

PATRÍCIA SALVADOR TESSARO

**COMPLEXOS BIOINSPIRADOS DE ZINCO CONTENDO GRUPAMENTOS
INDÓLICOS COMO POTENCIAIS SONDAS FLUORESCENTES DE ÁCIDOS
NUCLEICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Química Aplicada, da Universidade do Estado de Santa Catarina, com requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Roberto Xavier

**JOINVILLE, SC
2018**

SALVADOR TESSARO, PATRÍCIA

COMPLEXOS BIOINSPIRADOS DE ZINCO CONTENDO
GRUPAMENTOS INDÓLICOS COMO POTENCIAIS SONDAS
FLUORESCENTES DE ÁCIDOS NUCLEICOS / PATRÍCIA
SALVADOR TESSARO. - Joinville , 2018.

152 p.

Orientador: FERNANDO ROBERTO XAVIER

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Tecnológicas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Joinville, 2018.

1. Sondas Fluorescentes. 2. DNA. 3. Complexos
metálicos. 4. Bioinorgânica. I. ROBERTO XAVIER,
FERNANDO. II. Universidade do Estado de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação. III. Título.

**Complexos Bioinspirados de Zinco Contendo Grupamentos Indólicos
como Potenciais Sondas Fluorescentes de Ácidos Nucleicos**

por

Patrícia Salvador Tessaro

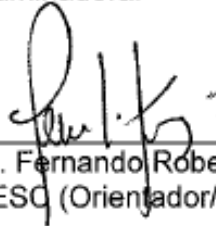
Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de

MESTRA EM QUÍMICA APLICADA


Área de concentração em "Química"
e aprovada em sua forma final pelo

**CURSO DE MESTRADO ACADÊMICO EM QUÍMICA APLICADA
DO CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS DA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA.**

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Fernando Roberto Xavier
CCT/UDESC (Orientador/Presidente)



Prof. Dr. Samuel Rodrigues Mendes
CCT/UDESC



Profa. Dra. Rosely Aparecida Peralta
UFSC

Joinville, SC, 04 de julho de 2018.

Dedico este trabalho aos meus amados pais Zelir e Reni, por estarem sempre do meu lado, incentivando e acreditando na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente aos meus pais Zelir e Reni que sempre me incentivaram ao estudo e me deram todo o apoio para que continuasse seguindo o meu sonho. Obrigada mãe por cada vez que pensava em desistir e a senhora dizia “calma, você vai conseguir”, me dando forças para tentar novamente.

Ao meu orientador, professor Fernando R. Xavier, obrigada pela dedicação e disponibilidade em me orientar durante todos esses dois anos de pesquisa. Obrigada também por toda a confiança depositada em mim, mesmo quando eu mesma duvidava do meu potencial.

Aos meus irmãos Eduardo, Leticia e Greice, pelo apoio emocional e compreensão neste percurso em que fui muito ausente.

A todos os meus amigos do Rio Grande do Sul que estavam juntos a mim nesta caminhada, que viveram momentos felizes e mais difíceis ao meu lado, ou que aceitaram a minha ausência em alguns diversos momentos.

Agradeço a professora Márcia M. Meier (DQ-UDESC) e a professora Tatiane Comiotto (DQ-UDESC) por me incentivarem a continuar a graduação, quando pensei em desistir. Se não fosse também pelo apoio de vocês, não estaria vencendo mais este obstáculo.

Agradeço a todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Síntese e Catálise (SINCA), pelas inúmeras risadas e o papel um fundamental nas horas mais complicadas. Muito obrigada por todos os momentos que compartilhamos, pelo companheirismo e amizade.

Agradeço ao meu namorado Gustavo Wander, pela força transmitida, pela paciência e pelo amor demonstrado em todo o caminho que já percorremos juntos. Obrigada por sempre acreditar na minha capacidade e me incentivar a sempre tentar.

Agradeço ao Felipe Wodtke e a Thayara Ceregatti por todos os momentos em que precisei de conselhos, desabafar, conversar e diversas vezes chorar. Não existem palavras para agradecer o que fizeram por mim.

Agradeço a Victória e a Natalia por todo o apoio, carinho, companhia, conselhos e “xingões” necessários.

Agradeço a Tailine (amiga, terapeuta, vizinha), Maria e Hariane que mesmo eu estando ocupada e nervosa com o final do mestrado, estavam sempre presentes para mostrar que conseguiria finalizar mais esta jornada.

Aos professores do departamento de química e da pós-graduação que transmitiram seus conhecimentos e auxiliaram em diversos momentos do desenvolvimento do trabalho.

Em especial agradeço o professor Samuel R. Mendes e o professor Rogério A. Gariani pela colaboração (síntese orgânica e estudos de RMN) presentes neste trabalho.

Ao professor Hernán F. Terenzi (CEBIME-UFSC) e sua aluna de doutorado Nathalia Castilho pelos estudos de fluorescência com DNA e análises de espectrometria de massas (ESI-MS).

Ao professor Bernardo de Souza e seu aluno de doutorado Giliandro Farias pelos estudos teóricos (DFT) e valorosas discussões envolvidas neste trabalho.

A professora Karine P. Naidek (DQ-UDESC) e o DQ-UFPR pelas análises de espectroscopia na região do infravermelho.

Ao professor Ademir Neves e professora Rosely A. Peralta do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia – LABINC (DQ-UFSC) por disponibilizar sua infraestrutura, reagentes e pessoal necessários para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Química e o Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Estadual do Estado de Santa Catarina, pelo acolhimento e oportunidade de formação tanto da graduação quando no mestrado.

Ao, CNPq, CAPES, FAPESC, FINEP, e demais órgãos de fomento pela disponibilidade da bolsa de estudos e por viabilizarem a execução deste trabalho de pesquisa.

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”. (Isaac Newton, 1676)

RESUMO

O estudo de sondas fluorescentes para DNA vem crescendo rapidamente devido à diversas aplicações como detecção de doenças, monitoramento em tratamentos médicos e desenvolvimento de quimioterápicos. Complexos metálicos contendo grupamentos com aromaticidade e deslocalização eletrônica podem ser uma alternativa para o desenvolvimento destas sondas, estando então inseridas em uma área denominada Química Bioinorgânica. Neste contexto, o presente estudo refere-se ao desenvolvimento de um ligante bioinspirado contendo grupamentos piridínicos e indólicos e seus complexos de zinco(2+), como potenciais sondas fluorescentes para ácidos nucleicos. Tal ligante foi caracterizado por técnicas espectroscópicas (espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectroscopia eletrônica) e de massa (espectrometria de massa com ionização por *electrospray*). Já os complexos, além das técnicas descritas acima, foram caracterizados via condutividade molar, espectroscopia de fluorescência molecular e análise elementar. Os espectros de infravermelho do ligante e dos complexos $[Zn(L^{C5})Cl_2] \cdot 2MeOH$ (**1**) e $[Zn(L^{C5})_2](ClO_4)_2$ (**2**) foram comparados e as principais bandas atribuídas. A presença das bandas do ligante nos espectros dos complexos indica que após a complexação, não ocorreram mudanças em sua estrutura. Os padrões de distribuição isotópica obtidos para os complexos através de espectrometria de massas estão de acordo com as respectivas composições químicas almejadas. Estudos abrangentes de ressonância magnética nuclear uni- e bidimensionais juntamente com cálculos de estrutura eletrônica (DFT) tornaram possíveis a proposição de um arranjo tridimensional para os complexos sintetizados onde o centro metálico em **1** está em um ambiente piramidal quadrado levemente distorcido, enquanto que em **2** o ambiente de coordenação do centro de zinco é octaédrico. Os espectros eletrônicos foram simulados via TD-DFT e a representação dos orbitais moleculares de fronteira foram geradas. De acordo com os dados obtidos todas as transições eletrônicas observadas estão centradas nos ligantes não apresentando componentes que envolvam orbitais dos centros metálicos. Uma vez caracterizados os complexos, testes para se determinar a magnitude de interação destes com amostras de DNA de salmão foram estudadas via espectroscopia eletrônica, nos quais constantes de ligação intrínseca (K_b) foram calculadas sendo $2,47 \times 10^4$ e $3,88 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para **1** e **2**, respectivamente. Após sucessivas adições de alíquotas de DNA os espectros de ambos os complexos apresentaram hipocromismo e um leve batocromismo que caracterizam que a interação complexo/DNA se dá por via intercalativa no sulco maior. Os resultados de fluorescência molecular demonstraram que o complexo **2** possui maior fluorescência que **1** quando livre de DNA. Quando estes são tratados com alíquotas deste ácido, sua fluorescência é aumentada, o que os classificam como sondas detectoras de DNA. Entretanto ao ser comparados com a sonda DAPI (fonte comercial) estes se mostraram de menor eficiência. Estudos de competição envolvendo os complexos sintetizados e agentes ligadores de sulco como verde de metila e netropsina foram efetuados e constatou-se que, de fato, os complexos se ligam pelo sulco maior do DNA. Por fim, testes com variação de força iônica (NaCl) foram realizados, indicando que a interação complexo/DNA é fracamente afetada por questões eletrostáticas.

Palavras-chave: Sondas Fluorescentes. DNA. Complexos metálicos. Bioinorgânica.

