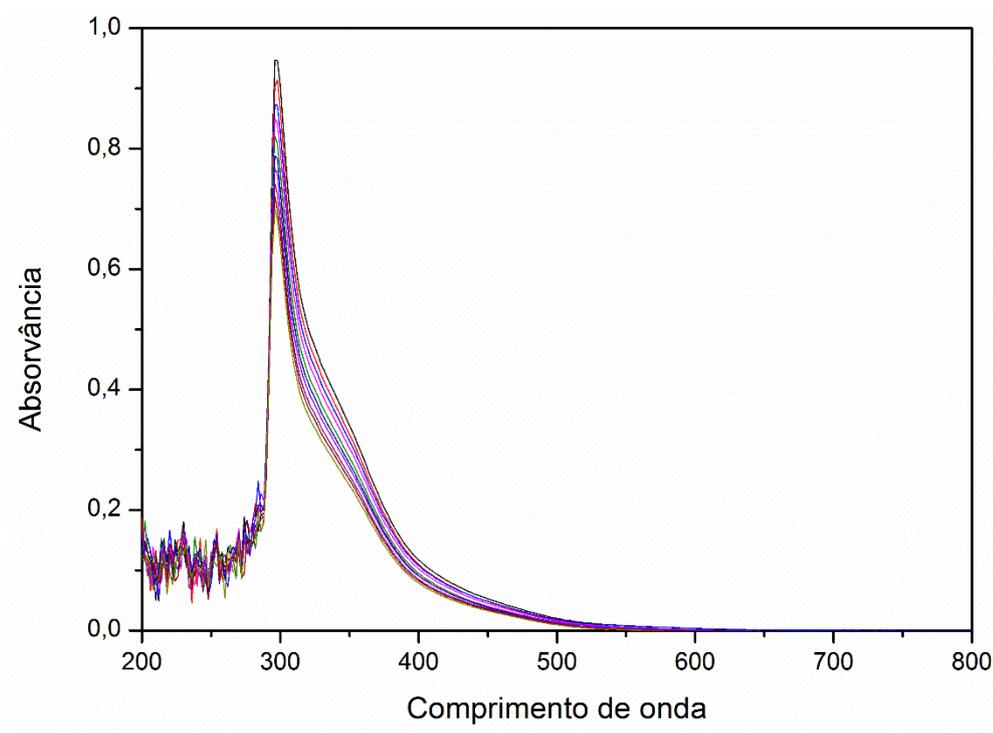


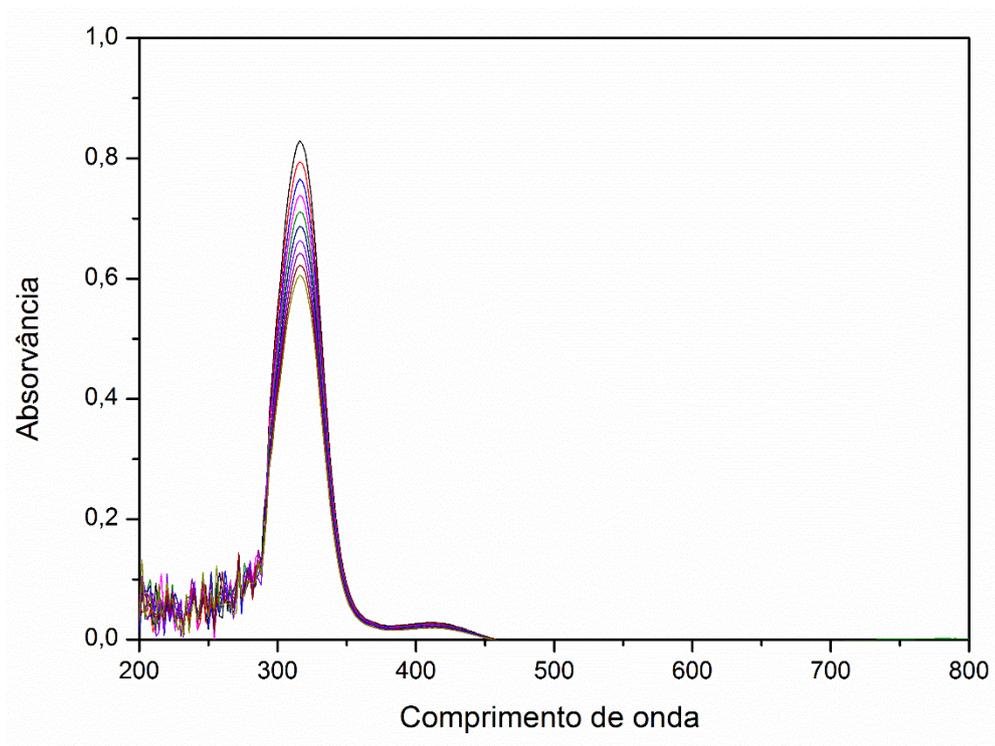
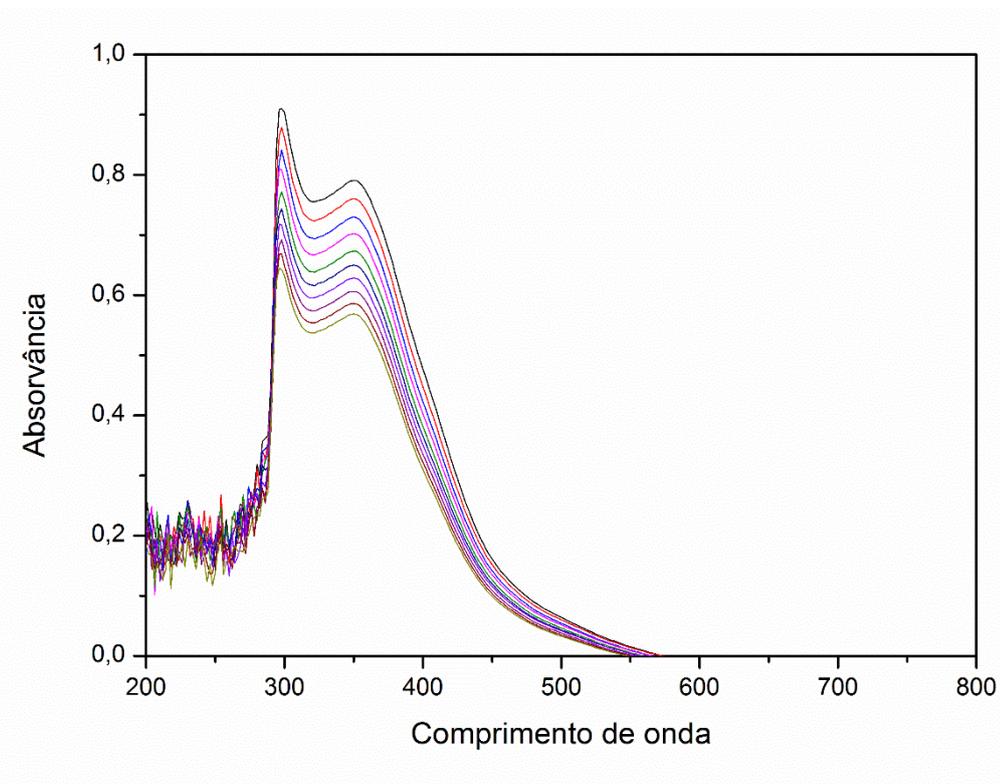
Figura 72: Espectro UV-Vis. Ligante L3.**Figura 73:** Espectro UV-Vis. Ligante L4.

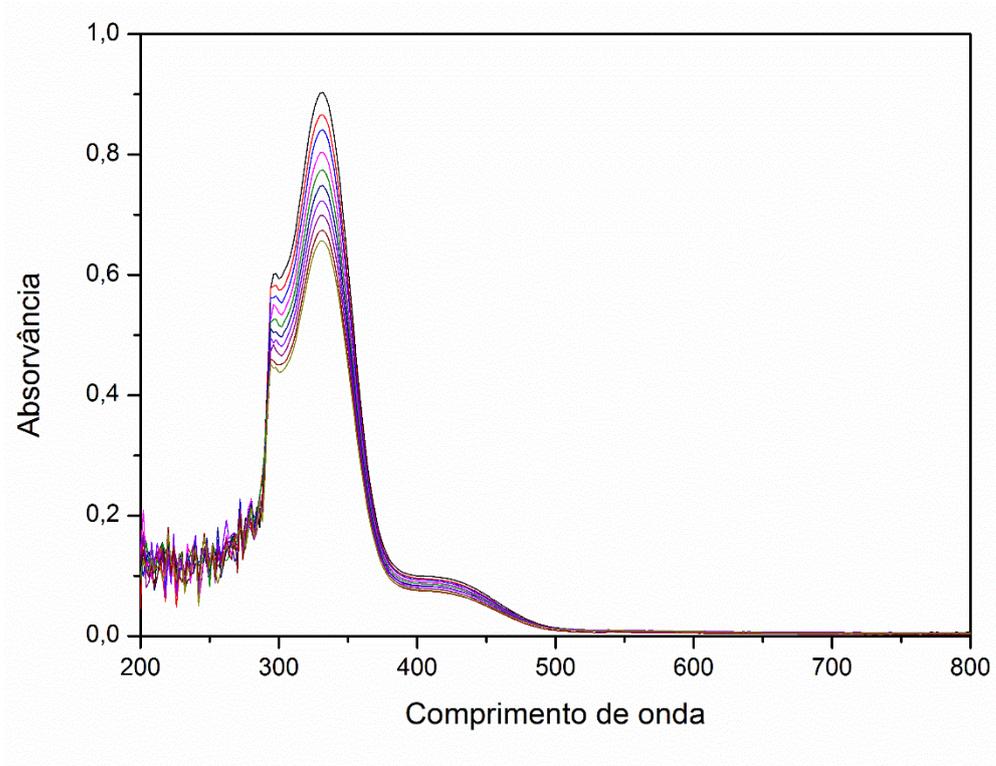
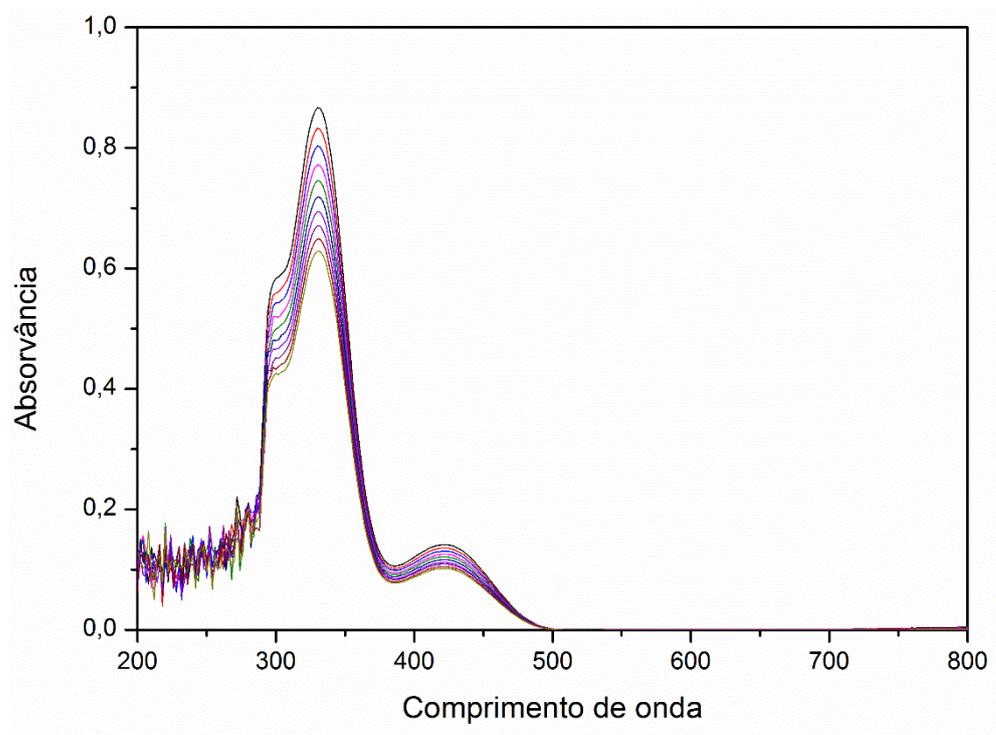
Figura 74: Espectro UV-Vis. Ligante L5.**Figura 75:** Espectro UV-Vis. Ligante L6.

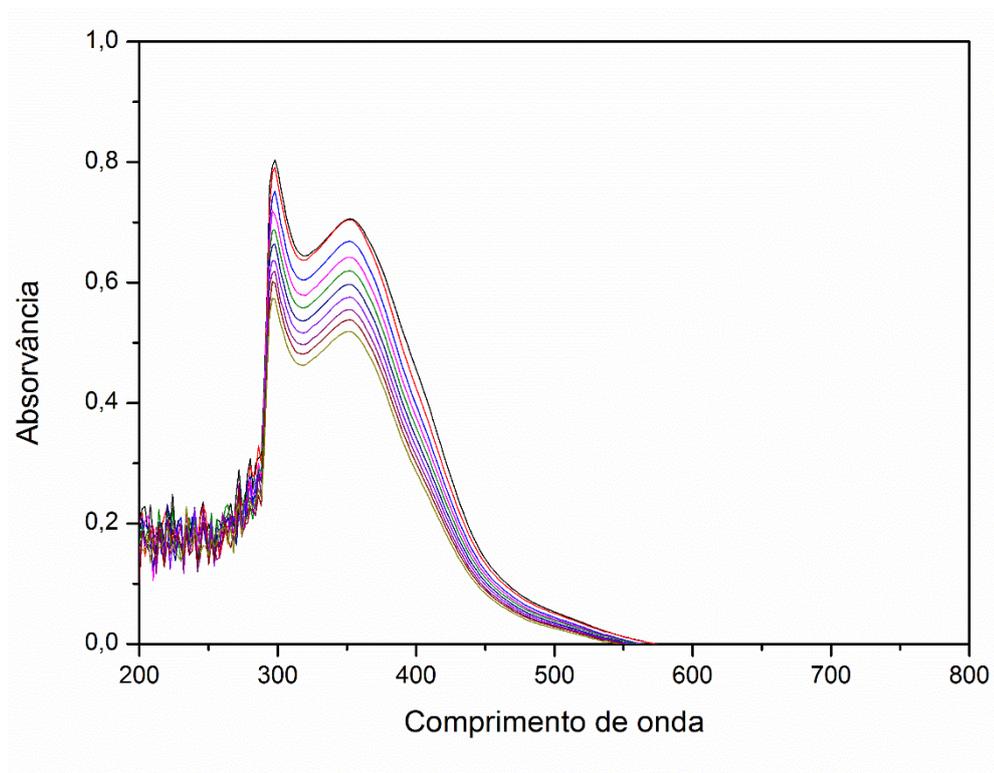
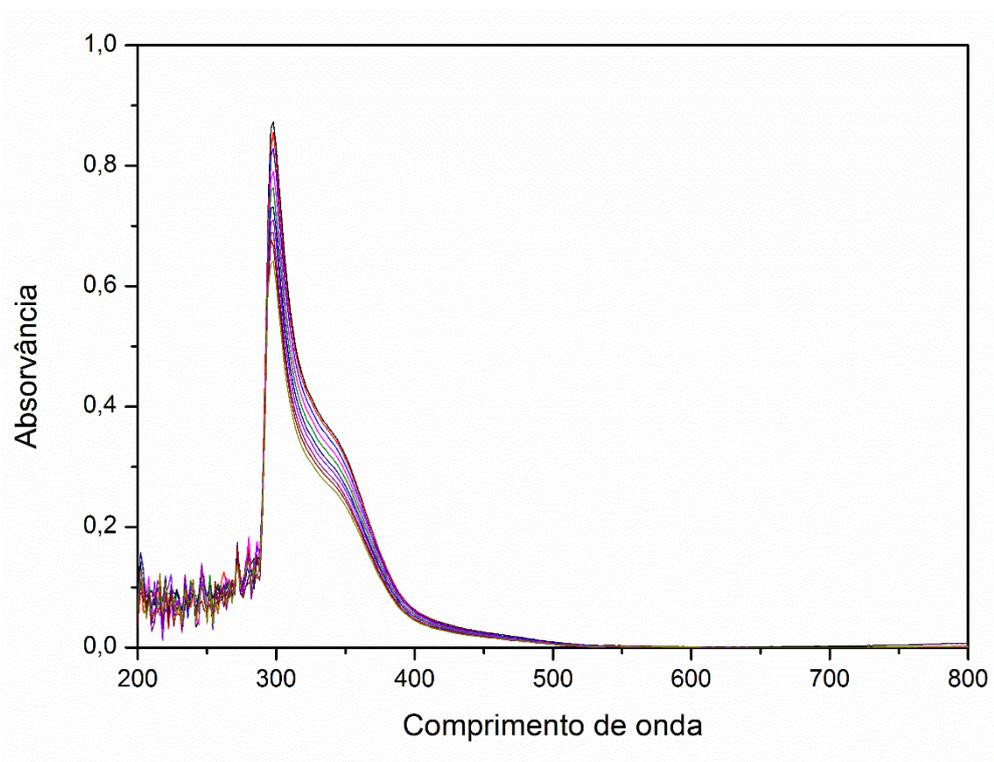
Figura 76: Espectro UV-Vis. Ligante L7.**Figura 77:** Espectro UV-Vis. Ligante L8.

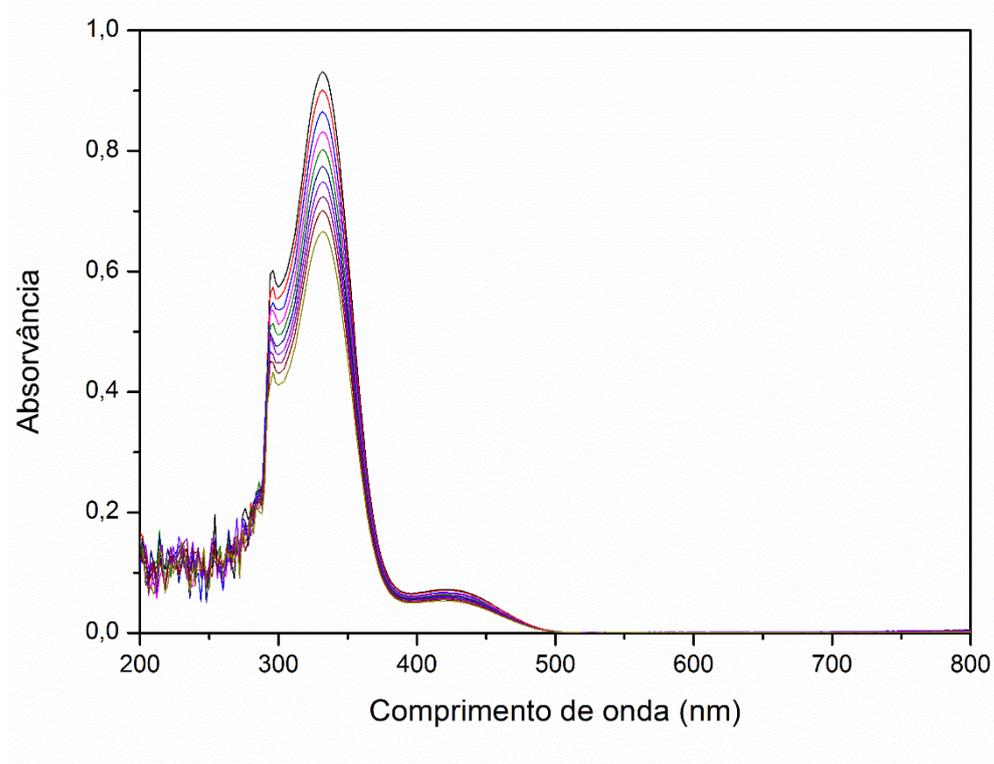
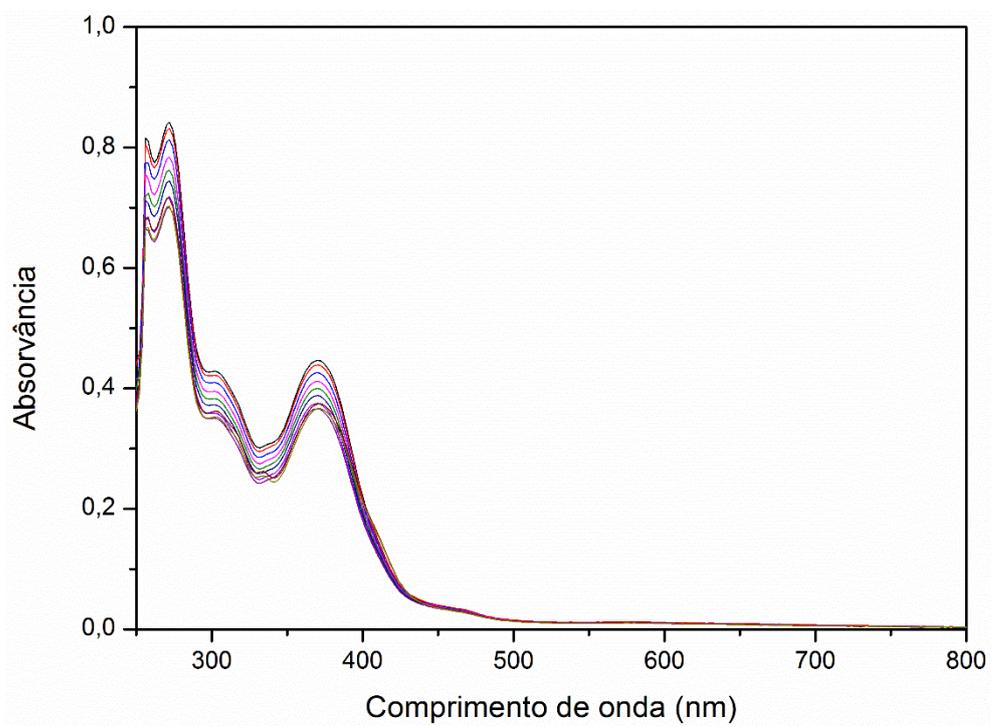
Figura 78: Espectro UV-Vis. Ligante L9.**Figura 79:** Espectro UV-Vis. Complexo C1.

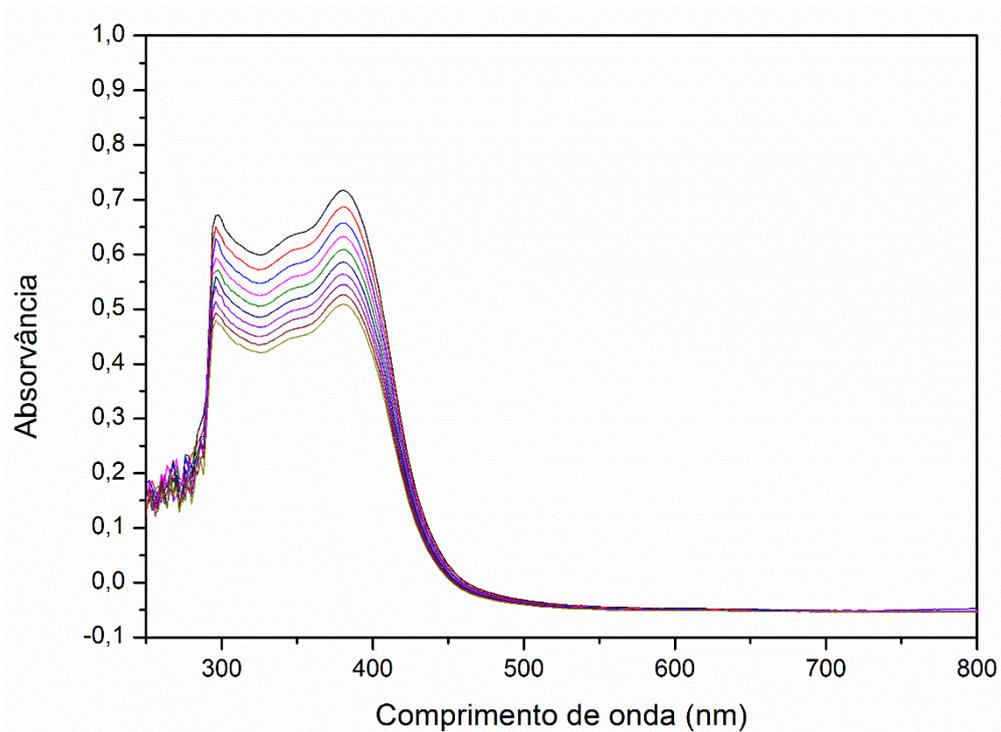
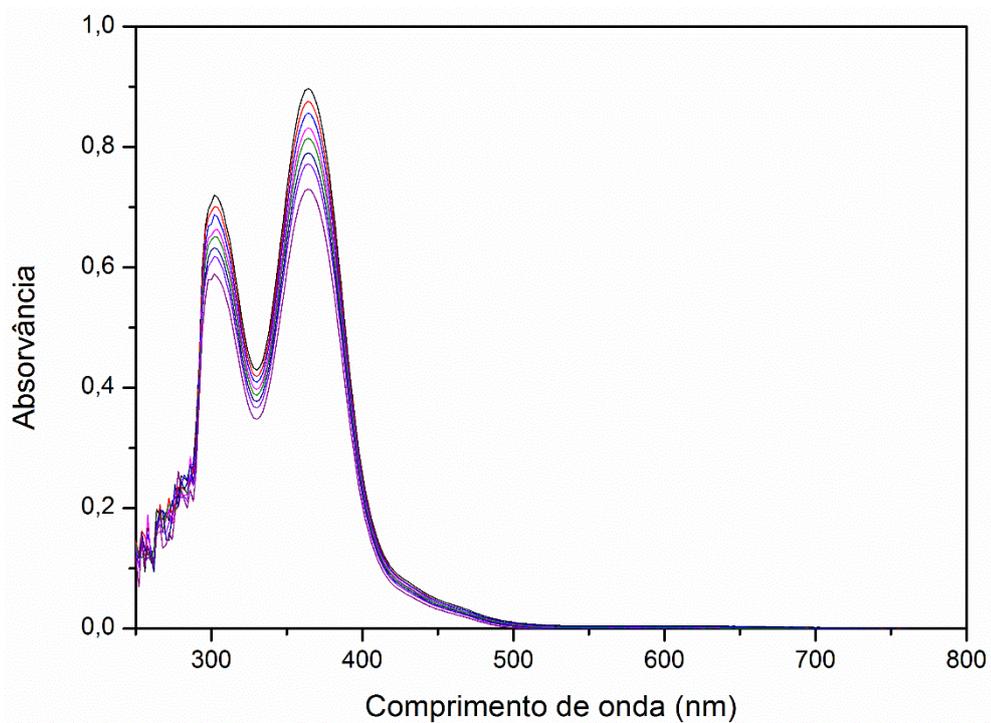
Figura 80: Espectro UV-Vis. Complexo C2.**Figura 81:** Espectro UV-Vis. Complexo C3.

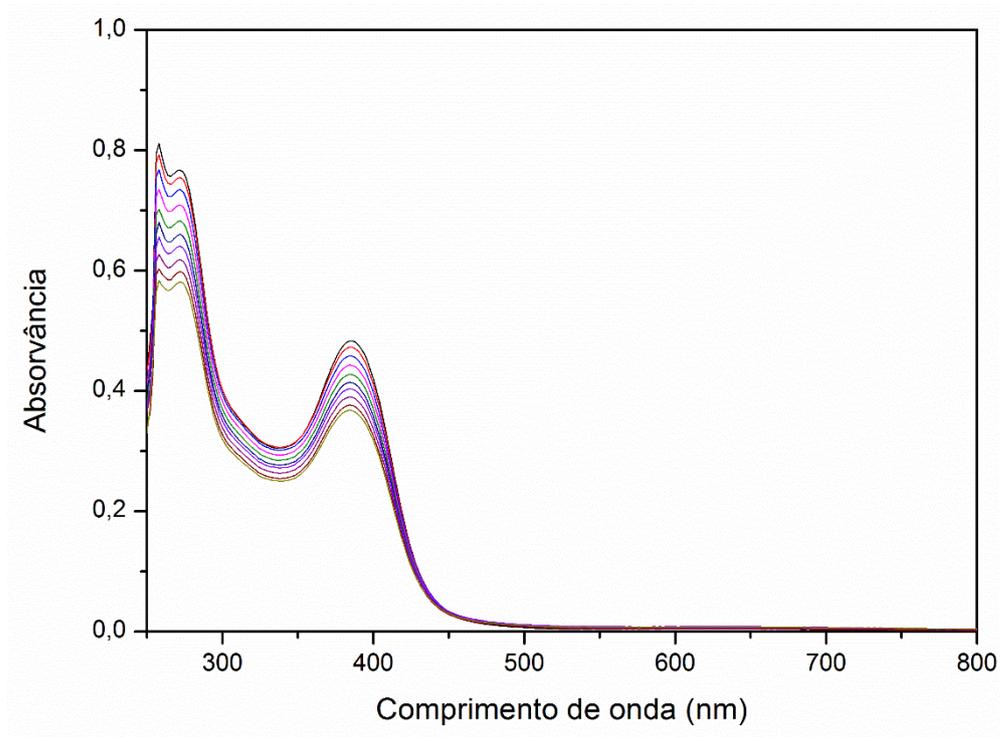
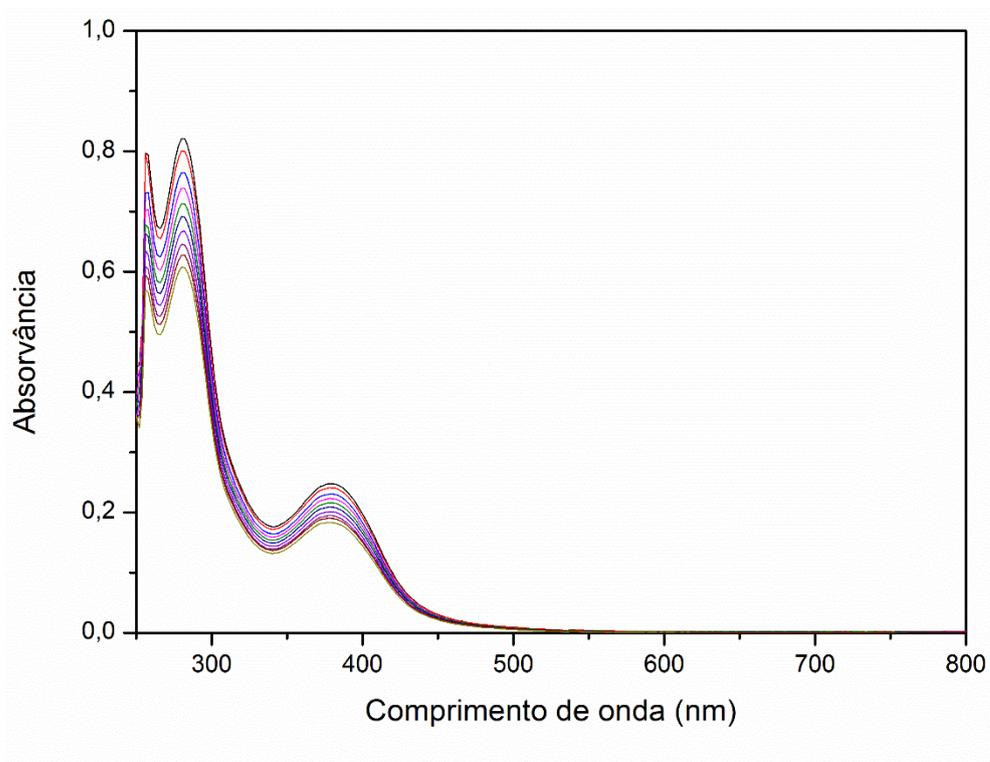
Figura 82: Espectro UV-Vis. Complexo C4.**Figura 83:** Espectro UV-Vis. Complexo C5.