ABSTRACT

The study of fluorescent probes for DNA has been growing rapidly due to diverse applications such as disease detection, monitoring in medical treatments and development of new chemotherapeutics. Metal complexes containing groups with aromaticity and electronic delocalization may be an alternative for the development of these probes, and belong to an area called Bioinorganic Chemistry. In this context, the present study concerns the development of a bioinspired ligand containing pyridine and indole groups and their zinc(2+) complexes as potential fluorescent probes for nucleic acids. The ligand was characterized by spectroscopic techniques (infrared, nuclear magnetic resonance and electronic spectroscopies) and mass spectrometry (ESI-MS). In addition to the techniques described above, the complexes were characterized by molar conductivity, molecular fluorescence spectroscopy and elemental analysis. Infrared spectra of the ligand and the complexes $[\text{Zn}(\text{L}^{\text{C5}})\text{Cl}_2]\cdot 2\text{MeOH}$ (**1**) and $[\text{Zn}(\text{L}^{\text{C5}})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**2**) were compared and their major absorption bands were assigned. The presence of the ligand bands in the spectra of the complexes indicates that after the complexation, there were no major changes in its structure. The isotopic distribution patterns obtained for the complexes by mass spectrometry are in agreement with their respective desired chemical compositions. Comprehensive studies of uni- and bidimensional nuclear magnetic resonance along with electronic structure calculations (DFT) have made possible the proposition of a three-dimensional arrangement for the synthesized complexes where the metal center in **1** is in a slightly distorted square pyramidal environment, whereas in **2** the coordination environment of the zinc center is an octahedron. The electronic spectra for **1** and **2** were simulated via TD-DFT and the representation of the frontier molecular orbitals was generated. According to the data obtained, all the electronic transitions observed are centered in the ligands with no components that involve the metallic center orbitals. Once the complexes were characterized, tests to assess the magnitude of their interaction with salmon DNA samples were studied by electronic spectroscopy. Intrinsic binding constants (K_b) were calculated with values for **1** and **2** around 2.47×10^4 and $3.88 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectively. After successive additions of DNA aliquots, the spectra of both complexes presented hypochromism and a mild bathochromism that characterize that the complex/DNA interaction occurs through intercalation in the major groove. Molecular fluorescence results demonstrated that complex **2** has higher fluorescence than **1** considering no DNA addition. When these complexes are treated with aliquots of DNA, their fluorescence is increased, which classify them as DNA-detecting probes. However, when compared to the DAPI probe (commercial source), **1** and **2** were shown to be less efficient. Competition studies involving the synthesized complexes and groove binding agents such as methyl green and netropsin were performed and it was found that, in fact, the complexes bind through the major groove of the DNA. Finally, tests with ionic strength variation (with NaCl) were performed, indicating that the complex/DNA interaction is weakly affected by electrostatic interactions.

Keywords: Fluorescent probes. DNA. Metal complexes. Bioinorganic Chemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura básica de um nucleotídeo.....	35
Figura 2 - Estrutura química do (a) DNA e do (b) RNA identificando a diferença entre as bases nitrogenadas e da pentose.....	36
Figura 3 - Demonstração das ligações de hidrogênio e das interações de empilhamento das bases nitrogenadas do DNA.....	37
Figura 4 - Hidrólise da cisplatina e formação das ligações entre a platina e as bases guaninas do DNA.	39
Figura 5 – Deformação na estrutura do DNA ocasionada pela ligação covalente da cisplatina no N ⁷ das bases Guaninas de mesma fita.....	40
Figura 6 - Exemplo de complexo metálico de cobre interagindo eletrostaticamente com os grupos fosfatos da estrutura do DNA.	41
Figura 7- Variação espectral do complexo <i>cis</i> -[Co(<i>dpq</i>) ₂ (C ₁₂ H ₂₅ NH ₂) ₂] ³⁺ após sucessivas adições de alíquotas de DNA (ctDNA) e linearização obtida para o cálculo da constante de ligação intrínseca complexo/DNA (<i>K</i> _b). ...	42
Figura 8 - Diagrama de Perrin Jablonski ilustrando os estados energéticos de uma molécula, as transições entre estes e os fenômenos de absorção, fluorescência e fosforescência.	43
Figura 9– Estrutura química da sonda fluorescente sem e na presença de zinco e seu espectro de fluorescência para estes compostos.	45
Figura 10 - Estrutura Química do (a) bis(indolil)metano e (b) Vibrindol-A.	46
Figura 11 - Estrutura Química do aminoácido triptofano.	47
Figura 12 - Estrutura química do nortopsentina-A contendo grupamentos indólicos.	47
Figura 13 - Estrutura química do bpma.	48
Figura 14 - Estrutura química do ligante TPEN.	48
Figura 15 – Estrutura cristalina do [Zn(TPEN)]·(ClO ₄) ₂ ·0.67CH ₃ OH	49
Figura 16 - Novo ligante bioinspirado e seus complexos de zinco, proposto neste trabalho;	50
Figura 17 - Rota sintética executada para o ligante L ^{C5} . Condições: (i) HBr, tolueno, refluxo; (ii) PCC, CH ₂ Cl ₂ , t.a.; (iii) Indol (2 eqv.), I ₂ , CH ₃ CN, t.a.; (iv) bpma, K ₂ CO ₃ , KI, CH ₃ CN, refluxo.	61
Figura 18 - Espectro de infravermelho do ligante L ^{C5} em pastilha de KBr.....	64

Figura 19 – Sobreposição dos espectros eletrônicos do bpma, composto III (BIM ^{C5}) e do L ^{C5} em solução de acetonitrila. Concentrações: 2,5×10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ (todos).....	65
Figura 20 - Espectro de ESI(+)-MS (modo positivo) para o ligante L ^{C5} em acetonitrila ultrapura e sua distribuição isotópica. Experimental (barras) e calculado (linha).....	66
Figura 21 - Estrutura química do ligante L ^{C5} e seu precursores.	67
Figura 22 - Espectro de RMN de ¹ H para I, II, III e para o ligante L ^{C5} de 400MHz (25 °C) dissolvido em CDCl ₃	69
Figura 23 - Espectro de RMN de ¹³ C para I, II, III e para o ligante L ^{C5} de 400MHz (25 °C) dissolvido em CDCl ₃	70
Figura 24 – Comparativo dos espectros de IV (KBr, cm ⁻¹) para o ligante L ^{C5} , complexo 1 e 2.	75
Figura 25 - Espectros de IV calculados e experimentais para os complexos 1 (esquerda) e 2 (direita).	76
Figura 26 - Espectro de ESI(+)-MS para o complexo 1 em acetonitrila ultrapura e sua distribuição isotópica. Experimental (barras) e calculado (linha).	77
Figura 27 - Espectro de ESI(+)-MS para o complexo 2 em acetonitrila ultrapura e sua distribuição isotópica. Experimental (barras) e calculado (linha).	78
Figura 28 - Possíveis conformações estruturais para o complexo 2.....	79
Figura 29 - Arranjo molecular para o complexo 1 via cálculo de DFT.	80
Figura 30 - Arranjo molecular para o complexo 2 calculado via DFT.	81
Figura 31 - Figuras dos complexos 1 e 2 com as atribuições dos hidrogênios e carbonos.	82
Figura 32 - Espectro de ¹ H- ¹⁵ H HSQC do complexo 2 em CD ₃ CN.....	84
Figura 33 - Espectro de RMN de ¹ H para L ^{C5} (abaixo) e para os complexos 1 (meio) e 2 (topo) de 400MHz (25 °C) dissolvido em CD ₃ CN.....	85
Figura 34 - Espectros de RMN de ¹³ C da região aromática para L ^{C5} (abaixo) e complexos 1 (meio) e 2 (topo) a 400 MHz (25 °C) dissolvidos em CD ₃ CN. Os sinais “X” estão relacionados ao acetato de etila, acetonitrila e água como solventes residuais.....	86
Figura 35 - Espectros de RMN de ¹ H para L ^{C5} (abaixo) e complexos 1 (meio) e 2 (topo) a 400 MHz (25 °C) dissolvidos em CD ₃ CN. Os sinais “X e *” estão	

relacionados ao acetato de etila, acetonitrila e água como solventes residuais.....	87
Figura 36 - Espectros de RMN de ^{13}C para L^{C5} (abaixo) e complexos 1 (meio) e 2 (topo) a 400 MHz (25 °C) dissolvidos em CD_3CN . Os sinais “X e *” estão relacionados ao acetato de etila, acetonitrila e água como solventes residuais.....	88
Figura 37 - Espectro de ^1H - ^1H COSY na região de campo alto do complexo 2 a 400 MHz (25 °C) dissolvidos em CD_3CN	89
Figura 38 – Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3CN) para o complexo 2 ilustrando o efeito da temperatura para a região dos hidrogênios aromáticos.....	90
Figura 39 – Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3CN) para o complexo 2 ilustrando o efeito da temperatura para a região dos hidrogênios alifáticos.	91
Figura 40 - Espectros eletrônicos dos complexos 1 (acima) e 2 (abaixo) em soluções de (a) acetonitrila e (b) acetonitrila/HEPES 50% v/v, pH=7,02.....	92
Figura 41 - Recorte do diagrama de orbitais moleculares para os complexos 1 e 2 e representação gráfica dos principais orbitais moleculares envolvidos no processo de absorção.	95
Figura 42 - Sobreposição da curva de absorção calculada com o espectro eletrônico obtido experimentalmente para os complexos 1 e 2. As barras azuis representam a força do oscilador (f) para as transições eletrônicas descritas na Tabela 8.	96
Figura 43 - a) Variação espectral do complexo 1 após sucessivas adições de ssDNA. Condições: CH_3CN /HEPES 50% v/v; pH 7,02, $I = 50 \text{ mmol.L}^{-1}$ (NaCl); 25 °C. b) Regressão linear $[\text{DNA}]/(\epsilon_{\text{A}} - \epsilon_{\text{F}}) \times [\text{DNA}]$. $\lambda_{\text{máx}}$: 227 nm.....	97
Figura 44 - a) Variação espectral do complexo 2 após sucessivas adições de ssDNA. Condições: CH_3CN /HEPES 50% v/v; pH 7,02, $I = 50 \text{ mmol.L}^{-1}$ (NaCl); 25 °C. b) Regressão linear $[\text{DNA}]/(\epsilon_{\text{A}} - \epsilon_{\text{F}}) \times [\text{DNA}]$. $\lambda_{\text{máx}}$: 230 nm, $r^2 = 0,986$	99
Figura 45 - Espectros de fluorescência dos complexos 1 (acima) e 2 (abaixo) com a adição de alíquotas de ctDNA, onde $r = [\text{complexo}]/[\text{ctDNA}]$. Condições: CH_3CN /HEPES 50% v/v (pH 7,0), $\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$	101