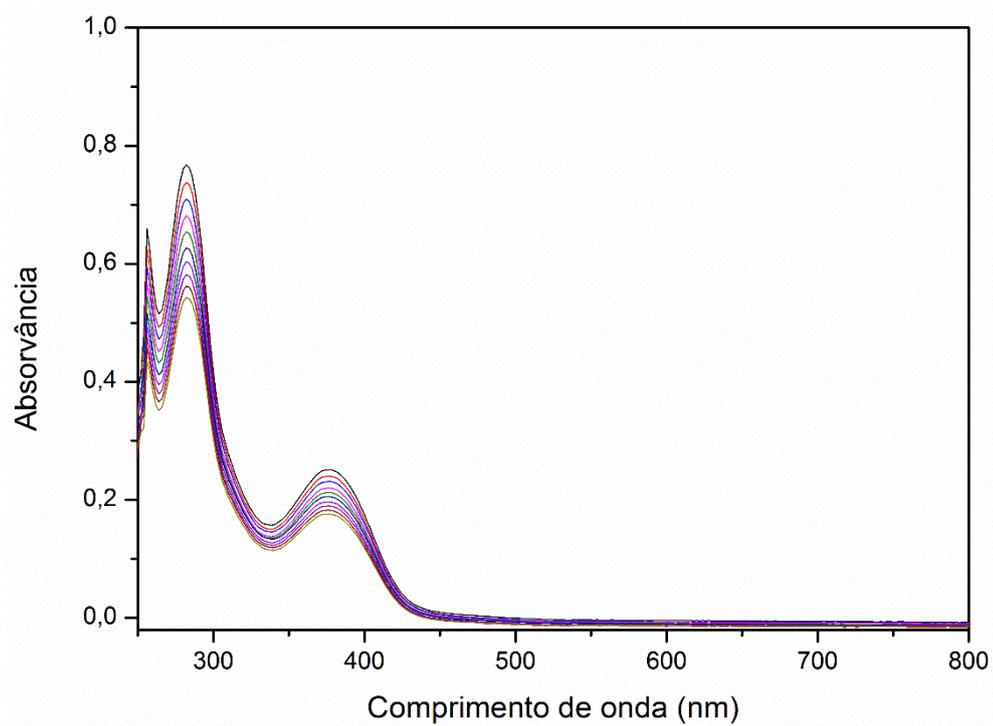
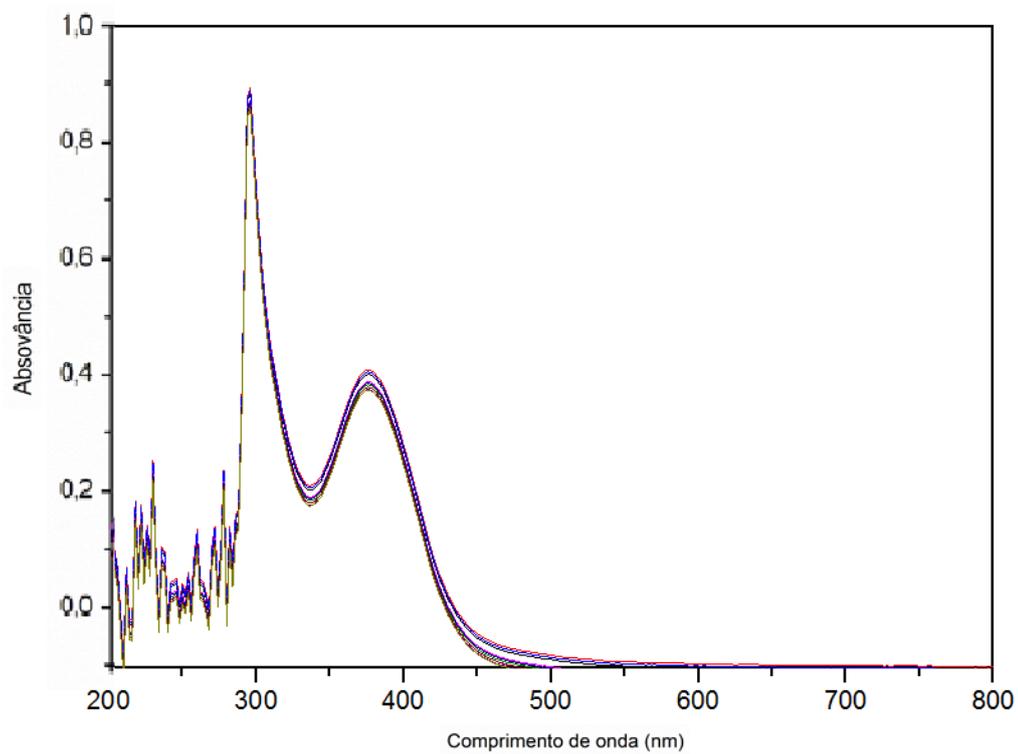
Figura 84: Espectro UV-Vis. Complexo C6.**Figura 85:** Espectro UV-Vis. Complexo C7.

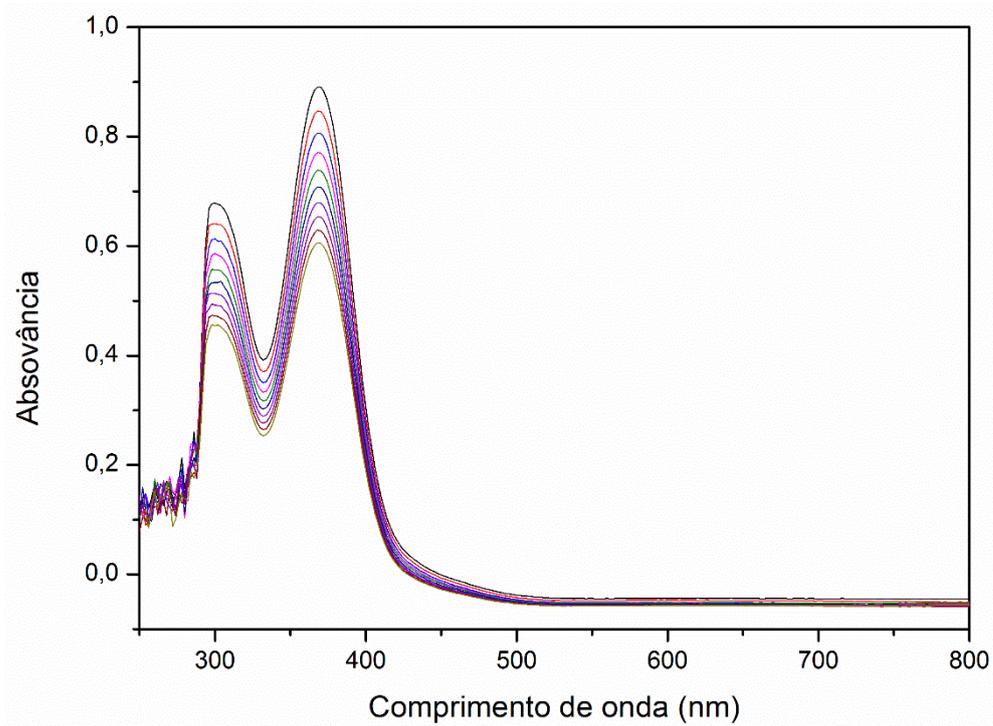
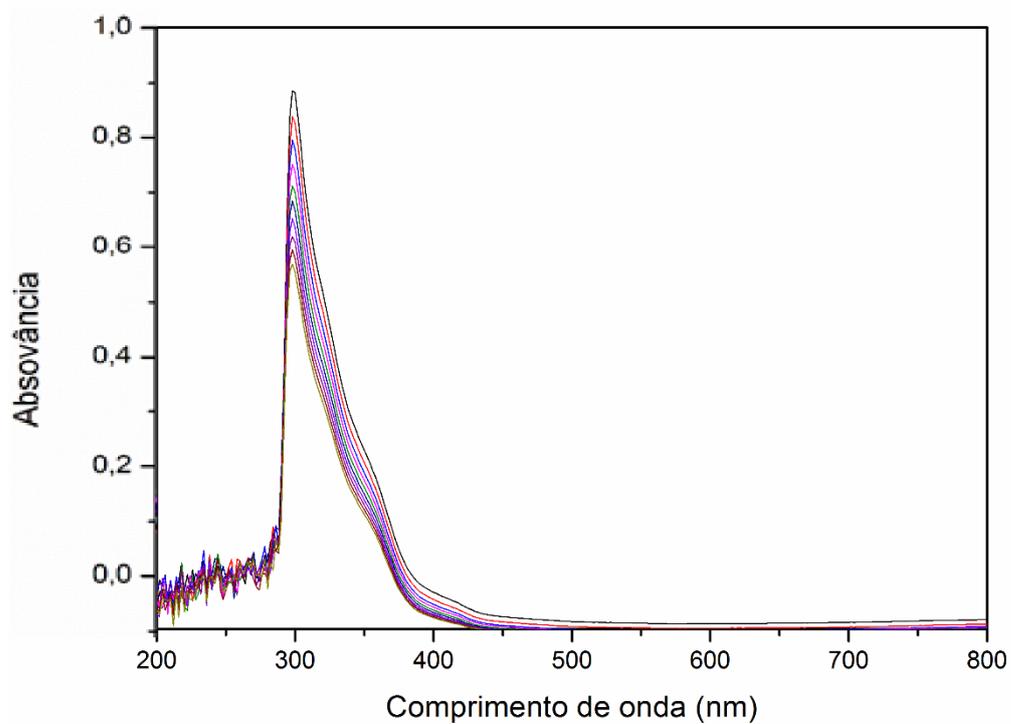
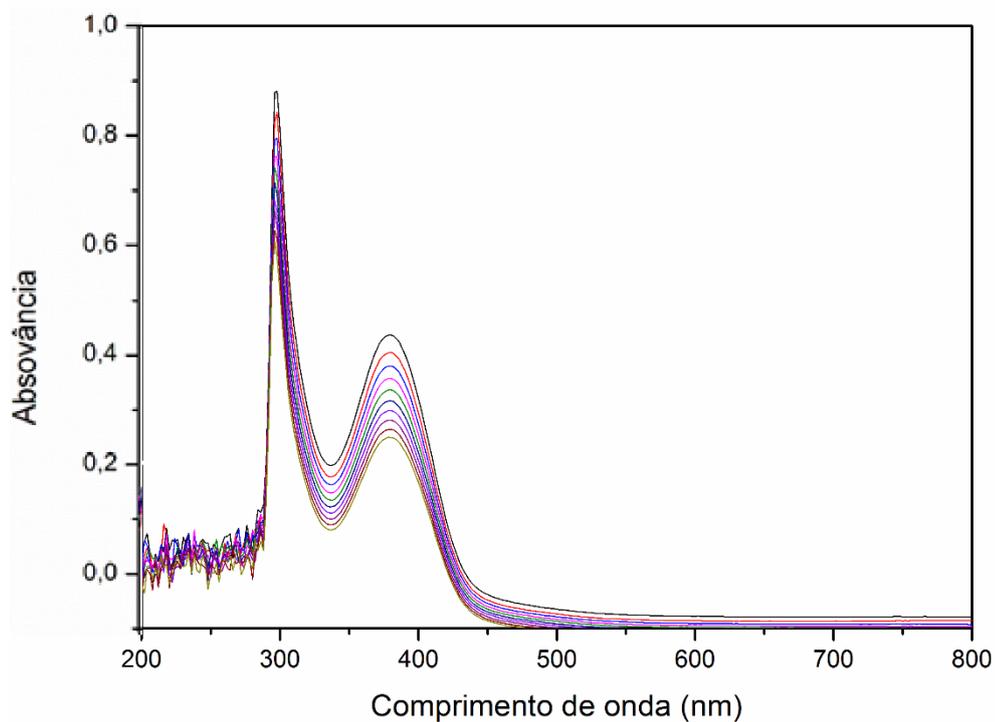
Figura 86: Espectro UV-Vis. Complexo C8.**Figura 87:** Espectro UV-Vis. Complexo C9.

Figura 88: Espectro UV-Vis. Complexo C10.

8.4 Espectros de espectroscopia UV-Vis. Estabilidade em solução

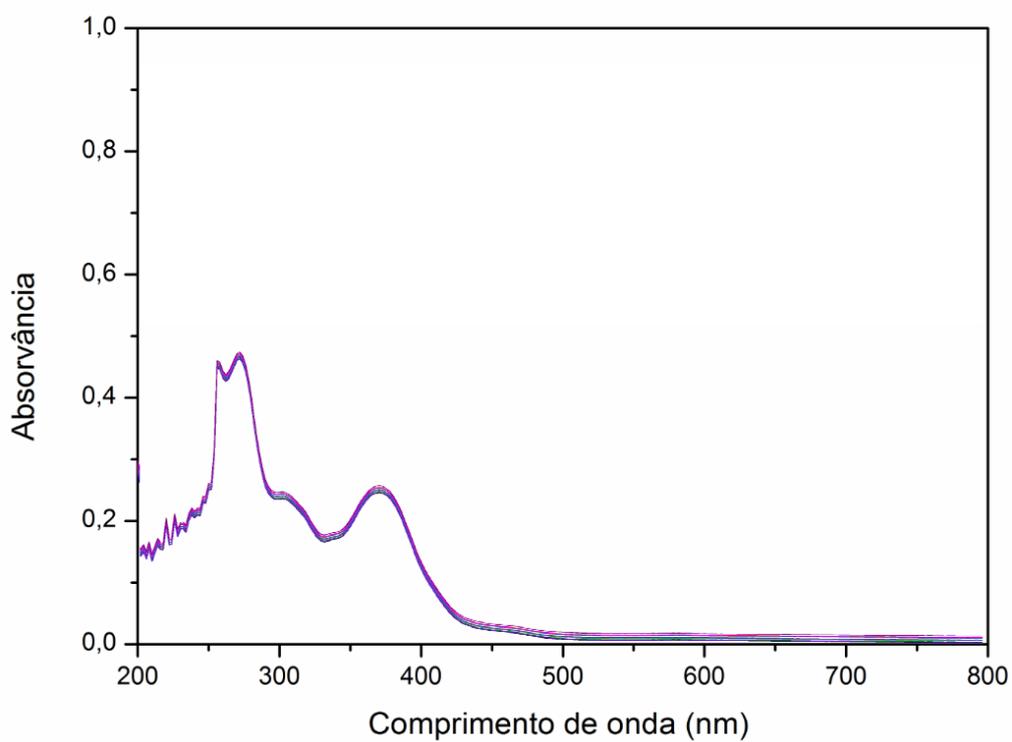
Figura 89: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C1.

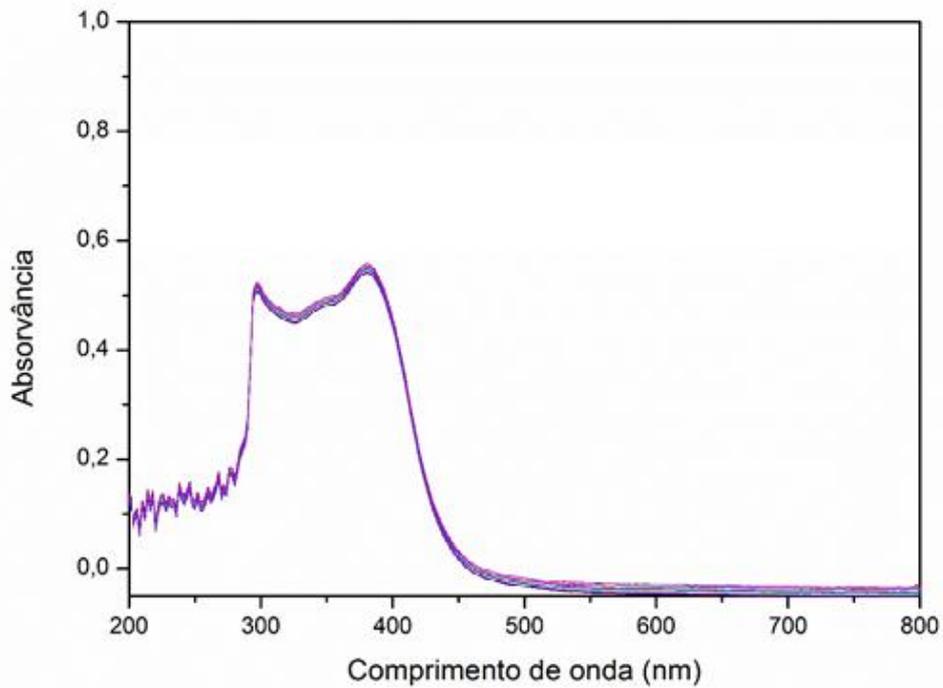
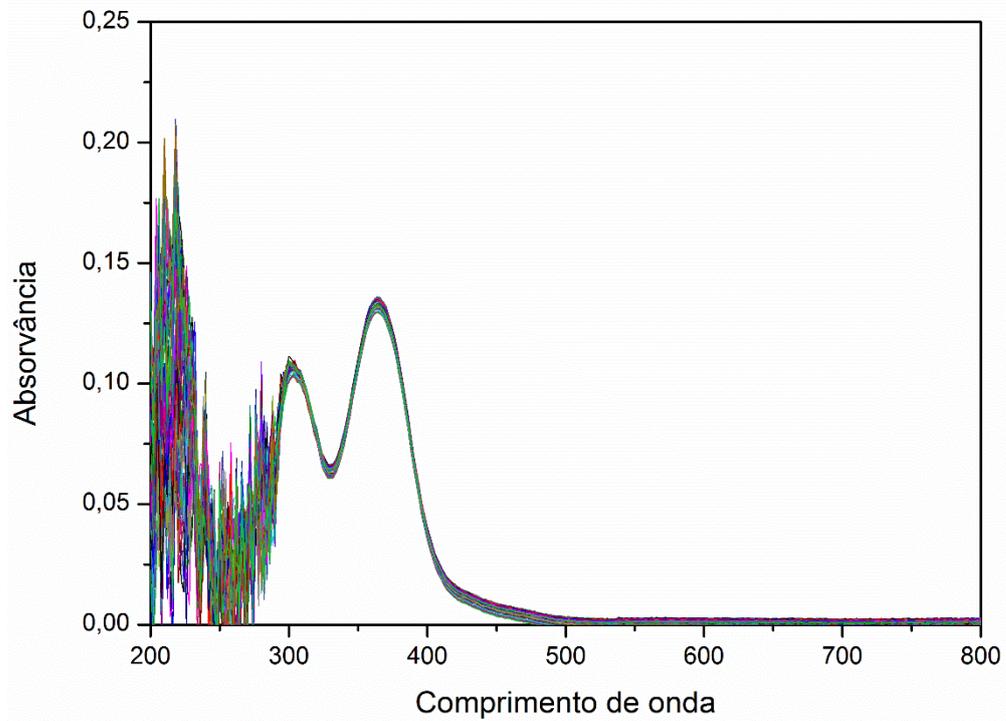
Figura 90: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C2.**Figura 91:** Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C3.

Figura 92: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C4.

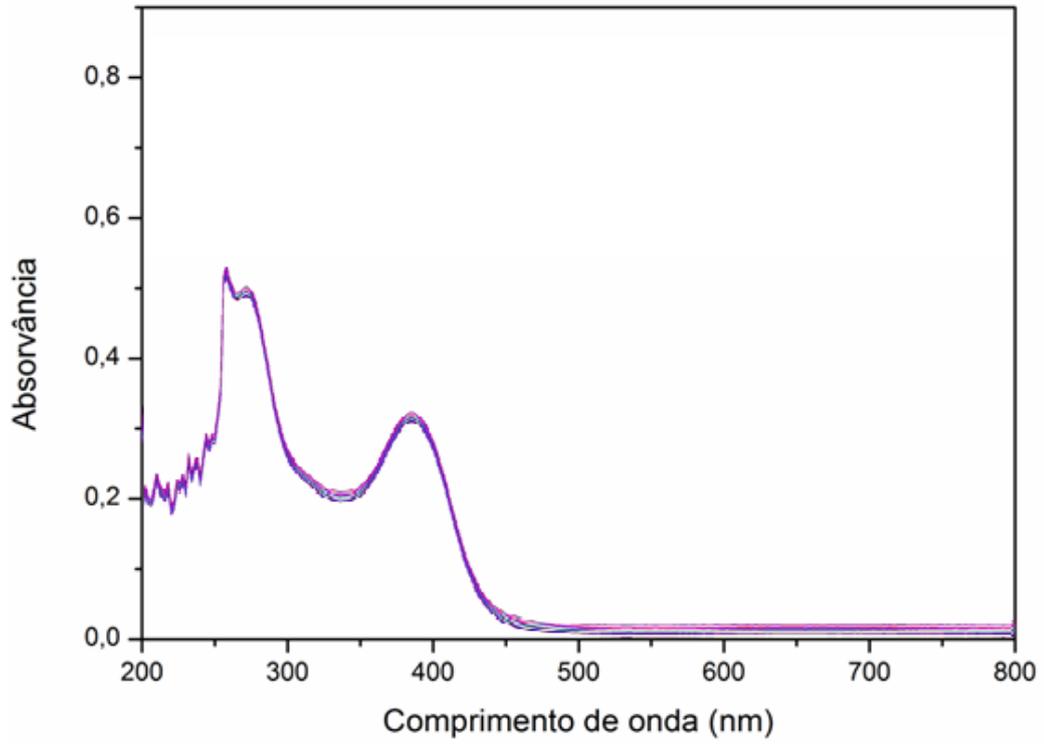


Figura 93: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C5.

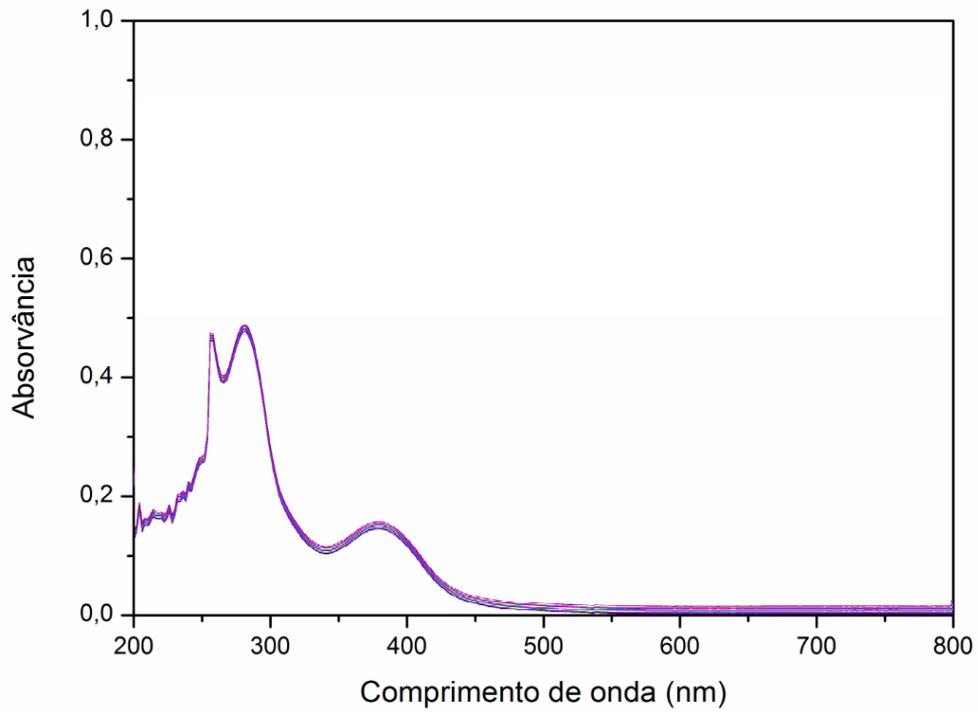


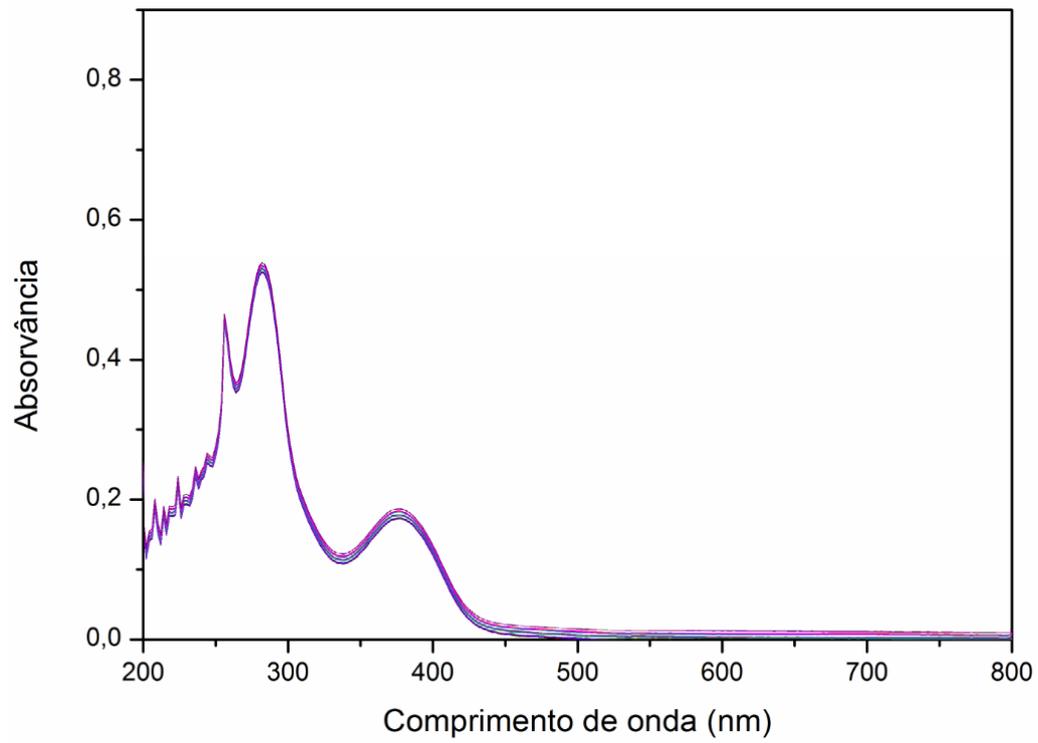
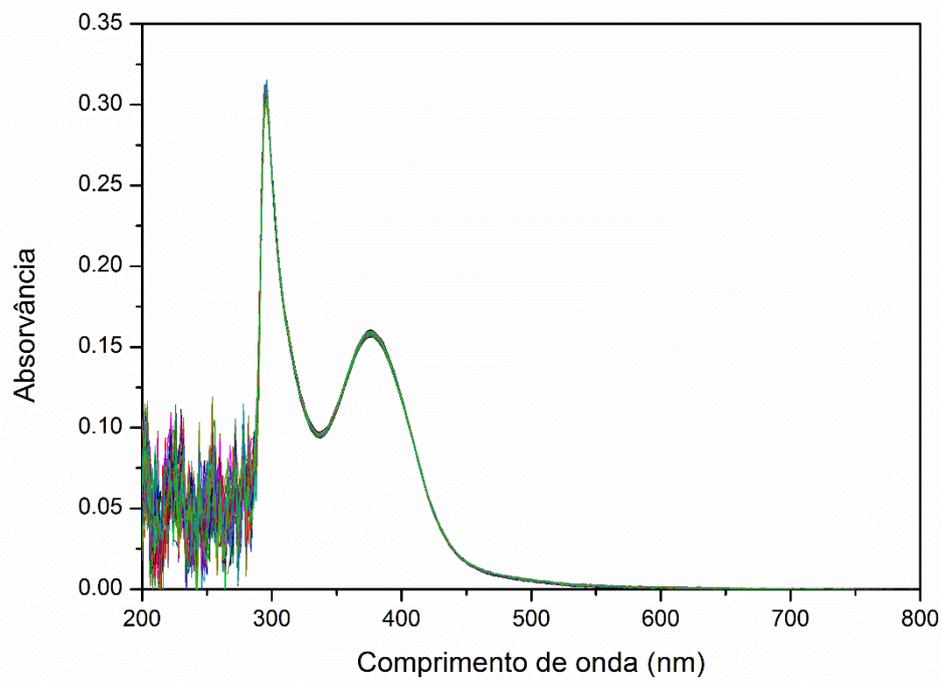
Figura 94: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C6.**Figura 95:** Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C7.

Figura 96: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C8.

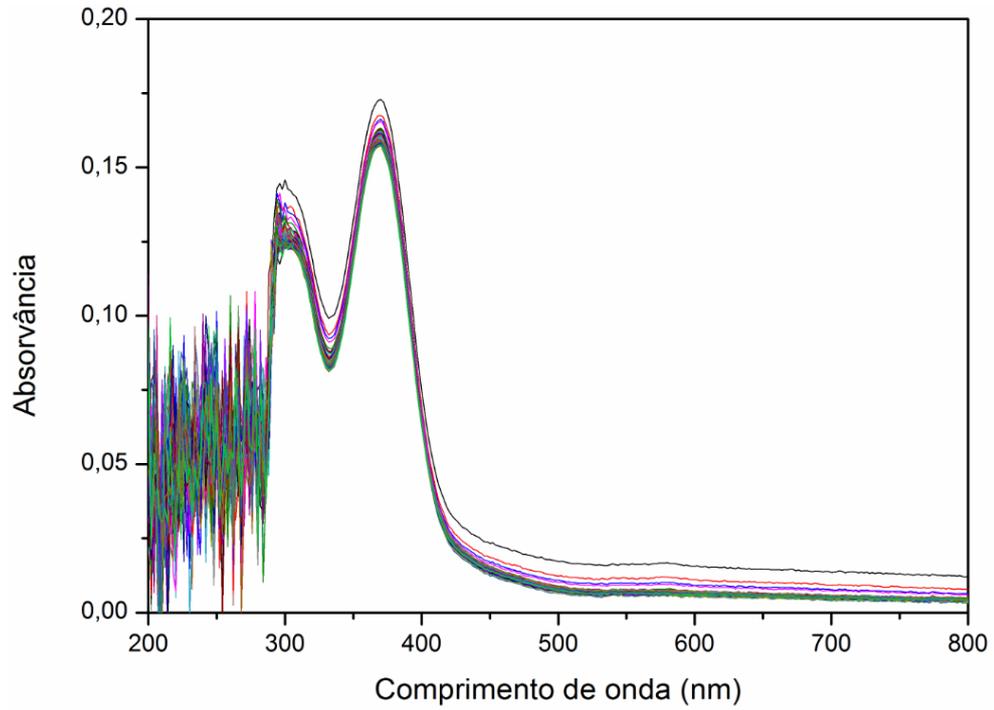


Figura 97: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C9.