- Figura 46 - Espectros de fluorescência do complexo 2 a 1,0 μM (acima), 5,0 μM (meio) e para o corante fluorescente comercial DAPI (abaixo) com sucessivas adições de ctDNA, onde $r = [\text{complexo}]/[\text{CT-DNA}]$. Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ 50% v/v (pH 7,0), $\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$ 102
- Figura 47 – Espectros de fluorescência do complexo 2 (5,0 μM) com a adição de 50 μM de ctDNA e posterior adição de 50 e 100 μM de verde de metila (VM, acima) e netropsina (net, abaixo). Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ 50% v/v (pH 7,0)..... 104
- Figura 48 – Espectros de fluorescência do complexo 2 (5,0 μM) com a adição de 50 μM de ctDNA e posterior adição de 50 e 100 mM de NaCl. Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ 50% v/v (pH 7,0). 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) do L^{C5} e seus precursores (I-III).....	62
Tabela 2 – Espectro de RMN de ^1H com as atribuições para o L^{C5} e seus precursores.	68
Tabela 3 - Porcentagens de C, H e N para os complexos sintetizados via análise elementar (calculada/encontrada).	72
Tabela 4 - Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) do L^{C5} e seus complexos 1 e 2.	74
Tabela 5 - Comprimentos de ligação calculados (\AA) e ângulos ($^\circ$) para os complexos 1 e 2.	80
Tabela 6 - Espectro de RMN de ^1H com as atribuições para o L^{C5} e complexos 1 e 2.	83
Tabela 7 - Dados de espectroscopia eletrônica para os complexos 1 e 2 no estado líquido.....	93
Tabela 8 - Dados calculados para os espectros de absorção de 1 e 2 via TD-DFT..	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
BIM	bis(indolil)metano
bpma	bis(piridilmetil)amina
C	Citosina
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia camada delgada
COSY	Espectroscopia de correlação ^1H - ^1H
ctDNA	<i>Calf-thymus</i> (DNA extraído do timo de bezerros)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DFT	Teoria do Funcional da Densidade (Cálculos de Estrutura Eletrônica)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESI-MS	Espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i>
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazino-1-etanosulfônico
<i>fac</i>	Facial (isomeria)
G	Guanina
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa
HMBC	Coerência heteronuclear de múltiplas ligações
HOMO	Orbital molecular de mais alta energia ocupado
HSQC	Correlação de deslocamento químico heteronuclear
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
K_b	Constante de ligação intrínseca
kcal	Quilocaloria
K	Kelvin
L^{C5}	6,6-di(1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -bis(piridin-2-ilmetil)-hexan-1-amina
LUMO	Orbital de mais baixa energia desocupado
<i>mer</i>	Meridional (isomeria)
VM	Verde de metila
M	Multiplicidade de spin nuclear

NaCl	Cloreto de sódio
NOESY	Espectroscopia de efeito nuclear Overhauser
Net	Netropsina
PCC	Clorocromato de piridínio
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Espectroscopia de ressonância nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SDBS	<i>Spectral Database for Organic Compounds</i>
ssDNA	<i>Salmon sperm DNA</i>
TC	Transferência de carga
TD-DFT	Teoria do funcional da densidade dependente do tempo
T	Timina
TMS	Tetrametilsilano
TPEN	<i>N,N,N',N'</i> -tetraquis(2-piridilmetil)etilenodiamina
U	Uracila
UV-Vis	Espectroscopia eletrônica na região do Ultravioleta e Visível
¹ H-RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
ε _A	Coeficiente de absorção para cada adição de DNA
ε _F	Coeficiente de absorção molar para o composto livre
ε _B	Coeficiente de absorção para o composto totalmente ligado ao DNA
ε	Coeficiente de absorção
δ	Deslocamento químico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Λ _M	Condutividade molar
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1	QUÍMICA BIOINORGÂNICA	31
3.2	QUÍMICA BIOINORGÂNICA DO ZINCO.....	32
3.3	ÁCIDOS NUCLEICOS.....	34
3.3.1	Modos de Interação entre o DNA e Complexos Metálicos.....	38
3.3.1.1	<i>Ligação Covalente.....</i>	<i>38</i>
3.3.1.2	<i>Interação Eletrostática.....</i>	<i>40</i>
3.3.1.3	<i>Interação do tipo π-stacking.....</i>	<i>41</i>
3.3.2	Princípios de Fluorescência e Sondas Moleculares	43
3.4	COMPOSTOS BIOINSPIRADOS.....	45
4	PARTE EXPERIMENTAL	51
4.1	MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	51
4.1.1	Materiais.....	51
4.1.2	Métodos e Instrumentação	51
4.1.2.1	<i>Cromatografia em coluna (CC) e em camada delgada (CCD)</i>	<i>51</i>
4.1.2.2	<i>Análise Elementar de C, H e N.....</i>	<i>51</i>
4.1.2.3	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)</i>	<i>52</i>
4.1.2.4	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....</i>	<i>52</i>
4.1.2.5	<i>Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-EM).52</i>	
4.1.2.6	<i>Espectrometria de massa com ionização por “electrospray” (ESI-MS)</i>	<i>53</i>
4.1.2.7	<i>Condutometria.....</i>	<i>53</i>

4.1.2.8	<i>Espectroscopia Eletrônica</i>	53
4.1.2.9	<i>Cálculo de Estrutura Eletrônica (TD-DFT)</i>	54
4.1.2.10	<i>Estudos de interação com o DNA via UV-Vis</i>	54
4.1.2.11	<i>Estudos de interação com o DNA via Fluorescência Molecular</i>	55
4.2	SÍNTESES DO LIGANTE.....	55
4.2.1	Síntese do 6-bromohexan-1-ol (I)	56
4.2.2	Síntese do 6-bromohexanal (II).....	56
4.2.3	Síntese do 3,3'-(6-bromohexano-1,1-diil)bis(1- <i>H</i> -indol) (III).....	57
4.2.4	Síntese do 6,6-di(1- <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -bis(piridin-2-ilmetil)hexan-1- amina(L ^{C5})	57
4.3	SÍNTESES DOS COMPLEXOS	58
4.2.1	Síntese do 6,6-di(1- <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -bis(piridin-2-ilmetil)hexan-1- aminodiclorozinco(2+) – [Zn(L ^{C5})Cl ₂] • 2 CH ₃ OH (1)	58
4.2.2	Síntese do perclorato de <i>bis</i> {6,6-di(1- <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -bis(piridin-2- ilmetil)hexan-1-amino}zinco(2+) – [Zn(L ^{C5}) ₂](ClO ₄) ₂ (2).....	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE	61
5.1.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho	62
5.1.2	Espectroscopia Eletrônica (UV-Vis)	64
5.1.3	Espectroscopia de Massa com Ionização por “Electrospray” (ESI-MS)	65
5.1.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - RMN	67
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	71
5.2.1	Análise Elementar de C, H e N	72
5.2.2	Condutometria	72
5.2.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho	73
5.2.4	Espectroscopia de Massa com Ionização por <i>Electrospray</i>	76
5.2.5	Cálculos Estruturais via DFT	78

5.2.6	Ressonância Magnética Nuclear – RMN.....	82
5.2.7	Espectroscopia Eletrônica UV-Vis	91
5.2.8	Interação com DNA via Espectroscopia Eletrônica.....	96
5.2.9	Interação com DNA via Fluorescência Molecular	100
6	CONCLUSÃO.....	98
	REFERÊNCIAS.....	109
	APÊNDICE A	119
	APÊNDICE B	121
	APÊNDICE C	123
	APÊNDICE D	125
	APÊNDICE E	127
	APÊNDICE F	129
	APÊNDICE G	131
	APÊNDICE H	135
	APÊNDICE I	139
	APÊNDICE J	141
	APÊNDICE K	143
	APÊNDICE L	145
	APÊNDICE M	147
	APÊNDICE N	149
	APÊNDICE O	151
	APÊNDICE P	155
	APÊNDICE Q	157
	APÊNDICE R	159
	APÊNDICE S	165

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente o câncer está entre as principais causas de morte de seres humanos, com uma ocorrência de 14 milhões de novos casos no ano de 2012 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Esta doença surge a partir de estados neoplásicos sendo uma proliferação celular não controlada pelo corpo, com tendência de autonomia e perpetuação. Estas neoplasias podem induzir metástases, resistência à quimioterapia e mau prognóstico (STIVAROU; PATSAVOUDI, 2015).

Como o ácido desoxirribonucleico (DNA) está no núcleo da célula e se replica para propagar a informação genética nele contida, buscar soluções para impedir a replicação o DNA de células mutadas pode ser uma alternativa de inibir processos neoplásicos. Atualmente, a introdução de compostos de coordenação em sistemas biológicos para fins terapêuticos ou de diagnóstico é um campo bastante desenvolvido na área de química bioinorgânica (BRODERICK; COUCOUVANIS, 2003). O zinco, metal relacionado com este projeto, é essencial a todas as formas de vida conhecidas, estando presente em cerca de 300 enzimas/proteínas. Tal metal pode atuar nestas biomoléculas tanto sob um prisma estrutural quanto funcional. De todas as 06 classes enzimáticas propostas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) o zinco é a única espécie metálica presente em todas (CRICHTON, 2012).