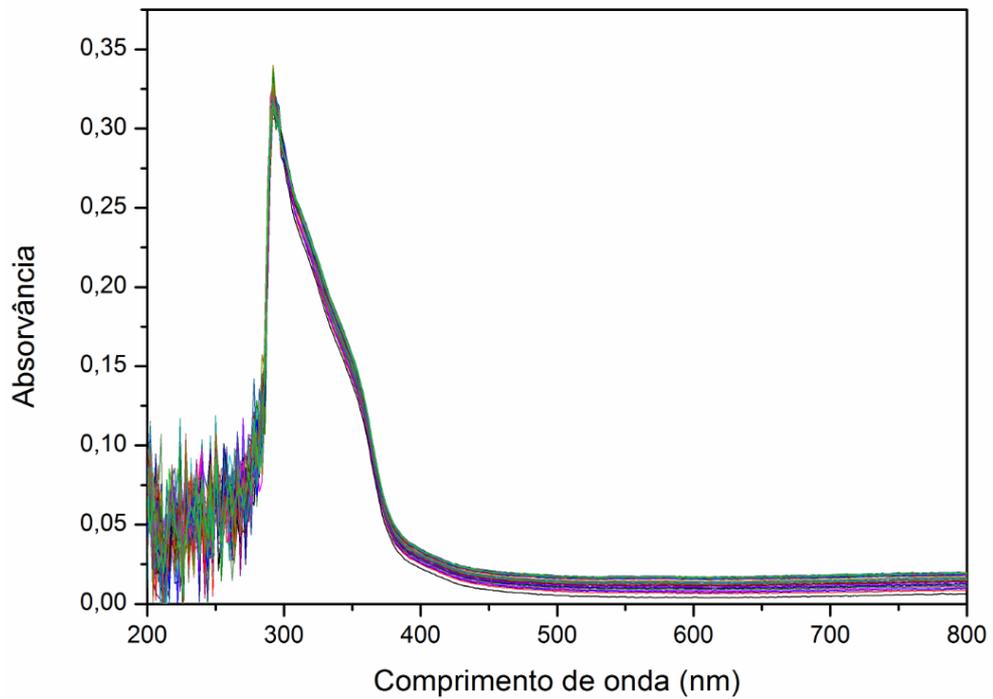
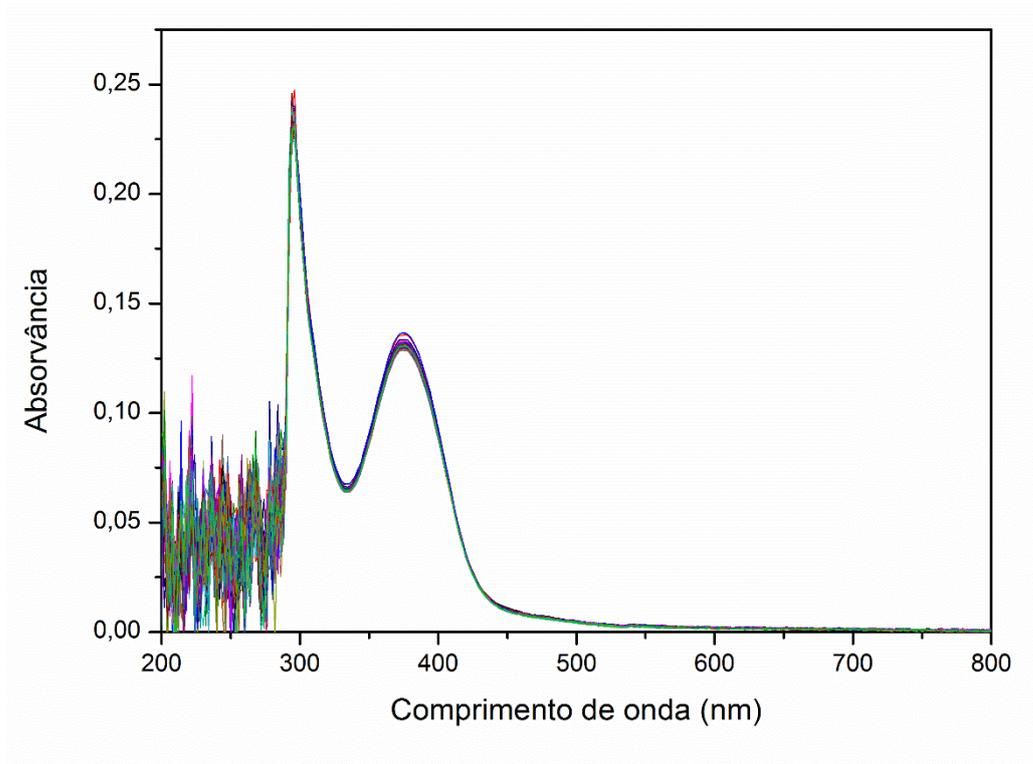


Figura 98: Espectro UV Vis. Estabilidade em solução Complexo C10.



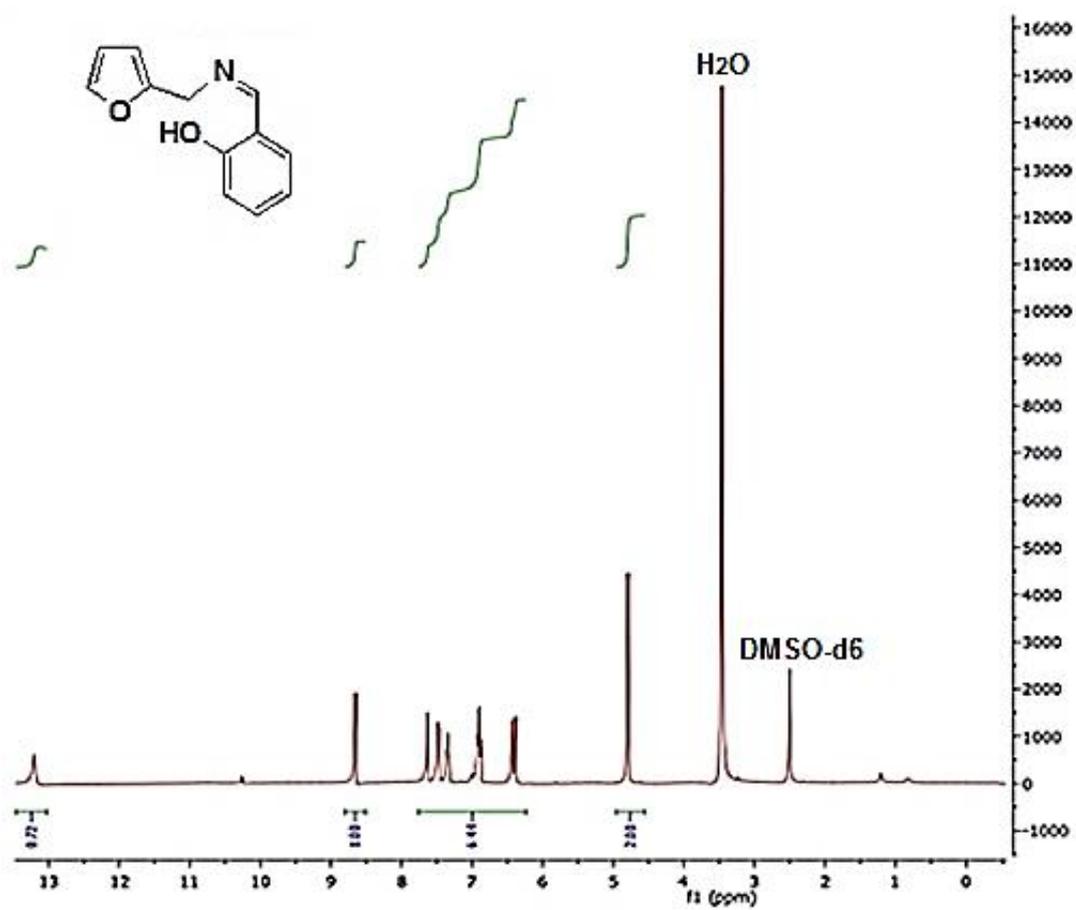
7.5 Espectros de RMN ^1H Figura 99: Espectro RMN ^1H ligante L1.

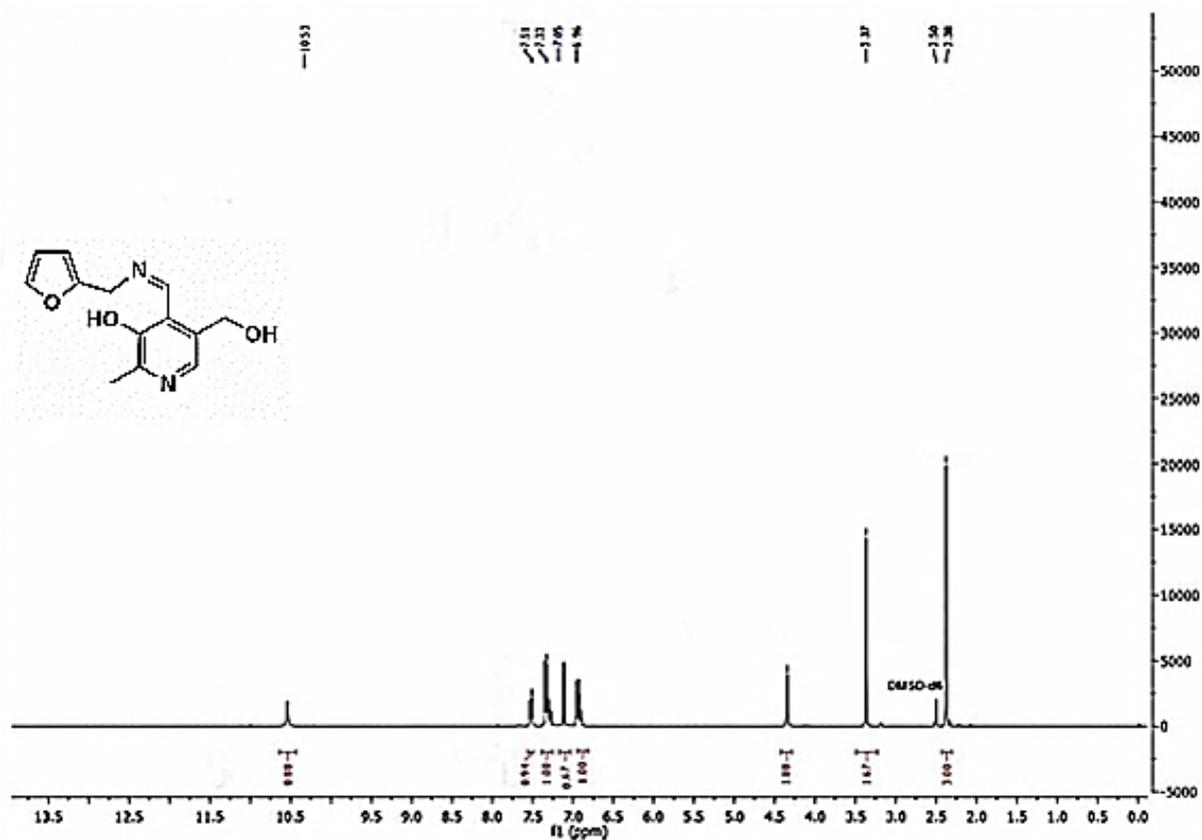
Figura 100: Espectro RMN ^1H ligante L2.

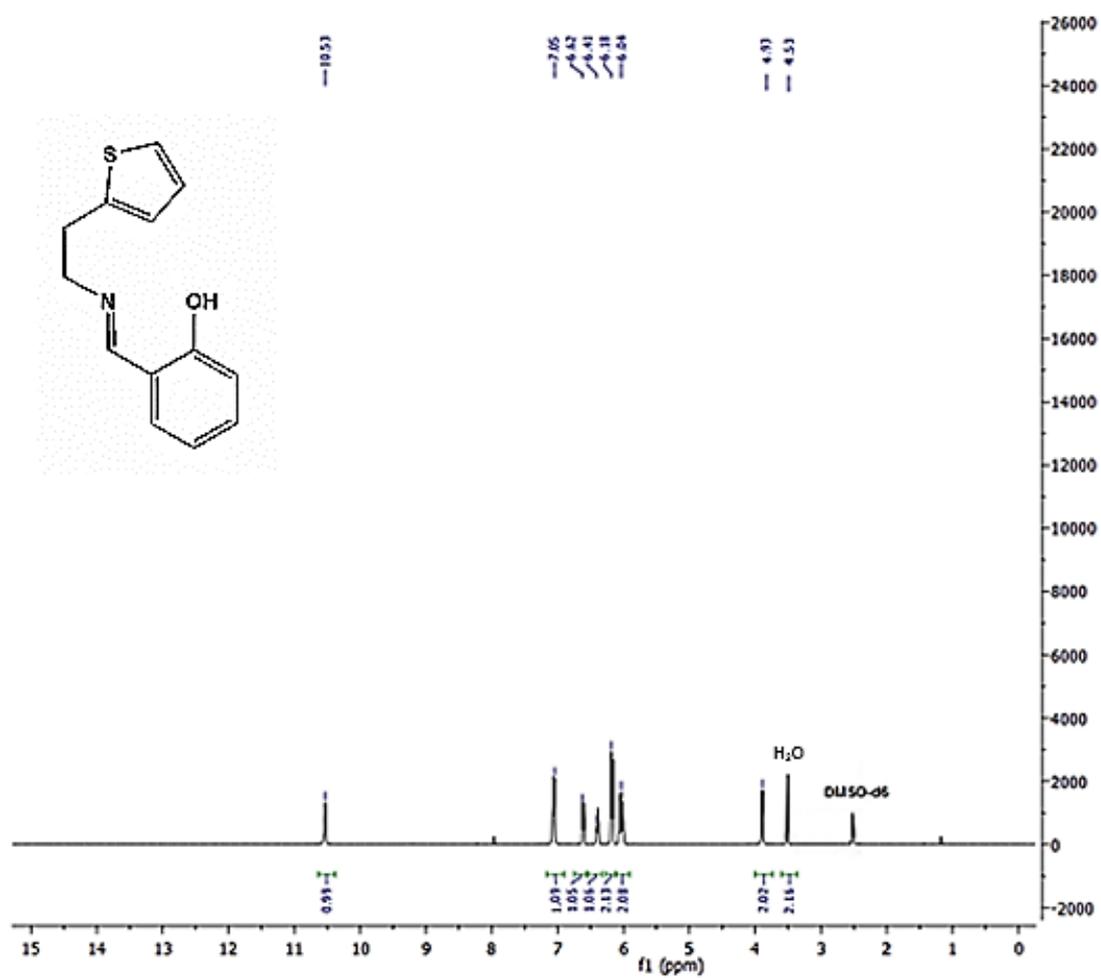
Figura 101: Espectro RMN ^1H ligante L3.