Complexos de zinco(2+) podem se ligar de maneira eficaz e seletiva a ácidos nucleicos. Estas moléculas chamam a atenção por serem fortemente fluorescentes na faixa de baixa energia (região visível e infravermelho próximo). Estas duas propriedades estão sendo exploradas para detectar quantitativamente ácidos nucleicos em amostras biológicas, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo* (TERENZI et al., 2015).

Se projetado de forma cautelosa, complexos metálicos podem então conter duas características de relevância biotecnológica. Uma delas é a projeção e síntese de ligantes onde porções de sua estrutura interajam com o DNA, alterando suas características químicas e/ou estruturais e impedindo sua replicação. A segunda característica é capacidade de apresentarem fluorescência, uma propriedade fotofísica fundamental para acompanhar o comportamento e atividade de um complexo de interesse no meio biológico, atuando então como uma sonda

molecular. Uma sonda fluorescente é, portanto um fluoróforo que está preparado para responder (emitir fluorescência), a partir de um estímulo específico, quando ligado em uma determinada região em uma espécie de interesse. Quando inserido no meio biológico, estas sondas permitem detectar componentes desejados incluindo células vivas proporcionando o diagnóstico de doenças e o acompanhamento de tratamentos médicos (UENO; NAGANO, 2011).

Neste trabalho optou-se pela utilização de derivados de compostos indólicos, pois estes demonstraram uma atividade antitumoral significativa possuindo propriedades inibitórias da atividade de clivagem de DNA mediada pelas topoisomerasas I e II (RIOU, 1993). Outro ponto positivo do grupo *bis*(indolil)metano é sua alta fluorescência molecular, permitindo então que sejam utilizados como sondas moleculares em sistemas vivos (MORTEZA et al., 2010).

Desta forma, neste trabalho propõe-se o planejamento, síntese e caracterização de um ligante e seus compostos de coordenação bioinspirados inéditos contendo íons $Zn(2+)$ e estudos de interação destes compostos com ácidos nucleicos por métodos espectrofotométricos (UV-Vis e fluorescência) para a avaliação destes, como potenciais sondas fluorescentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar um novo ligante mononucleante *N*-doador contendo o grupo bis(indolil)metano e seus compostos de coordenação bioinspirados de zinco(2+) como potenciais sondas fluorescentes para ácidos nucleicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Planejar, sintetizar e caracterizar o ligante 6,6-di(1*H*-indol-3-il)-*N,N'*-bis(piridin-2-ilmetil)-hexan-1-amina (**L^{C5}**) por técnicas espectroscópicas e espectrometria de massas;
- ✓ Sintetizar complexos metálicos contendo íons Zn^{2+} e caracterizá-los por técnicas espectroscópicas, massas e condutométricas;
- ✓ Propor um arranjo estrutural dos complexos sintetizados por estudos de ressonância magnética nuclear e cálculos de estrutura eletrônica;
- ✓ Atribuir as transições eletrônicas relativas às bandas de absorção encontradas considerando seus orbitais de fronteira via TD-DFT;
- ✓ Efetuar titulações espectrofotométricas para verificar a magnitude de interação complexo/DNA (K_b) via espectroscopia eletrônica na região do UV-visível;
- ✓ Avaliar as propriedades fotofísicas destes complexos via espectroscopia de fluorescência molecular na presença e ausência de DNA buscando verificar se tais compostos atuam como sondas fluorescentes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A Ciência Química compreende muitas descobertas, criações e transformações. Ela consiste em um pilar fundamental para a conservação dos alimentos, desenvolvimento de medicamentos, baterias e pilhas, energia, combustíveis, roupas, auxilia nas análises das amostras colhidas pelos peritos em uma cena de crime, além de proporcionar o desenvolvimento científico-tecnológico (ZUCCO, 2011). A Química Medicinal, por exemplo, possui uma frente de trabalho considerável que estuda compostos que consigam atuar como fármacos ao interagir com o DNA, impedindo sua replicação e conseguindo assim, em muitos casos, proporcionar o tratamento e eventual cura de pessoas com câncer. Dentro desta frente, o desenvolvimento de complexos metálicos que apresentem propriedades fluorescentes tem ganhado forte atenção devido à sua ampla gama de aplicações. Em microbiologia, por exemplo, estes corantes fluorescentes abrem a possibilidade de observar tecidos, organismos ou organelas com excepcional sensibilidade e resolução (CZAPLINSKA; SPACZYNSKA; MUSIOL, 2018). Neste sentido, a pesquisa e desenvolvimento de compostos químicos que interajam com a estrutura complexa do DNA e ainda possam ser monitoradas por fluorescência molecular tem sido tema de intensa investigação em um campo da ciência conhecido como química bioinorgânica.

3.1 QUÍMICA BIOINORGÂNICA

A química bioinorgânica estuda as funções, o processamento, o armazenamento e as aplicações de íons metálicos e seus complexos em sistemas biológicos. Este campo está em rápido crescimento e evolução devido a sua importância no desenvolvimento de produtos de interesse bioquímico e farmacológico (BRODERICK; COUCOUVANIS, 2003). Esta área de interface da química não pode ser considerada recente, pois relatos sobre a presença de metais ligados a proteínas e enzimas são datados desde o século 19, tendo em vista nomenclaturas diferentes utilizadas na época. A partir da década de 1970, percebe-se um aumento do fluxo de desenvolvimento de pesquisas e trabalhos nesta área envolvendo metais em sistemas biológicos, entre outros, sendo definido como nome Química Bioinorgânica (BEINERT, 2002). A química bioinorgânica engloba várias

áreas do conhecimento tais como química inorgânica, biologia molecular e celular, bioquímica, química medicinal, entre outras (BRODERICK; COUCOUVANIS, 2003). Dentre várias subáreas existentes em bioinorgânica, as mais comuns são:

- Estudo do ambiente de coordenação do íon metálico em metaloproteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e membranas;
- Mecanismos das reações nos centros metálicos das enzimas;
- Construção de análogos sintéticos para sítios ativos das metaloproteínas;
- Fármacos contendo metais para cura, prevenção e/ou diagnóstico de doenças;
- Remoção e transporte de íons metálicos e compostos metálicos de, e para sistemas vivos e;
- Processos de biomineralização.

Os estudos de complexos metálicos com propriedades terapêuticas expandiram-se fortemente após os anos 60, quando se comprovou a atividade antitumoral da *cis*-diaminodicloroplatina(II) como agente quimioterápico. O sucesso da cisplatina é particularmente evidente no tratamento de pacientes com câncer testicular, onde as taxas de cura excedem 95%. Porém, a eficácia desse quimioterápico é muitas vezes limitada pela sua elevada toxicidade e resistência intrínseca ou adquirida por seu uso abusivo (DENORA et al., 2017).

Nas últimas décadas, a pesquisa sobre alvos biológicos e o mecanismo de ação de muitos metalofármacos evoluiu passo a passo e esse conhecimento tem sido usado para impulsionar a projeção e síntese de fármacos com uma melhor eficiência e seletividade, bem como tendo efeitos colaterais reduzidos (LENIS-ROJAS et al., 2017). Pesquisas no desenvolvimento de sensores fluorescentes de zinco vêm sendo desenvolvidas uma vez que este desempenha um papel importante nos eventos celulares incluindo catálise enzimática, expressão de genes, apoptose celular e neurotransmissão (MIKATA; WAKAMATSU; YANO, 2005).

3.2 QUÍMICA BIOINORGÂNICA DO ZINCO

Os íons metálicos desempenham muitas funções essenciais para a sobrevivência dos seres humanos. A deficiência de alguns íons metálicos pode levar

a doenças como retardo de crescimento decorrente de zinco dietético insuficiente, por exemplo. O zinco é essencial para o crescimento e o desenvolvimento em todas as formas de vida (BASU, 2015).

Segundo elemento mais abundante no corpo humano, este é essencial para a vida, sendo que um adulto, em média, possui cerca de 03 (três) gramas deste metal, correspondendo a uma concentração média de cerca de $0,6 \text{ mmol.L}^{-1}$, a maioria dos quais (cerca de 95%) está presente no meio intracelular.

O zinco é encontrado em mais de 300 enzimas, onde pode desempenhar um papel funcional (catalítico) e/ou estrutural. É o único metal que está presente em cada uma das seis classes fundamentais de enzimas reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB): Oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (BROWN, 2004). O zinco biologicamente disponível não está contido apenas em enzimas. Há um número cada vez maior de proteínas de ligação a ácidos nucleicos com átomos de Zn^{2+} essenciais, demonstrando o papel extensivo que este desempenha na regulação da transcrição e tradução das informações genéticas (BASU, 2015).

Sob o prisma da química inorgânica, o zinco é um metal da série $3d$ contendo sua camada de valência completa. Ao contrário de outros íons desta série tais como ferro e cobre, ele não mostra valência variável o que pode indicar a preferência do meio biológico por seu emprego simplesmente por não apresentar o risco de promover reações redox. Possui carga altamente concentrada em comparação com o seu raio iônico relativamente pequeno ($0,65 \text{ \AA}$). Sua alta afinidade por elétrons torna-o um forte ácido de Lewis, semelhante ao cobre e ao níquel (CRICHTON, 2012).

Sua configuração eletrônica (d^{10}) indica que, não possui transições eletrônicas do tipo $d-d$ e seus complexos não estão sujeitos a efeitos de estabilização de campo ligante, de modo que Zn^{2+} não possui restrições de campo ligante em qualquer geometria de coordenação. Porém podem apresentar outras espectroscopias de absorção como transferência de carga entre metal e ligante. Desta forma, o número de coordenação e a geometria dos compostos de zinco são ditados majoritariamente pelo tamanho e carga dos ligantes. Isto significa que o zinco pode, em princípio, adotar geometria de coordenação altamente flexível. No entanto, na maioria das proteínas de zinco, há uma forte preferência pela coordenação tetraédrica, frequentemente distorcida, o que aumenta a polarização do centro metálico e a

acidez de moléculas de água coordenada a ele. Alguns casos de zinco em ambientes pentacoordenados (geometria bipiramidal trigonal) distorcidos já foram relatados na literatura (CRICHTON, 2012). Uma vez que o zinco é de dureza limítrofe, ele pode ligar-se em átomos de oxigênio, nitrogênio e de enxofre. As enzimas de zinco também participam da clivagem das ligações de fosfodiéster presentes no DNA e no RNA. Com isso, dependendo do complexo sintetizado contendo esse metal, pode-se obter apenas uma função estrutural onde este atua como direcionador do ligante para algum tipo de interação com o DNA ou função catalítica, onde atua na ligação direta com a estrutura destes ácidos nucleicos (CRICHTON, 2012).

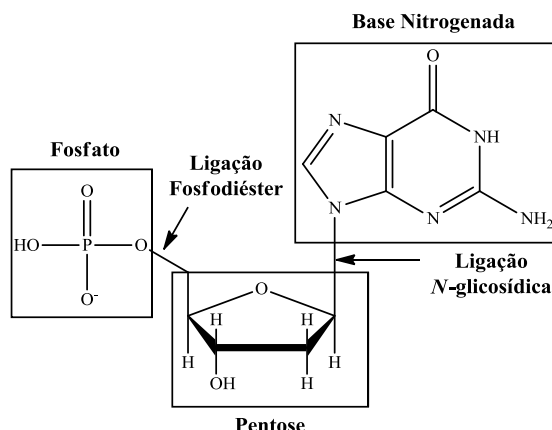
O Zn^{2+} atua também como um cofator para muitas enzimas e proteínas envolvidas no transporte de elétrons, reparo de DNA e expressão da proteína p53 (ZHANG et al., 2017). Verificando todas as propriedades do íon Zn^{2+} e sua atuação no meio biológico, desenvolver complexos bioinspirados contendo esse metal é de significativa relevância no cenário atual.

Tendo em vista a atuação de complexos metálicos com o DNA, compreender a estrutura química do DNA e os modos em que complexos metálicos possam interagir com esta biomolécula é essencial para que o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos possa evoluir.

3.3 ÁCIDOS NUCLEICOS

Os ácidos nucleicos são biopolímeros presentes em organismos vivos que podem possuir em sua composição ribonucleotídeos como o ácido ribonucleico (RNA) ou desoxiribonucleotídeos como o ácido desoxirribonucleico (DNA). Tais nucleotídeos são constituídos por três componentes básicos: uma base nitrogenada derivada da pirimidina ou purina, uma pentose e um fosfato inorgânico (NELSON; COX, 2010). A Figura 1 a seguir ilustra tal estrutura.

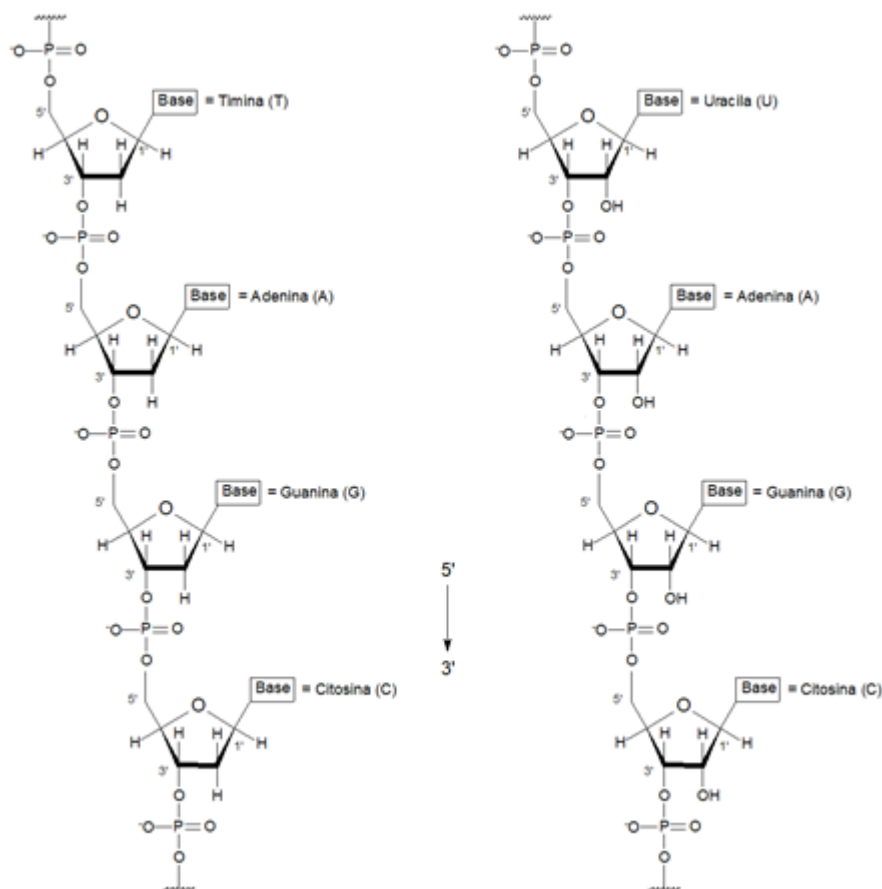
Figura 1 - Estrutura básica de um nucleotídeo.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018, com base em NELSON; COX, 2010.

O RNA e o DNA possuem estruturas químicas muito semelhantes, ou seja, são compostos por nucleotídeos tricomponentes. Enquanto o DNA tem como bases nitrogenadas purínicas a adenina (A) e guanina (G) e bases nitrogenadas pirimidínicas citosina (C) e timina (T), o RNA apresenta uma substituição desta última por uracila (U). Outra diferenciação importante é na pentose (açúcar) onde o DNA possui uma desoxirribose e o RNA uma ribose, respectivamente (CRICHTON, 2012). A Figura 2 apresenta as estruturas do DNA e RNA com seus respectivos nucleotídeos. Analisando as diferenças entre as estruturas do DNA e RNA apresentadas na Figura 2, é possível observar que estas biomoléculas podem sofrer hidrólise lenta, não enzimática, da ligação fosfodiéster. Porém, devido aos grupos 2'-hidroxila do RNA, ausentes no DNA, estes são hidrolisados rapidamente em meio alcalino. Desta forma, o DNA além de sofrer hidrólise muito lentamente, ainda é estabilizado devido às interações entre as bases nitrogenadas da dupla hélice (NELSON;COX, 2010).

Figura 2 - Estrutura química do (a) DNA e do (b) RNA identificando a diferença entre as bases nitrogenadas e da pentose.

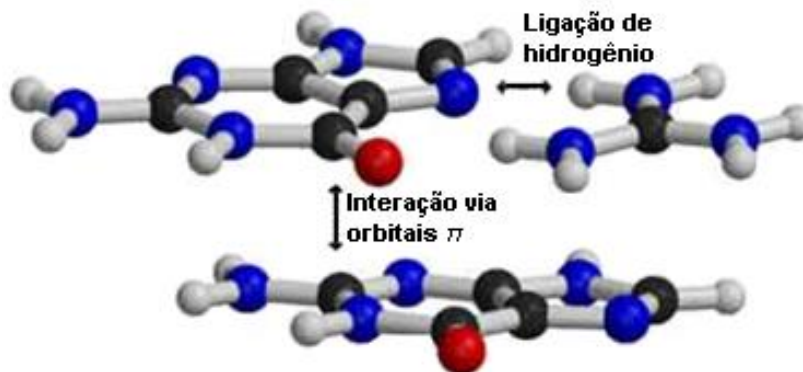


Fonte: Elaborada pela autora, 2018, com base em NELSON; COX, 2010.

A informação necessária para o funcionamento da célula e, por conseguinte todo o organismo está primariamente depositado na molécula de DNA contida no núcleo celular. Esta biomolécula torna possível expressão de proteínas e outras moléculas regulatórias através do processo de transcrição, onde o RNA é sintetizado, com base na sequência de bases do DNA (CAMPOS, 2010). Considerando que o foco de estudo deste presente trabalho é o DNA segue-se então no estudo de suas propriedades.

O DNA possui conformação de dupla hélice, onde duas fitas deste biopolímero, em sentidos opostos, uma de $5' \rightarrow 3'$ e outra de $3' \rightarrow 5'$, mantêm-se unidas por dois tipos de forças: As ligações de hidrogênio entre os pares de bases complementares (mantém a dupla hélice) e as interações de empilhamento das bases (π -stacking) (mantém a estabilidade) (Figura 3) (NELSON; COX, 2010).

Figura 3 - Demonstração das ligações de hidrogênio e das interações de empilhamento das bases nitrogenadas do DNA.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018, com base em NELSON; COX, 2010.

Em 1953 quando publicado pelo periódico *Nature* um artigo referente a descoberta por Francis Crick e Jim Watson sobre a estrutura dupla helicoidal do DNA, este gerou um avanço significativo da biologia molecular moderna (CRICHTON, 2012). Além disso, dados confirmaram que esta estrutura poderia se replicar sendo que após a separação das duas fitas, cada uma destas poderia dar origem uma fita complementar. A enzima helicase possui como função desenrolar a dupla hélice compacta do DNA para formar duas fitas simples podendo ser utilizadas como modelos de replicação dessa biomolécula. Quando ocorre a separação das fitas, as enzimas DNA-polimerase sintetizam moléculas de desoxiribonucleotídeos, os blocos de construção do DNA. A enzima se aproxima das fitas e a partir de sua leitura sintetiza duas novas fitas filhas. Desta forma, a informação genética é então transmitida (NELSON; COX, 2010).