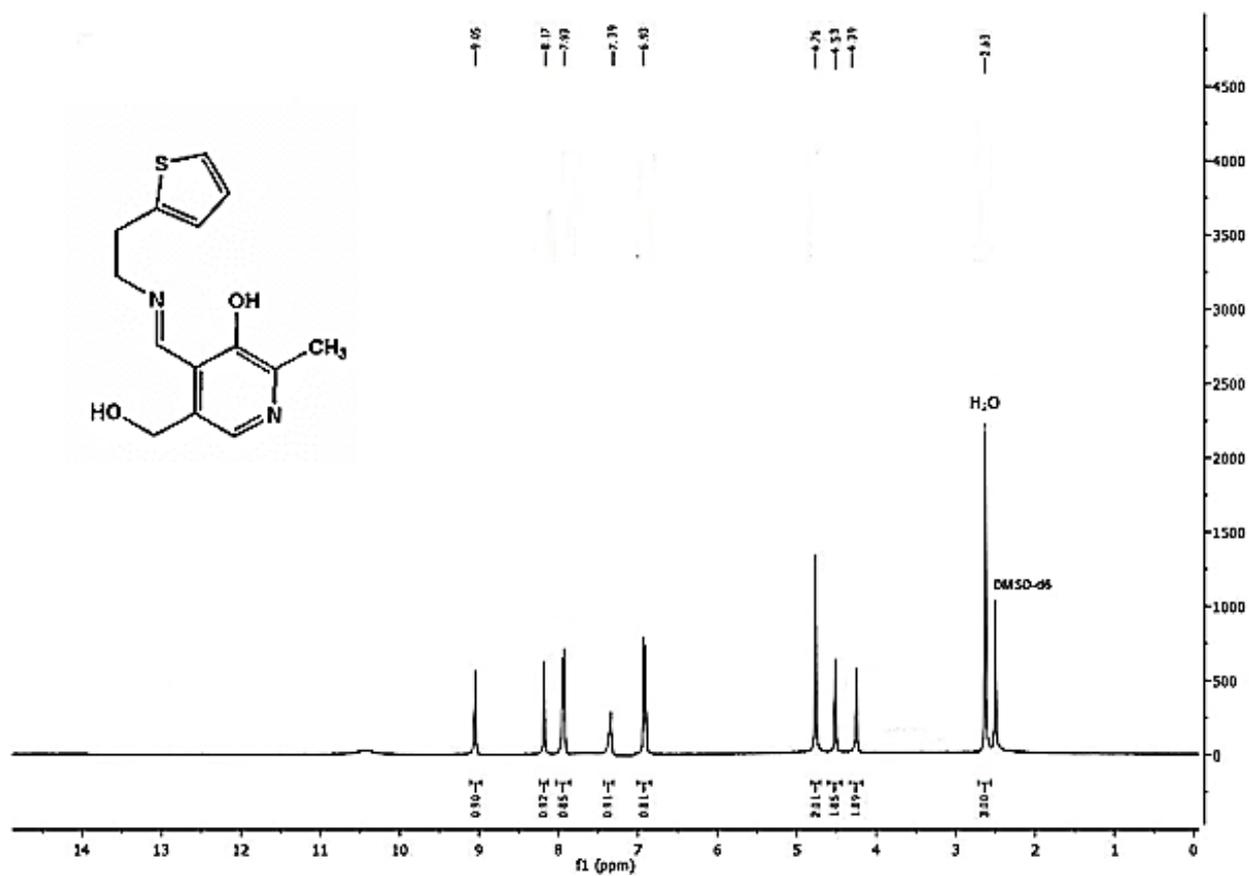
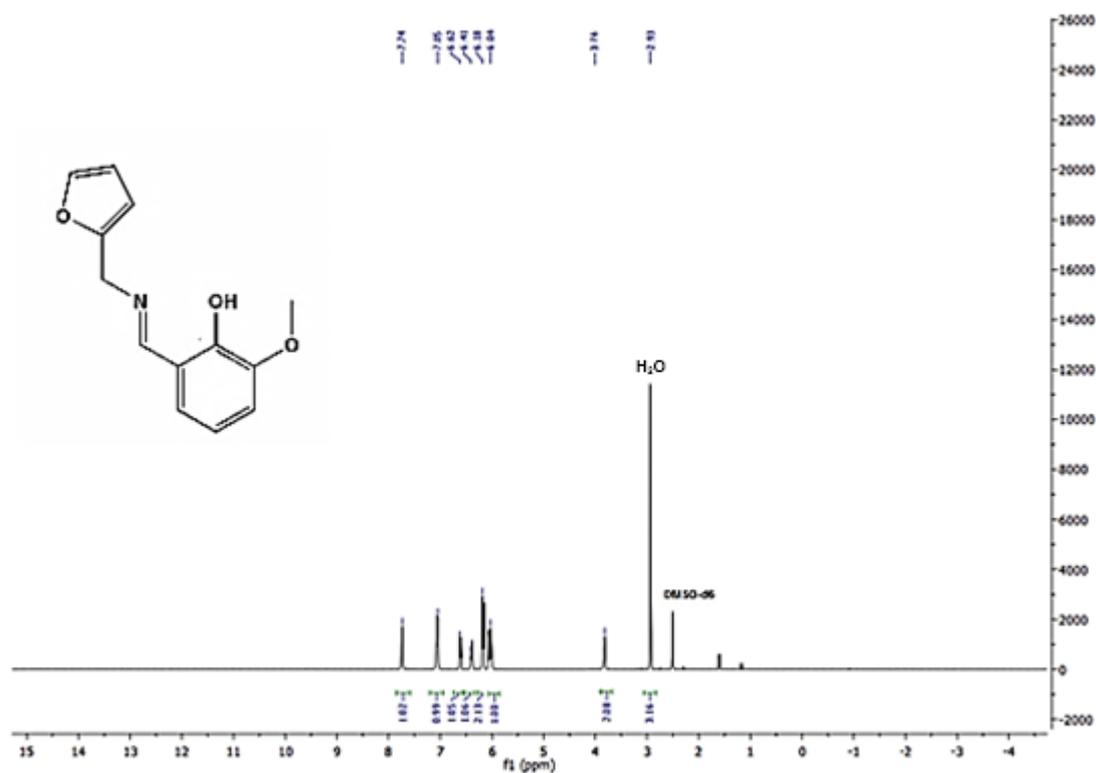
Figura 102: Espectro RMN ^1H ligante L4.Figura 103: Espectro RMN ^1H ligante L5.

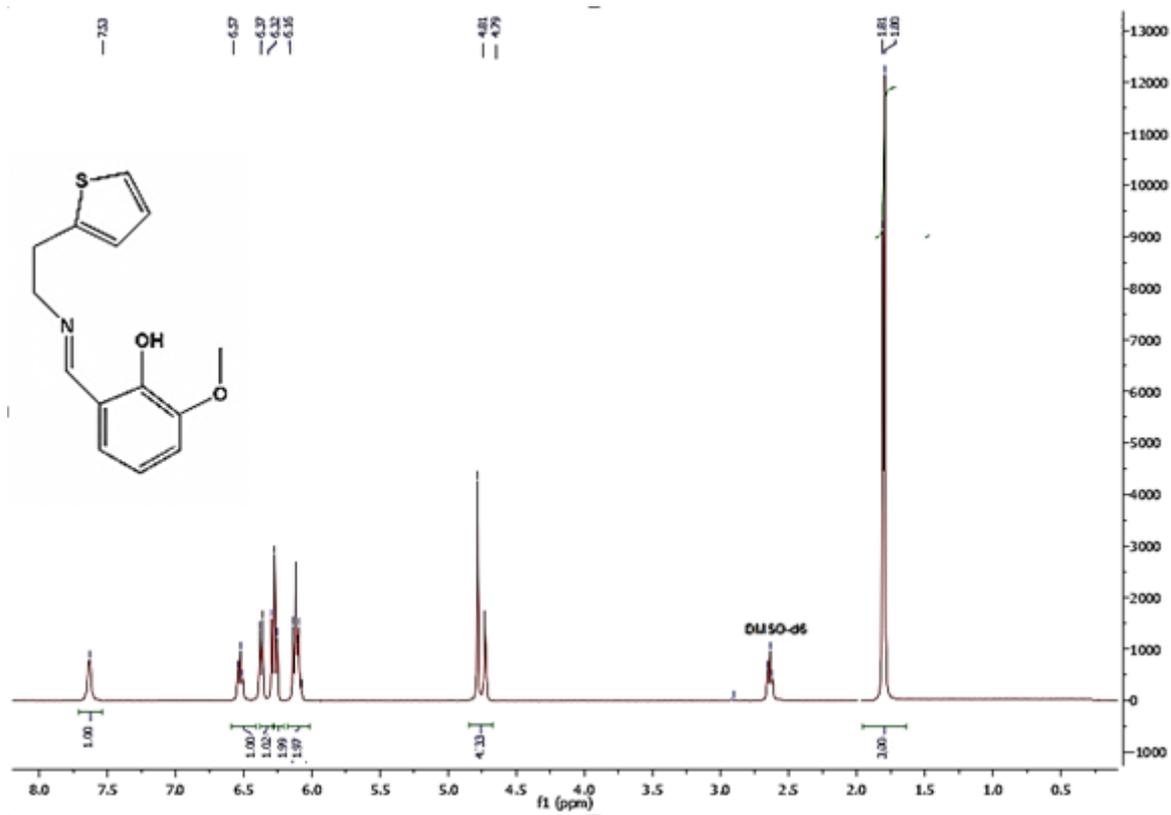
Figura 104: Espectro RMN ^1H ligante L6.

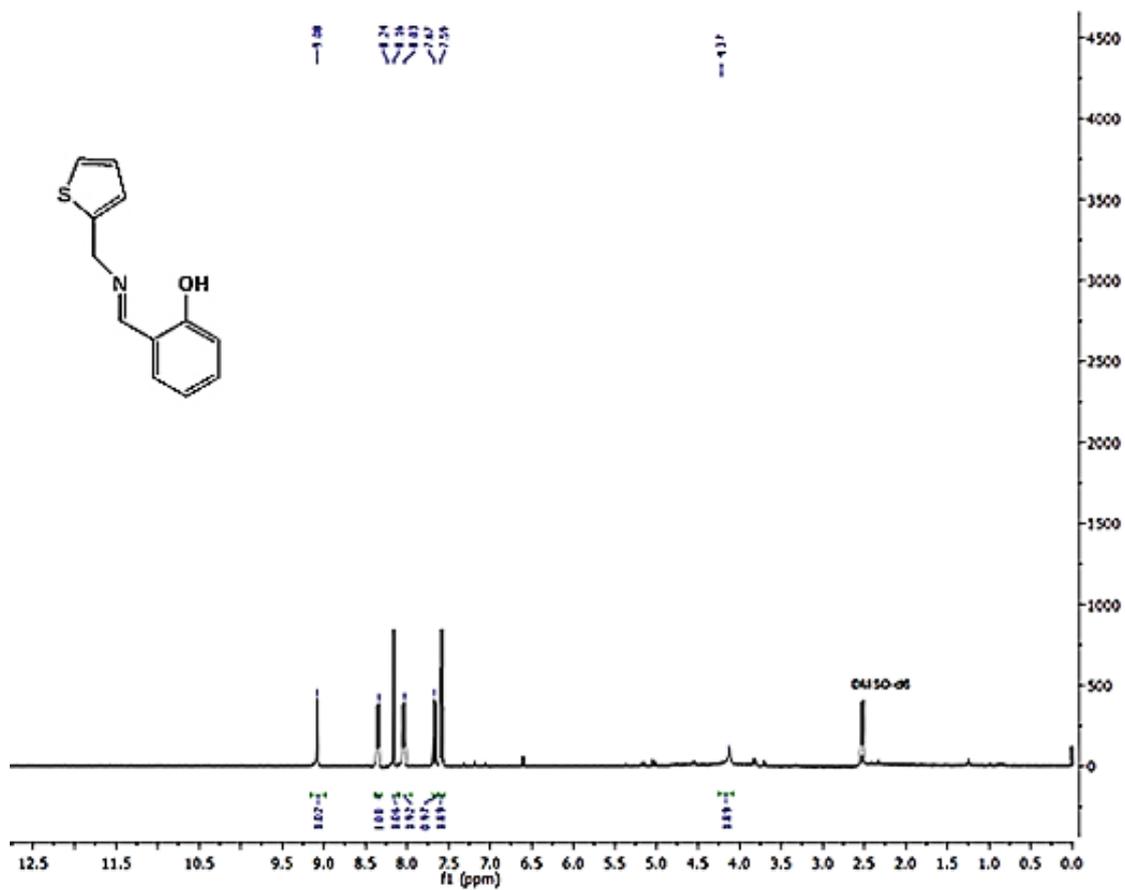
Figura 105: Espectro RMN ^1H ligante L7.

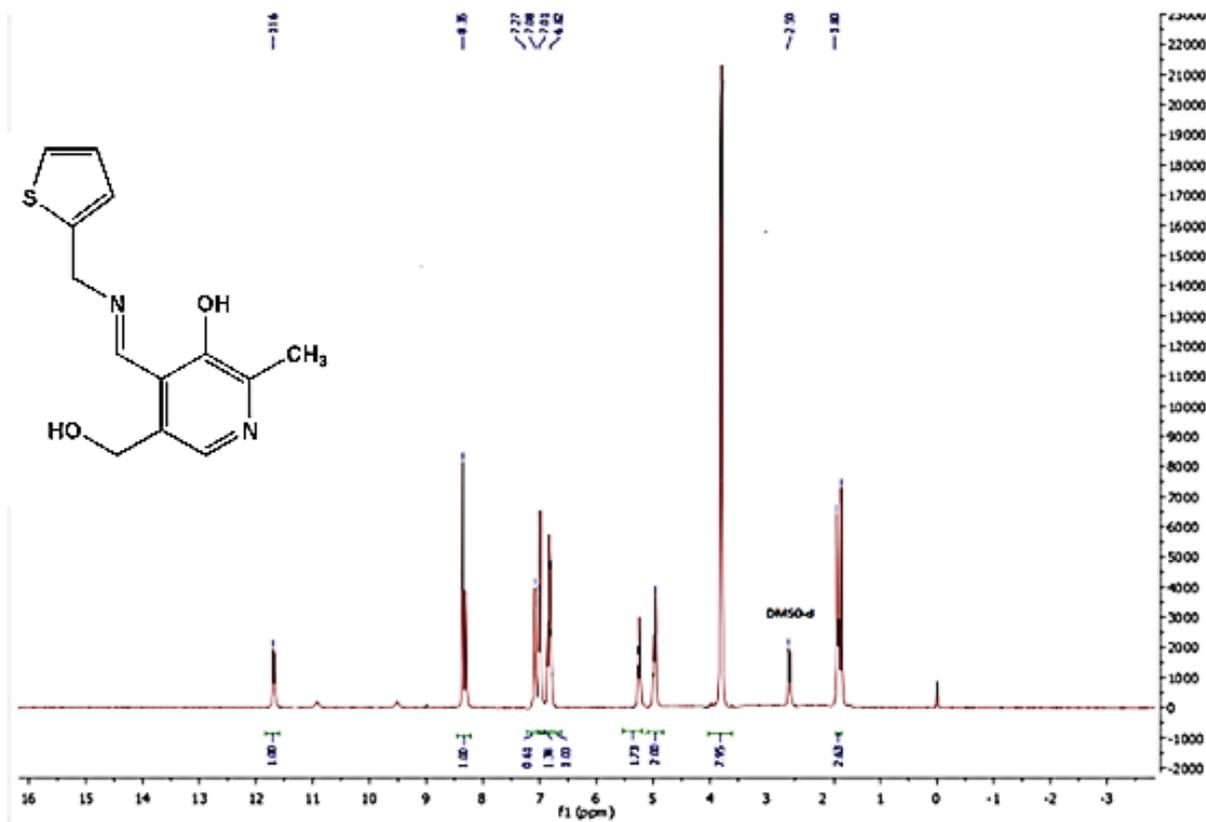
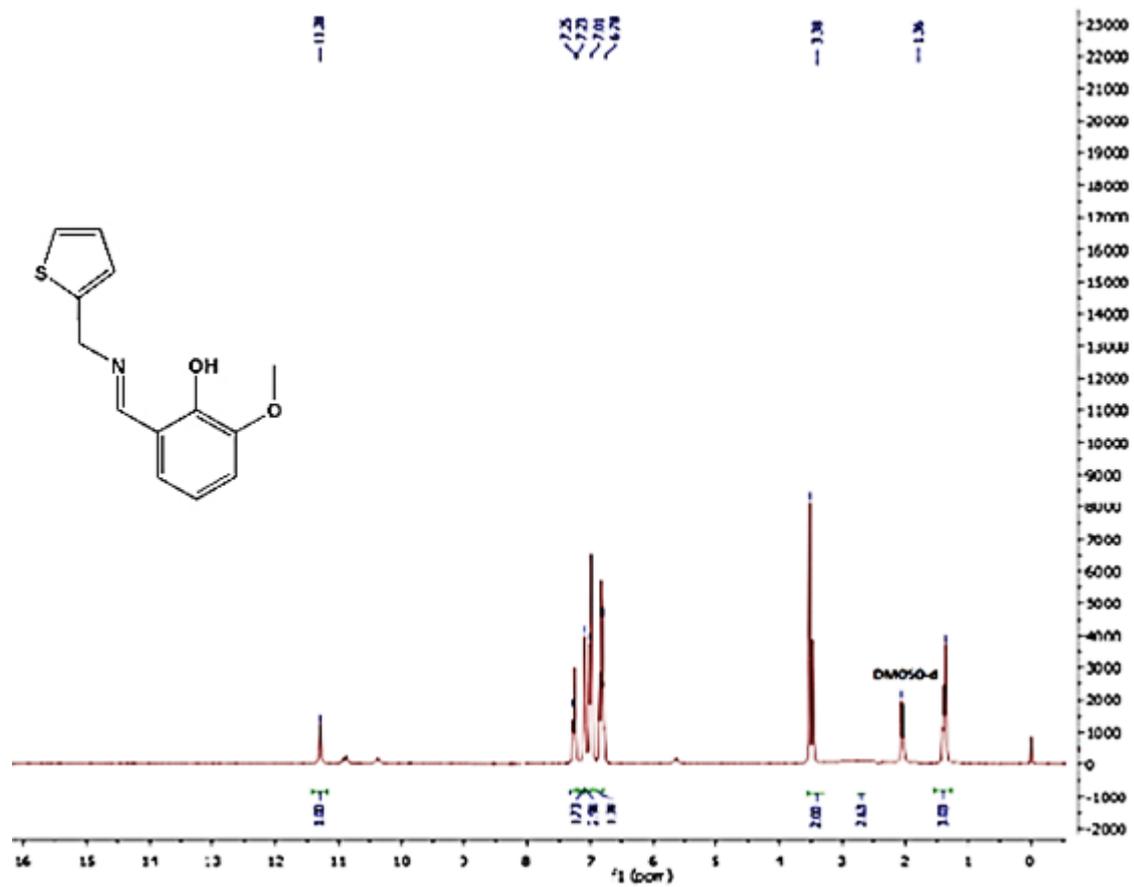
Figura 106: Espectro RMN ^1H ligante L8.