Esta replicação do DNA ocorre durante o ciclo celular, onde células crescem e se dividem dando origem a novas células geneticamente relacionadas. A transcrição e a replicação do DNA são os processos centrais para a proliferação celular, estando então diretamente relacionados aos processos decrescimento de tumores (KNOLL; TURRO, 2015). Caso o material genético sofra algum tipo de dano, ocasionando então possíveis mutações genéticas nas células, dá-se origem a um processo de replicação de forma desordenada. Sendo assim, é possível que haja então a geração de tumores que podem ou não se espalhar pelo organismo ocasionando, neste último caso, o processo conhecido como metástase.

Como o DNA possui diversidade conformacional, grandes alterações estruturais podem ocorrer quando este interage com algumas classes de moléculas.

Devido a deformação após a interação composto/DNA, não há leitura das informações desta biomolécula, sendo uma alternativas para impedir a replicação do material genético defeituoso (KNOLL; TURRO, 2015).

Diversas enzimas que catalisam a replicação do DNA e RNA, ribozimas que catalisam a transesterificação do RNA e ainda enzimas de clivagem ou transporte de compostos fosforilados apresentam em seus sítios ativos íons metálicos, mostrando a importância da química bioinorgânica nesses processos. A complexidade e a dimensão da molécula de DNA nos fornecem um estudo abrangente referente a utilização de complexos metálicos que consigam interagir com o DNA e impedir a replicação dessa biomolécula (GARCÍA-RAMOS et al., 2013). Desta forma, há necessidade de entender os tipos de interação que podem ocorrer entre essa biomolécula e complexos metálicos.

3.3.1 Modos de Interação entre o DNA e Complexos Metálicos

A molécula de DNA pode interagir com diversas moléculas dentro dos sistemas vivos de maneira covalente nos grupos fosfatos ou bases nitrogenadas ou de maneira intercalação e via atração eletrostática (KNOLL; TURRO, 2015).

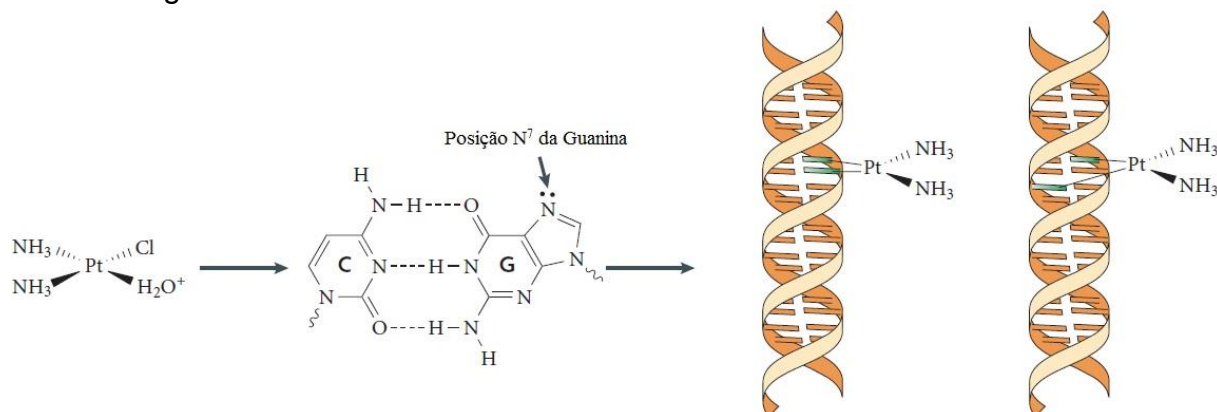
3.3.1.1 *Ligação Covalente*

Compostos de coordenação podem apresentar preferência por algum modo de ligação ou uma sequência de nucleotídeos, dependendo de seu tamanho e o arranjo estrutural específico. Complexos metálicos e o DNA/RNA podem ligar-se covalentemente entre si, sendo uma das formas de interação mais observadas até os dias atuais. Como o DNA e o RNA são poliânions, estes se ligam ao metal ou a forma ativa do complexo caso esteja em sua forma catiônica (CAMARGO, 2013). Um conhecido medicamento responsável pela cura de mais de 95% do câncer testicular além de atuar no tratamento de outras formas de câncer conhecido como cisplatina é um típico exemplo de composto que apresenta estas características (GARCÍA-RAMOS et al., 2013).

Ao entrar na célula tumoral, a cisplatina $\{[Pt(NH_3)_2Cl_2]\}$ sofre hidrólise para formar a espécie $\{[Pt(NH_3)_2Cl(OH_2)]^+\}$ e $\{[Pt(NH_3)_2(OH_2)_2]^{2+}\}$. A baixa concentração celular de íons cloreto facilita este processo de hidrólise, sendo estas duas últimas as formas mais ativas no ataque aos alvos celulares (WANG; LIPPARD, 2005). O

átomo de platina forma ligações covalentes com as posições N7 de purinas para proporcionar principalmente ligações 1,2- ou 1,3-intracadeia Guanina-Guanina (GG), porém formando em pequenas quantidades outras formas de ligação covalente como visto na Figura 4 (TUREL; KLJUN, 2011).

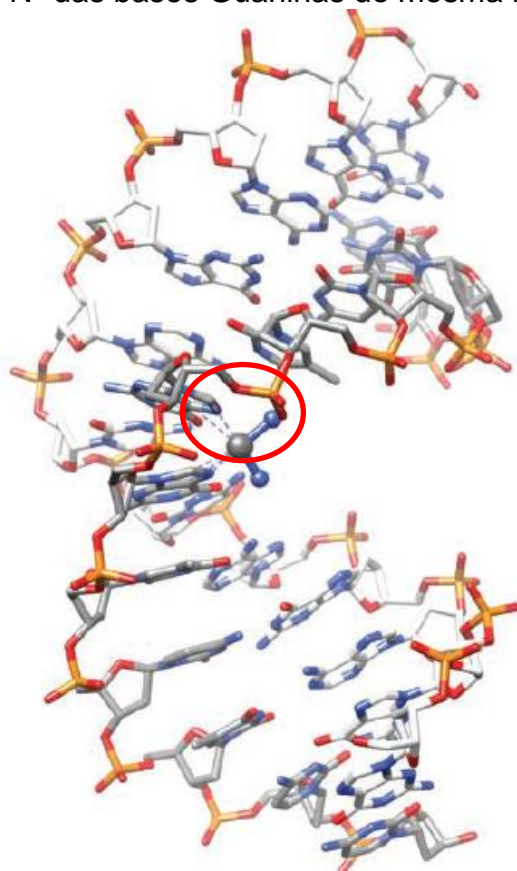
Figura 4 - Hidrólise da cisplatina e formação das ligações entre a platina e as bases guaninas do DNA.



Fonte: KELLAND, 2007.

Com o ataque nucleofílico das bases nitrogenadas ao centro eletrofílico de platina, a quelação DNA-complexo desencadeia uma distorção na estrutura deste ácido nucleico (Figura 5) impedindo o reconhecimento biomolecular, bloqueando consequentemente, sua replicação (PIZARRO; SADLER, 2009).

Figura 5 – Deformação na estrutura do DNA ocasionada pela ligação covalente da cisplatina no N⁷ das bases Guaninas de mesma fita.



Fonte: TUREL; KLJUN, 2011.

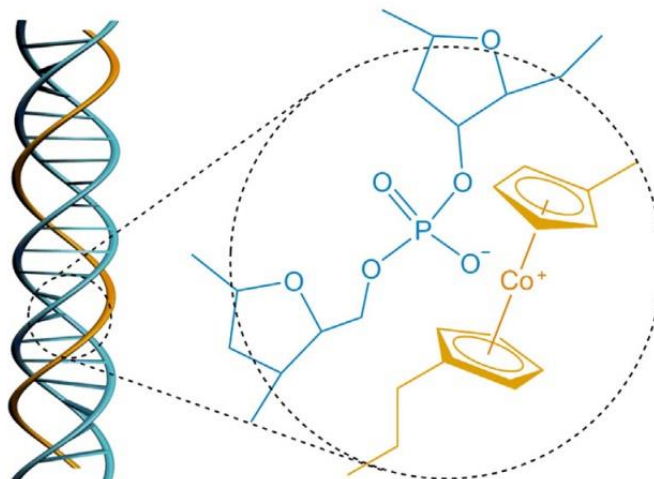
Esse quimioterápico possui alta eficiência, porém como já exposto anteriormente, tem uma elevada toxicidade e gera efeitos colaterais extremos (DENORA et al., 2017). Neste sentido, busca-se desenvolver novos quimioterápicos que minimizem esses efeitos, podendo se ligar de formas covalentes e/ou não covalentes com o DNA.

3.3.1.2 Interação Eletrostática

Tipicamente, pequenas moléculas interagem com o DNA através de um dos sulcos (maior ou menor), pela espinha dorsal contendo os diésteres fosfóricos ou ainda pelas nucleobases. As associações intermoleculares reversíveis, como a ligação eletrostática, ocorrem devido à interação entre cátions com o esqueleto de fosfato carregado negativamente na superfície exterior da hélice de DNA (GARCÍA-RAMOS et al., 2013). Muitos estudos buscam utilizar moléculas orgânicas para interagir com o DNA. Uma forma de aumentar este grau de interação pode ser

obtida pela inserção de íons metálicos formando então compostos de coordenação (Figura 6).

Figura 6 - Exemplo de complexo metálico de cobre interagindo eletrostaticamente com os grupos fosfatos da estrutura do DNA.



Fonte: RUSSEL et al., 2015.

Conforme ilustrado por Russel e colaboradores (2015), com uma densidade elevada de carga negativa, o DNA atrai o íon cobalto e, conseqüentemente, ocorre a aproximação entre DNA e complexo, ocasionando as interações eletrostáticas entre os átomos de oxigênio dos grupos fosfato e o centro metálico (RUSSEL et al., 2015). Devido à esta interação ocorre mudança estrutural do DNA, que se deforma a fim de encontrar a conformação mais estável.

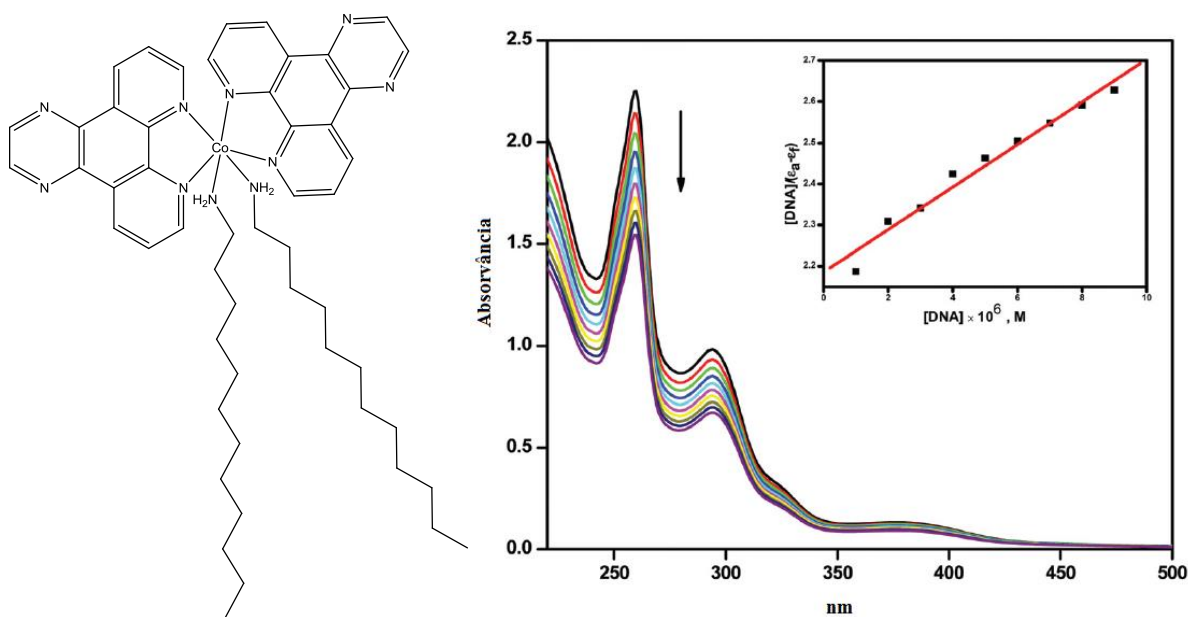
Caso o complexo metálico possua em sua estrutura um grupo planar que pode se comportar como um intercalador, outra forma de interação ocorre sendo conhecida como *π -stacking* (TUREL; KLJUN, 2011).

3.3.1.3 Interação do tipo *π -stacking*

Atualmente um dos modos de interação mais estudados de moléculas com o DNA é via intercalação. Tal processo ocorre pela inserção de sistemas poliaromáticos estruturalmente planos ou com certo grau de planaridade entre os pares de bases nitrogenadas. Esta interação é estabilizada pela sobreposição das nuvens eletrônicas π do intercalador e as nuvens π das nucleobases vizinhas. Uma forma bastante conveniente de acompanhar este processo se dá por experimentos

de titulação espectrofotométrica de um composto de interesse com DNA. Tal processo é exemplificado na Figura 7 seguir:

Figura 7- Variação espectral do complexo $cis-[Co(dpq)_2(C_{12}H_{25}NH_2)_2]^{3+}$ após sucessivas adições de alíquotas de DNA (ctDNA) e linearização obtida para o cálculo da constante de ligação intrínseca complexo/DNA (K_b).



Fonte: NAGARAJ et al., 2014.

O complexo ilustrado na Figura 7 apresenta um claro hipocromismo (36,5%), ou seja, um decréscimo da absorvância após cada adição de DNA. Este efeito surge devido a um modo de ligação intercalativo que envolve uma forte interação pelo empilhamento entre a extensão aromática do ligante e os pares de bases nitrogenadas presentes no DNA. A constante de ligação intrínseca (K_b) foi calculada ($2,4 \times 10^6 \text{ mol.L}^{-1}$), indicando forte interação.

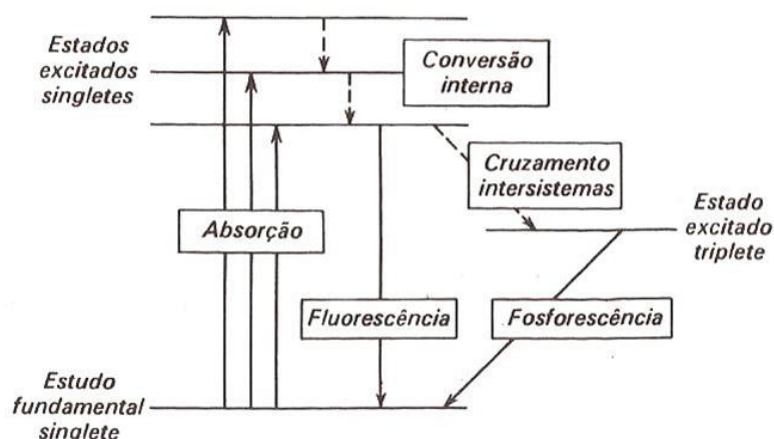
Além de possuir uma constante de ligação elevada com o DNA, a partir de testes comparativos com brometo de etídio, um conhecido agente intercalante, Nagaraj e colaboradores comprovaram que este complexo possui alta fluorescência, podendo também ser monitorada sua atividade intercalativa em testes com DNA via espectroscopia de fluorescência molecular (NAGARAJ et al., 2014).

3.3.2 Princípios de Fluorescência e Sondas Moleculares

A popularidade das sondas fluorescentes está crescendo rapidamente devido a diversas características como simplicidade, alta sensibilidade, baixo limite de detecção e capacidade de bioimagem (KOBAYASHI et al., 2010). Estas permitem detectar componentes particulares de arranjos biomoleculares complexos, incluindo células vivas. As sondas fluorescentes são fluoróforos que estão preparados para responder a um estímulo específico ou para localizar uma determinada região em uma espécie biológica. Para ser considerada uma sonda fluorescente, um composto deve possuir duas características básicas: *i.* uma parte da estrutura biologicamente ativa, responsável pela ligação da sonda com uma determinada estrutura molecular e *ii.* um grupo funcional fluorescente responsável pela emissão luminosa (SHULTS; IMPERIALI, 2003).

Uma determinada substância, ao absorver um fóton, atinge um estado eletrônico excitado e, através de um processo fotoquímico, forma-se um produto no estado eletrônico fundamental (BALZANI; SCANDOLA, 1996). Muitas moléculas dissipam excesso de energia também em forma de radiação ao voltar do estado eletrônico excitado, sendo esse processo definido como fotoluminescência que divide-se em fluorescência e fosforescência. Uma forma simples de organizar tais fenômenos foi proposta pelo físico polonês Aleksander Jablonski conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Diagrama de Perrin Jablonski ilustrando os estados energéticos de uma molécula, as transições entre estes e os fenômenos de absorção, fluorescência e fosforescência.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018, com base em BALZANI; SCANDOLA, 1996.

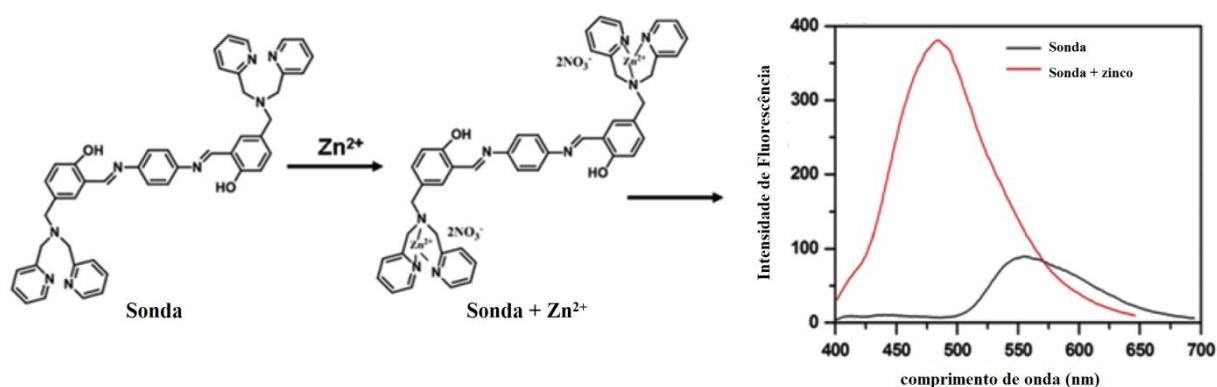
Na Figura 8 é possível observar que o processo de fluorescência inicia-se pela excitação eletrônica de uma molécula no seu estado fundamental, singlete S_0 , pela absorção de radiação eletromagnética até o estado S_1 , levando em média 10^{-15} segundos para tal (processo rápido). No caminho de volta diretamente ao estado fundamental, envolvendo a emissão de fóton do estado singlete $S_1 \rightarrow S_0$, sem mudar a orientação de spin, o sistema em questão emite radiação por fluorescência. Tal fenômeno ocorre em uma faixa de 10^{-9} a 10^{-7} segundos. Já o fenômeno de fosforescência envolve estados eletrônicos de multiplicidades de spin diferentes. Neste caso o elétron excitado ocupando o estado S_1 sofre um fenômeno chamado de cruzamento intersistema onde parte de sua energia é gasta para ocasionar uma inversão de spin eletrônico, dando origem ao estado tripleto T_1 . A partir deste momento, quando o elétron retornar ao estado fundamental S_0 , tem-se agora uma transição eletrônica proibida pela regra de conservação de spin, o que dificulta este processo de retorno. Neste caso, a radiação emitida ocorre na ordem de 10^{-3} até 10^2 segundos (processo lento), caracterizando a fosforescência (DOVICH I et al., 1984). Na Figura 8 tem-se então a conversão interna que independente de que estado superior excitado singlete tenha sido atingido no salto quântico primário, frequentemente existe uma transferência de energia rápida, sem emissão de energia, ao estado singlete excitado de mais baixa energia. Pode ocorrer também o cruzamento intersistemas onde uma competição entre os estados de energia mais baixos singlete e tripleto, e parte da energia é transferida ao estado tripleto, e parte da energia é transferida ao estado tripleto através de um processo sem emissão de radiação. Na prática, uma técnica observacional amplamente empregada é a microscopia de fluorescência. Tal equipamento tem desempenhado um papel importante no campo da biologia celular e da fisiologia.