Figura 107: Espectro RMN ^1H ligante L9.

7.6 Parametros Cristalográficos

Tabela 19: Parâmetros cristalográficos dos complexos C1, C2 e C3.

Parâmetros / Complexo	C1	C2	C3
Fórmula empírica	C ₂₄ H ₂₀ CuN ₂ O ₄	C ₂₆ H ₂₈ N ₄ O ₁₀ Cl ₂ Cu	C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₂ S ₂ Cu
Massa molecular (g.mol ⁻¹)	465,74	690,96	524,13
Temperatura (K)	100(2)	293(2)	110(2)
Radiação, λ (Å)	0,71073	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	Triclínico	Ortorrômbico	Triclínico
Grupo espacial	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>Pnna</i>	<i>P</i> $\bar{1}$
<i>a</i> (Å)	5,2976(2)	15,4106 (6)	8,7513(15)
<i>b</i> (Å)	9,7839(4)	14,2649 (7)	11,1557(19)
<i>c</i> (Å)	10,0899(5)	13,3267 (5)	12,137(2)
α (°)	103,0870(10)	90	103,297 (5)
β (°)	96,0160(10)	90	93,710 (5)
γ (°)	100,2540(10)	90	90,125 (5)
Volume (Å ³)	495,47 (4)	2929,6(2)	1150,5(3)
<i>Z</i>	2	4	2
$\rho_{\text{calc.}}$ (g.cm ⁻³)	1,555	1,567	1,158
Coef. de absorção linear (nm ⁻¹)	1,138	0,991	1,158
<i>F</i> (000)	239	1420	542
Tamanho do cristal (mm)	0,28 x 0,12 x 0,05	0,21 x 0,27 x 0,29	0,40 x 0,39 x 0,21
Região de varredura angular θ (°)	4,10 a 30,48	2,47 a 28,33	2,24 a 33,08
Região de varredura dos índices	-7 ≤ <i>h</i> ≤ 7, -13 ≤ <i>k</i> ≤ 13, -14 ≤ <i>l</i> ≤ 14	-20 ≤ <i>h</i> ≤ 20, -18 ≤ <i>k</i> ≤ 18, -17 ≤ <i>l</i> ≤ 16	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 13, -16 ≤ <i>k</i> ≤ 17, -15 ≤ <i>l</i> ≤ 17
Número de reflexões coletadas	13645	14145	17095
Número de reflexões independentes	2999	3519	7634
Integralidade da medida	99,6%	99,6%	99,8%
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes
$T_{\text{min}} / T_{\text{máx}}$	0,9453/0,7412	0,8331/0,6276	0,7930/0,6544
Dados/restrições/parâmetros	2999 / 0 / 142	3519 / 0 / 196	7634 / 0 / 301
Goodness-of-fit em <i>F</i> ²	1,071	1,030	1,099
Índice <i>R</i> _{int}	0,0191	0,0300	0,0628
<i>R</i> ₁ [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0,0224	0,0334	0,1734
<i>wR</i> ₂ [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0,0599	0,0810	0,4496
<i>R</i> ₁ (todos os dados)*	0,0236	0,0484	0,1926
<i>wR</i> ₂ (todos os dados)*	0,0606	0,0881	0,4597
ρ_{max} (e ⁻ Å ⁻³)/ ρ_{min} (e ⁻ Å ⁻³)	0,453/ -0,353	0,396/ -0,398	6,234/ -3,776

Tabela 20: Parâmetros cristalográficos dos complexos C4, C5 e C6.

Parâmetros / Complexo	C4	C5	C6
Fórmula empírica	$C_{28}H_{32}Cl_2CuN_4O_4S_2$	$C_{26}H_{24}N_2O_6Cu$	$C_{28}H_{28}N_2O_4S_2Cu$
Massa molecular (g.mol ⁻¹)	687,14	524,01	584,18
Temperatura (K)	293(2)	110(2)	110(2)
Radiação, λ (Å)	0,71073	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Ortorrômbico
Grupo espacial	$P2_1/c$	$P2_1/c$	$Pbca$
a (Å)	12,1780(5)	12,0451 (4)	19,1106(11)
b (Å)	8,89714	10,3411 (3)	6,0512(3)
c (Å)	14,1741(6)	9,5411 (3)	22,4801(12)
α (°)	90	90	90
β (°)	100,0830(10)	105,7650 (10)	90
γ (°)	90	90	90
Volume (Å ³)	1512,03 (11)	1143,73(6)	2599,6(2)
Z	2	2	4
$\rho_{calc.}$ (g.cm ⁻³)	1,509	1,522	1,493
Coef. de absorção linear (nm ⁻¹)	1,078	1,002	1,039
$F(000)$	710	542	1212
Tamanho do cristal (mm)	0,13 x 0,26 x 0,39	0,35 x 0,31 x 0,18	0,35 x 0,31 x 0,18
Região de varredura angular θ (°)	2,43 a 27,15	2,64 a 29,60	2,80 a 29,20
Região de varredura dos índices	$-15 \leq h \leq 15, -11 \leq k \leq 11, -18 \leq l \leq 18$	$-16 \leq h \leq 16, -14 \leq k \leq 11, -11 \leq l \leq 13$	$-26 \leq h \leq 24, -8 \leq k \leq 8, -30 \leq l \leq 30$
Número de reflexões coletadas	19283	11669	32585
Número de reflexões independentes	3338	3211	3506
Integralidade da medida	99,8%	99,7%	99,7%
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes
$T_{min} / T_{máx}$	0,9361/0,6332	0,821/0,7756	0,9211/0,8874
Dados/restrições/parâmetros	3338 / 0 / 187	3211 / 0 / 160	3506 / 0 / 169
Goodness-of-fit em F^2	1,117	1,052	1,206
Índice R_{int}	0,0203	0,0240	0,0334
$R_1 [I > 2\sigma(I)]$	0,0723	0,0288	0,0481
$wR_2 [I > 2\sigma(I)]$	0,2208	0,0711	0,1133
R_1 (todos os dados)*	0,0766	0,0388	0,0556
wR_2 (todos os dados)*	0,2269	0,0746	0,1171
ρ_{max} (e ⁻ Å ⁻³) / ρ_{min} (e ⁻ Å ⁻³)	3,727 / -1,269	0,401 / -0,368	0,698 / -0,764

Tabela 21: Parâmetros cristalográficos dos complexos C7, C8 e C9.

Parâmetros / Complexo	C7	C8	C9
Fórmula Empírica	C ₈₃ H ₈₇ Cl ₂ Cu ₇ N ₁₂ O ₂₆	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₂ Cu	C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₆ S ₂ Cu
Massa molecular(g.mol ⁻¹)	2184,33	414,03	622,20
Temperatura (K)	100(2)	100(2)	100(2)
Radiação, λ (Å)	0,71073	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>C</i> 2/ <i>c</i>
<i>a</i> (Å)	11,000(4)	9,5953 (4)	21,8345 (8)
<i>b</i> (Å)	15,235(4)	6,2265 (2)	8,0544(3)
<i>c</i> (Å)	27,484(7)	17,7017 (7)	17,8965(6)
α (°)	89,224(7)	90	90
β (°)	83,570(9)	95,227(2)	115,8610 (10)
γ (°)	72,293(11)	90	90
Volume (Å ³)	4359 (2)	1053,19(7)	2832,15(18)
<i>Z</i>	2	2	4
$\rho_{\text{calc.}}$ (g.cm ⁻³)	1,664	1,567	1,459
Coef. de absorção linear (nm ⁻¹)	1,822	1,245	0,965
<i>F</i> (000)	2228	430	1292
Tamanho do cristal (mm)	0,28 x 0,27 x 0,19	0,26 x 0,23 x 0,18	0,25 x 0,17 x 0,15
Região de varredura angular θ (°)	2,23 a 28,31	2,31 a 28,72	2,47 a 29,69
Região de varredura dos índices	-11 $\leq h \leq$ 14, -19 $\leq k \leq$ 20, -36 $\leq l \leq$ 36	-12 $\leq h \leq$ 12, -8 $\leq k \leq$ 8, -23 $\leq l \leq$ 23	-30 $\leq h \leq$ 30, -9 $\leq k \leq$ 11, -24 $\leq l \leq$ 22
Número de reflexões coletadas	62861	12366	17200
Número de reflexões independentes	21436	2731	3995
Integralidade da medida	99,7%	99,8%	99,5%
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes
<i>T</i> _{min} / <i>T</i> _{máx}	0,8755 / 0,8239	0,8051 / 0,7402	0,8687/0,7944
Dados/restrições/parâmetros	21436 / 0 / 1174	2731 / 0 / 142	3995 / 1 / 180
Goodness-of-fit em <i>F</i> ²	1,055	2,717	1,009
Índice <i>R</i> _{int}	0,0317	0,0262	0,0259
<i>R</i> ₁ [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	0,0575	0,0863	0,0398
<i>wR</i> ₂ [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	0,1627	0,3131	0,1144
<i>R</i> ₁ (todos os dados)*	0,0750	0,1013	0,0489
<i>wR</i> ₂ (todos os dados)*	0,1724	0,3241	0,1258
ρ_{max} (e ⁻ Å ⁻³) / ρ_{min} (e ⁻ Å ⁻³)	3,303/ -1,337	1,198/ -2,355	0,909/ -1,169

Tabela 22: Parâmetros cristalográficos do complexo C10.

Parâmetros / Complexo	C10
Fórmula Empírica	$C_{26}H_{24}CuN_2O_4S_2$
M M (g.mol ⁻¹)	556,13
Temperatura (K)	120(2)
Radiação, λ (Å)	0,71073
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	$P\bar{1}$
a (Å)	5,1997(18)
b (Å)	10,474(3)
c (Å)	11,099(4)
α (°)	99,676(13)
β (°)	91,067(18)
γ (°)	102,816(13)
Volume (Å ³)	580,0 (3)
Z	1
$\rho_{\text{calc.}}$ (g.cm ⁻³)	1,592
Coef. de absorção linear (nm ⁻¹)	1,160
$F(000)$	287
Tamanho do cristal (mm)	0,44 x 0,19 x 0,18
Região de varredura angular θ (°)	2,50 a 29,16
Região de varredura dos índices	$-7 \leq h \leq 7, -14 \leq k \leq 14, -15 \leq l \leq 15$
Número de reflexões coletadas	10994
Número de reflexões independentes	3075
Integralidade da medida	99,7%
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes
$T_{\text{min}} / T_{\text{máx}}$	0,8184/0,6294
Dados/restrições/parâmetros	3075 / 0 / 160
Goodness-of-fit em F^2	1,109
Índice R_{int}	0,0190
$R_1 [I > 2\sigma(I)]$	0,0388
$wR_2 [I > 2\sigma(I)]$	0,1247
R_1 (todos os dados)*	0,0402
wR_2 (todos os dados)*	0,1307
ρ_{max} (e ⁻ Å ⁻³) / ρ_{min} (e ⁻ Å ⁻³)	1,489/ -0,964

Capítulo 8. Referências

8. Referências

1. Ji L.; *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **1999**, v.222, p.283-92.
2. Batista, C.F., Blagitz, M.G., Bertagnon, H.G., Gomes, R.C., Santos, K.R., Della Libera, *Journal of Dairy Science*, **2015** v.98, p.8882–8888.
3. Brenner, D.; Dostert, C.; Franchina, D. G.; *Trends in Immunology*. **2018**, v. 39, p. 489-502.
4. Troyanova, N. I.; Shevchenko, M. A.; Boyko, A. A.; Mirzoev, P. P.; Pertseva, M. A.; Kovalenko, E. I.; Sapozhnikov, A. M.; *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **2015**, v.41, p.305-315.
5. Miranda-Díaz, A. G.; Pazarín-Villaseñor, L.; Yanowsky-Escatell, F. G.; Andrade-Sierra, J.; *Journal of Diabetes Research*, **2016**, p.1–7.
6. Jianga, T.; Suna, Q.; Chen, S.; *Progress in Neurobiology*, **2016**, v. 147, p. 1-19.
7. Zhao, Y., Zhao, B., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2013**, v. 2013 p. 1-10.
8. Hamid, A. A.; Aiyelaagbe, O. O.; Usman, L. A.; Ameen, O. M.; Lawal, A.; *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, **2010**, v.4, p. 142-151.
9. Ishigami N.; Isoda K.; Adachi T. J.; *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, **2011**, v.18 p.1009–1017.
10. Glorieux, C.; Calderon, P.B.; *The Journal of Biological Chemistry*, **2017**, v. 26, p.1095–1108.
11. Chirra, H. D.; Sexton, T.; Biswal, D.; Hersh, L. B.; Hilt, J. Z.; *Acta Biomaterialia*, **2011**, v. 7, p. 2865–2872.
12. Tsangaris, C.; Papathanasiou, E.; Cotou, E.; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2007**, V.66, p.232–243.
13. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. *Chemical-Biological Interactions*, **2006**, v.160 p.1-40.
14. Sharif, S.; Schagen, D.; Toney, M.D.; Limbach, H. H.; J.; *Journal of the American Chemical Society*, **2007**, v. 129, p. 4440.
15. Tainer, J. A.; Getzoff, E. D.; Beem, K. M.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C.; *Journal of Molecular Biology*, **1982**, v.160, p.181-217.
16. Dahlgren, C.; Karlsson, A. *Journal of Immunological Methods*, **1999**, v. 232(1-2) p. 3-14.

17. Jubeh, T. T.; Nadler-Milbauer, M.; Barenholz, Y.; Rubinstein, A. *Journal of Drug Targeting*, **2006**, v. 14(3), p. 155–163.
18. Corma, A.; Iborra, S.; Velty, A.; *Chemical Reviews*, **2007**, v.107, p.2411.
19. Mosmann, T.; *Journal Of Immunological Methods*, **1983**, v. 65(1–2), p. 55–63. 1983.
20. Neves, A.; Schenk, G.; Mitic, N.; Guddat, L. W.; Gahan, L. R.; Smith, S. J.; *Chemical Reviews*, **2006**, v. 106, p. 3338-3363.
21. Cozzi, P. G.; *Chemical Society Reviews*, **2004**, v. 33, p. 410-421.
22. Gupta, K. C.; Sutar, A. K.; *Coordination Chemistry Review*, **2008**, v. 252, p. 1420-1450.
23. Garnovski, A. D.; Nivorozhkin, A. L.; Minkii, V. I.; *Coordination Chemistry Reviews*, **1993**, v. 126, p. 1-69.
24. Robin, A.Y.; *Coordination Chemistry Reviews*, **2006**, v.250, p.2127-2157.
25. Filho, R. F. G. P. B.; **Síntese, capacidade antioxidante e estudo comparativo entre fenilhidrazonas e chalconas como derivados do paracetamol**, Pará: Universidade Federal do Pará, 2014. Dissertação de mestrado.
26. Kose, M.; *Journal of Coordination Chemistry*, **2014**, v. 67, p. 2377–2392.
27. Shukla, S.; Srivastava, R.S.; Srivastava, S.K.; Sodhi, A.; Kumar, P.; *Medicinal Chemistry Research*, **2013**, v.22, p.1604–1617.
28. Thorat, B. R.; Shaikh, S. A.; Atram, R. G.; Yamgar, R. S.; *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, **2012-2013**, v. 1, p. 80-90.
29. Bhat, K.; Chang, K. J.; Aggarwal, M. D.; Wang, W. S.; Penn, B. G.; Frazier, Mater, D. O. *Materials Chemistry and Physics*, **1996**, v. 44, p.261-266.
30. Corma, A.; Iborra, S.; Velty, A.; *Chemical Reviews*, **2007**, v.107, p.2411.
31. Mandal, S.; Rout, A. K.; Ghosh A.; Pilet, G.; Bandyopadhyay, D.; *Polyhedron*, **2009**, v. 28; p. 3858-3862.
32. Barwiolek, M.; Babinska, M.; Kozakiewicz, A.; Wojtczak, A.; Kaczmarek-Kedziera, A.; Szlyk, E.; *Polyhedron*, **2017**, v. 124, p. 12-21.
33. Wang, L.; Zhou, Y.; Dai, J.; Jiang, S.; Lu, Y.; Sun, M.; Gong, J.; Huang, P.; Yao, Y. *Materials Science and Engineering: C*. **2018**, v. 88, p. 157-165.
34. Patrick, D. A.; Wenzler, T.; Yang, S.; Weiser, P. T.; Wang, M. Z.; Brun, R.; Tidwell, R. R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2016**, v. 24, p. 2451-2465.

35. Casas, J.S.; Couce, D.; Sordo, J.; *Chemical Reviews*, **2012**, v. 256, p. 3036-3062.
36. Metzler, E.E. Snell, *Journal American Chemistry Society*, **1954**, v. 74, p. 979.
37. Ratnam, D. V.; Ankola, D. D.; Bhardwa, J. V.; Sahana, D. K.; Kumar, M. N. V. R. *Journal of Controlled Release*, **2006**, v. 113, p. 189-207.
38. Sharif, S.; Schagen, D.; Toney, M.D.; Limbach, H. H.; J.; *Journal of the American Chemical Society*, **2007**, v. 129, p. 4440.
39. Xue, F.; Xiao, X.; Wang, H.; Shi, Y.; *Tetrahedron*, **2012**, v. 68, p. 6862-6867.
40. c
41. L. Yang, D.R. Powell, R.P. Houser, *Dalton Transactions*, **2007**, p. 955.
42. Pisk, J.; Prugovečki, B.; Jednačak, T.; Novak, P.; Vrdoljak, V.; *Polyhedron*, **2017**, v.127, p.337–344.
43. Pathak, C.S.; Agarwala, V.; Mandal, M.K. *Physica B: Condensed Matter*, **2012**, v. 407, p. 3309-3312.
44. Manikandan, R.; Vijayan, P.; Anitha, P.; Prakash, G.; Viswanathamurthi, P.; Butcher, R. J.; Nandhakumar, R.; *Inorganica Chimica Acta*, **2014**, v. 421, p. 80–90.
45. Turrens, J. F., *Superoxide Dismutase and Catalase; Comprehensive Toxicology*, **2010**, v.4, p.219.
46. Thannickal, V. J.; Fanburg, B. L.; *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **2000**, v.279, p.1005-1028.
47. Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S.; *Revista da Associação Médica Brasileira*, **1997**, v.43, p.61-68.
48. Miller, A. *FEBS Letters*, **2012**, v. 586, p. 585-595.
49. Borgstahl, G. E. O.; Parge, H. E.; Hickey, M. J.; Beyer, W. F.; Hallewell, R. A.; Tainer, J. A.; *Cell*, **1992**, v.71, p.107-118.
50. Tainer, J. A.; Getzoff, E. D.; Beem, K. M.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C.; *Journal of Molecular Biology*, **1982**, v.160, p.181-217.
51. Dahlgren, C.; Karlsson, A. *Journal of Immunological Methods*, **1999**, v. 232(1-2) p. 3-14.
52. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. *Chemical-Biological Interactions*, **2006**, v.160 p.1-40.

53. Valentine, J. S.; Doucette, P. A.; Potter, S. Z.; *Annual Review of Biochemistry*, **2005**, v.74, p.563-593.
54. Tainer, J. A.; Getzoff, E. D.; Beem, K. M.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C.; *Journal of Molecular Biology*, **1982**, v.160, p.181-217.
55. Wang, M.; Vasas, V.; Chittka, L.; Yen, S.; *Animal Behaviour*, **2007**, v. 127, p. 219-224.
56.
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/superoxidedismutasefrombovineerythrocytes12345905489111?lang=pt®ion=BR>, acesso em: 17/11/2018.
57. Zhang, X. M., Tang, J., Wang, L. N., Yao, D., Yu, Q., Huang, F. P., Bian, H.-D.; *Polyhedron*, **2017**, v.133, p.433–440.
58. Liu, Z.; Robinson, G. B.; Gregory, E. M.; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1994**, v.315, p.74–81.
59. Singh, Y. P., Patel, R. N., Singh, Y., Butcher, R. J., Vishakarma, P. K., & Singh, R. K. B. *Polyhedron*, **2017**, v.122, p.1–15.
60. Patel, R. N.; Singh, N.; Shukla, K. K.; Chauhan, U. K.; Chakraborty, S.; Niclos-Gutierrez, J.; Castineiras, A.; *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2004**, v.98 .p. 231.
61. Patel, R. N.; *Inorganica Chimica Acta*, **2010**, v.363, p. 3838.
62. Chakraborty, P.; Adhikary, J.; Ghosh, B.; Sanyal, R.; Chattopadhyay, S. K.; Bauzá, A.; Frontera, A.; Zangrando, E.; Das, D.; *Inorganic Chemistry*, **2014**, v.53, p. 8257.
63. Gajewska, M.J.; Ching, W.-M.; Wen, Y.-S.; Hung, C.-H.; *Dalton Transactions*, **2014**, v.43, p. 14726.
64. Lay, E.; Song, Y.-H.; Chiu, Y.-C.; Lin, Y.-M.; Chi, Y.; Carty, A. J.; Peng, S.-M.; Lee, G.-H.; *Inorganic Chemistry*, **2005**, v.44, p. 7226.
65. Laliakantouri, M.; Hatzidimitriou, A.G.; Williams, D.; Anorg, Z.; *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, **2009**, v.635, p. 2495.
66. Borges, L. J. H.; Bull, E. S.; Fernandes, C.; Júnior, A. H.; Azeredo, N. F.; Resende, J. A. L. C.; Freitas, W. R.; Carvalho, E. C. Q.; Lemos, L. S.; Jerdyd, h.; Kanashiroa, M. M.; *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, v. 123, p. 128-140.

67. Lopes, L. Q. S.; Ramos, A. P.; Copetti, P. M.; Acunha, T. V.; Iglesias, B. A.; Santos, R. C. V.; Machado, A. K.; Sagrillo, M. R.; *Microbial Pathogenesis*, **2019**, v. 128, p. 47-54.
68. Polloni, L.; Silva, A. C. S.; Teixeira, S. C.; Azevedo, F. V. P. V.; Zóia, M. A. P.; Lima, P. M. A. P.; Correia, L. I. V.; Almeida, J. C.; Silva, C. V.; Ávila, V. M. R.; Goulart, L. R. F.; Morelli, S.; Guerra, W.; Júnior, R. J. O. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2019**, v. 112, p. 108586.
69. Wang, Y.; Lee, J.; Ding, H. *Nitric Oxide*, **2019**, v. 89, p. 96-103.
70. G. M. Sheldrick, SHELXTL Version 2014/7. <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/index.php>.
71. ORTEP for Windows version 1.08 – L.J. Farrugi, **1997**, J. Appl. Cryst. 30, 565.
72. Branderburg, K.; Berndt, M.; *Journal of Applied Crystallography*, **1999**, v. 32, p. 1028-1029.
73. Wilms, L. C.; Hollman, P. C. H.; Boots, A. W.; Kleinjans, J. C. S. *Mutation Research*, **2005**, v.582, n.1-2, p.155-162.
74. Mosmann, T. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, v. 65, v. 1–2, p. 55–63.
75. Denizot, F.; Lang, R. *Journal of Immunological Methods*, **1986**, v. 89, p. 271-277.
76. Labarca, C.; Paigen, K. *Analytical Biochemistry*, **1980**, v.102, p.344.
77. Esposti, M. D. *Methods*, **2002**, v. 26, p. 335-340.
78. Hann, T. *International Tables for Crystallography Vol. A*, D. Reidel publishing, Dordrecht, Países Baixos, **1987**.
79. Li, P.; Xu, Y.; Deng, W.; Yao, Z.; *Journal of Organometallic Chemistry*, **2019**, v. 884, p. 36-43.
80. Das, D.; Guha, A.; Das, S.; Chakraborty, P.; Mondal, T. P.; Goswami, S.; Zangrando, E.; *Inorganic Chemistry Communications*, **2012**, v. 23, p.113–116.
81. Pereira, M. B.; Fontana, L. A.; Siqueira, J. D.; Auras, B. L.; da Silva, M. P.; Neves, A.; Gabriel, P.; Terenzi, H.; Iglesias, B. A.; Back, D. F.; *Inorganica Chimica Acta*, **2018**, v. 469, p. 561-575.
82. Özdemir, Ö. Ü.; Aktan, E.; Ilbiz, F. Gündüzalp, B. A.; Özbek, N.; Sari, M.; Çelik, Ö.; Saydam, S. *Inorganica Chimica Acta*, **2014**, v. 423, p. 194-203.
83. Paixão, A. D.; Marzano, M. I.; Jaimes, E. H. L.; Pivatto, M.; Campos, D.L.; Pavan, F. R.; Deflon, V. M.; Maia, P. I. S.; Ferreira, A. M. C.; Uehara, I. A.; Silva, M. J.B.;

- Botelho, F. V.; Pereira-Maia, E. C.; Guilardi, S.; Guerra, W. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2017**, v. 172, p. 138-146.
84. Bhunia, A.; Mistria, S.; Manneb, R. K.; Santrab, M. K.; Mannaa, S. C.; *Inorganica Chimica Acta*, **2019**, v. 491, p. 25-33.
85. Manna, S. N.; Paul, A.; Zangrando, E.; Figuerola, A.; *Journal of Solid State Chemistry*, **2019**, v. 271, p. 378-385.
86. Rajasekhar, B.; Hijaz, P. K. M.; Swu, T. *Journal of Molecular Structure*, **2018**, v.1168, p.212-222.
87. Hosseini-Yazdi, S. A.; Mirzaahmadi, A.; Khandar, A. A.; Eigner, V.; Dušek, M.; Lotfipour, F.; Mahdavi, M.; Soltani, S.; Dehghan, G. *Inorganica Chimica Acta*, **2017**, v.458, p.171–180.
88. Nishio, M.; Hirota, M.; Umezawa, Y. *Evidence, Nature and Consequences*; **1998**, Wiley-VCH: New York.
89. Buta, I.; Cseh, L.; Cretu, C.; Aparaschivei, D.; Maxim, C.; Lönnecke, P.; Hey-Hawkins, E.; Stanica, N.; Ohler, E.; Rentschler, E.; Andruh, M.; Costisor, O. *Inorganica Chimica Acta*, **2018**, v.475, p.133–141.
90. Barfeie, H.; Grivani, G.; Eigner, V.; Dusek, M.; Khalaji, A. D.; *Polyhedron*, **2018**, v.146, p.19–25.
91. Cross, E. D.; Ang, M. T. C.; Richards, D. D.; Clemens, C. C.; Muthukumar, H.; McDonald, R.; Woodfolk, L.; Ckless, K.; Bierenstiel, M.; *Inorganica Chimica Acta*, **2018**, v. 481, p. 69-78.
92. Pratihari, J. L.; Mandal, P.; Brandão, P.; Mal, D.; Felix, V.; *Inorganica Chimica Acta*, **2018**, v. 479, p. 221-228.
93. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B, Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*. Nova Iorque: Jhon Wiley & Sons, **2009**.
94. Lopes, W. A.; Fascio, M. *Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho*. *Química Nova*, **2004**, n.4, p. 670-673.
95. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC: **2007**.

96. Souza, A. E.; Echevarria, A.; Sant'anna, C. M. R.; Nascimento, M. G. Estudo experimental e teórico da redução de bases de Schiff derivadas da 3,3-difenilpropilamina. *Química Nova*, n. 1, p. 72-75, **2004**.
97. Piacham, T.; Na Ayudhya, C. I.; Prachayasittikul, V.; Bülow, L.; Ye, L. *Chemical Communications*, **2003**, p.1254-1255.
98. Sala, O.; *Química Nova*, **2008**, v. 31, p. 914-920.
99. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B, Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*. Nova Iorque: Jhon Wiley & Sons, **2009**.
100. El-Maghrabey, M. H.; Watanabe, R.; Kishikawa, N.; Kuroda, N.; *Analytica Chimica Acta*, **2019**, v.1057, p. 123-131.
101. Misra, G. *Fluorescence spectroscopy*; **2019**, p. 31–37.
102. Faria, D. L. A.; Afonso, M. C.; Edwards, H. G. M. *Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia*, **2002**, v. 12, p. 249-267.
103. Bielski, B. H. J.; Cabelli, D. E.; Arudi, R. L.; Ross, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **1985**, v.14, p.1041-1100.
104. Bielski, B. H. J.; Shiue, G. G.; Bajuk, S. *The Journal of Physical Chemistry*, **1980**, v.84, 830-833.
105. Ilhana, S.; Baykara, H.; Seyitoglu, M. S.; Levent, A.; Özdemir, S.; Dündar, A.; Öztomsuk, A.; Cornejo, M. H. *Journal of Molecular Structure*, **2014**, v.1075, p. 32.
106. Romanhole, R. C.; Ataide, J. A.; Cefali, L. C.; Moriel, P.; Mazzola, P. G.; *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, **2016**, v. 162, p. 45-49.
107. Junior, J. S. A.; Isolamento e análise de danos genômicos de células-tronco da polpa dentária de cães; Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, **2013**.
108. Sauer, H.; Wefer, K.; Vetrugno, V.; Pocchiari, M.; Gissel, C.; Sachinidis, A.; Hescheler, J.; Wartenberg, M. *Free Radical Biology & Medicine*. **2003**, v.35, p. 586 – 594.
109. Polloni, L.; Silva, A. C. S.; Teixeira, S. C.; Azevedo, F. V. P. V.; Zóia, M. A. P.; Silva, M. S.; Lima, P. M. A. P.; Correia, L. I. V.; Almeida, J. C.; Silva, C. V.; Ávila, V. M. R.; Goulart, L. R. F.; Morelli, S.; Guerra, W.; Júnior, R. J. O.; *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2019**, v. 112, p.108586.

110. Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glogowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R.; *Analytical Biochemistry*, **1982**, v.126, p.131–138.
111. Rout, K. C.; Chaturvedi, S. K.; Khan, R. H.; Mondal, B.; *Inorganica Chimica Acta*, **2015**, v. 437, p. 201-206.