Desta forma, compostos que possuem intensa fluorescência têm sido estudados devido sua aplicação na medicina moderna na detecção e no tratamento de doenças, possuindo fluoróforo detectáveis por espectroscopia/microscopia de fluorescência molecular. Uma ampla gama de marcadores moleculares acessíveis que visam organelas específicas e emitem fluorescência são partes integrantes da caixa de ferramentas da moderna pesquisa biomédica (ZHITOMIRSKY; FARBER; ASSARAF, 2018).

Na área de química bioinorgânica, já citado em seções anteriores, busca-se desenvolver complexos metálicos a fim de realizar estudos no meio biológico. Estes

compostos são constituídos por um metal e um ligante orgânico. Os compostos orgânicos possuem ampla absorção de radiação em alguma extensão do espectro eletromagnético, entretanto grande parte destes absorve na região do ultravioleta. Dentre diversas moléculas, os hidrocarbonetos poliaromáticos ou heterocíclicos, são considerados bons fluoróforos ou também chamados de corantes fluorescentes (KOBAYASHI et al., 2010). Na literatura já são descritas algumas sondas orgânicas sintetizadas para detecção de zinco (Figura 9), que ao se ligarem em certas estruturas, emitem fluorescência.

Figura 9– Estrutura química da sonda fluorescente sem e na presença de zinco e seu espectro de fluorescência para estes compostos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018, com base em WEN; WANG; FAN, 2018.

Devido à interação dos grupos piridínicos com o íon metálico $Zn(2+)$, o efeito de transferência de prótons intramolecular do estado excitado da sonda e as interações metal-ligante restringe suas rotações, dificultando assim a liberação de energia por vias não-radiativas. Consequentemente, a intensidade da fluorescência é aumentada (WEN; WANG; FAN, 2018). Considerando as informações acima mencionadas, criar uma sonda molecular contendo um metal e um ligante que possuam aromaticidade e/ou sistemas conjugados podem apresentar maior desempenho no que diz respeito a emissão fluorescente.

3.4 COMPOSTOS BIOINSPIRADOS

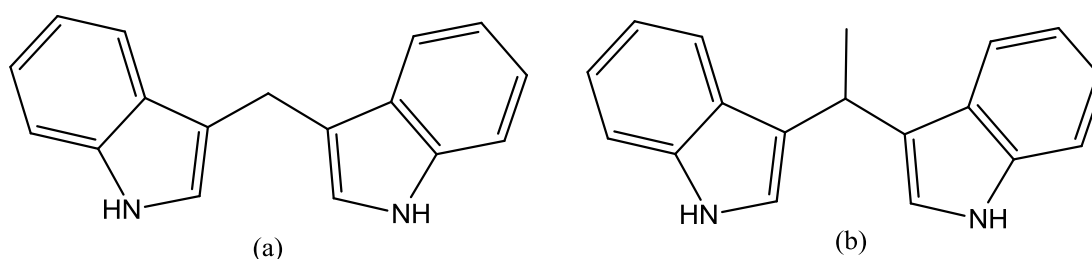
Estudos buscam entender processos naturais e enzimáticos como a hidrólise biomimética de ácidos nucleicos tais como DNA e RNA, contribuindo assim para ampliar suas aplicações na manipulação de genes, desenvolvimento de sondas

moleculares com finalidades terapêuticas. Para isso, desenvolver compostos modelos que tenham o mesmo papel que essas enzimas, proporcionam um estudo mais detalhado sobre rotas catalíticas e verificação do potencial de compostos sintetizados. Estas moléculas podem ser chamadas como modelos sintéticos quando capazes de mimetizar uma espécie nativa em apenas certas propriedades, mas sendo úteis no entendimento dos seus centros ativos e capacidade de atuação em processos semelhantes a essas espécies nativas (KATO et al., 2006).

Considerando o objetivo principal deste trabalho, cada porção dos compostos sintetizados deve ser cuidadosamente escolhida para que estes possam ser atingidos.

A unidade estrutural definida como bis(indolil)metano (BIM) (Figura 10a) está presente em vários produtos naturais isolados a partir de fontes terrestres e aquáticas (MORTEZA et al., 2010). Esses compostos exibem uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades anticancerígenas para várias linhagens de tumores. Compostos contendo BIMs de ocorrência natural como, por exemplo, vibrindol-A (Figura 10b) são úteis no tratamento de fibromialgia, fadiga crônica e síndrome do intestino irritável. Estudos apontam ainda que BIMs são capazes de inibir a proliferação de linhas de células de câncer de mama dependentes e independentes de estrogênio (KARTHIK et al., 2004; PATHAK et al., 2012).

Figura 10 - Estrutura Química do (a) bis(indolil)metano e (b) Vibrindol-A.

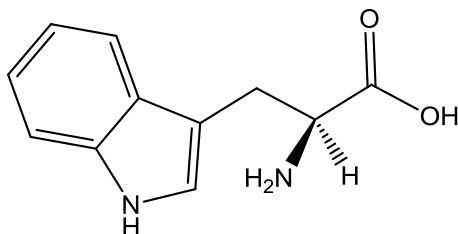


Fonte: PATHAK et al., 2012.

Outro fator relevante é que nos organismos vivos, tem-se a presença da estrutura do indol no aminoácido triptofano (Figura 11). Tal fato pode facilitar o reconhecimento dos compostos sintetizados frente aos ácidos nucleicos alvo nos testes *in vitro* e *in vivo*. Estudos onde o triptofano é utilizado como sonda fluorescente para detectar as alterações conformacionais em proteínas após a ligação à glicose também são descritas na literatura (ZELENT et al., 2011). Com

isso, pode-se deduzir que um composto de coordenação que utiliza este grupo possa também ser utilizado como sonda molecular.

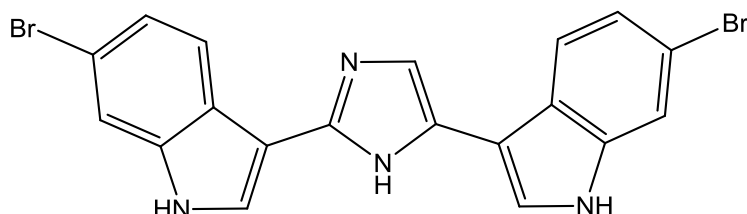
Figura 11 - Estrutura Química do aminoácido triptofano.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Compostos contendo grupos indólicos como a nortopsentina-A (Figura 12) foram estudados, sendo então verificado seu potencial na atuação como agente intercalante de DNA, além de conseguir interromper a síntese do mesmo. Além de sua alta fluorescência, este composto tem a capacidade de impedir que plasmídeos de certas bactérias consigam se replicar, cessando então o processo de proliferação (ALVARADO et al., 2013).

Figura 12 - Estrutura química do nortopsentina-A contendo grupamentos indólicos.



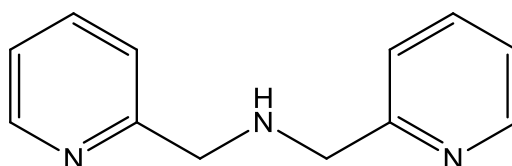
Fonte: ALVARADO et al., 2013.

Análogos de BIMs inibem o crescimento de tumores de bexiga, rins, pulmão, colo, entre outros (SASIDHAR; BIRADAR, 2013). Visando a forte influência sofrida pelo meio biológico intracelular por conta das mudanças estruturais e conformacionais do DNA induzidas por íons metálicos, isto inspira pesquisadores a investir esforços no desenvolvimento de projetos de pesquisa nesta área.

Desta forma, compostos polipiridínicos quelatos são interessantes devido a versatilidade de modos de coordenação apresentada quando centros metálicos se ligam a estes (GAVRILOVA; BOSNICH, 2004). Estas estruturas podem ser utilizadas como blocos de construção que levam a estruturas mais complexas, incluindo

sistemas com mais de uma cavidade para alojar centros metálicos (EL-HALIM; MOHAMED, 2016). Um exemplo já bem descrito na literatura é o ligante *N*-doador bis(piridilmetil)amina (**bpma**) (Figura 13). A química deste composto é muito conhecida, sendo sintetizado pela primeira vez por Romary, Bunds e Barger (1967, p. 224), sendo hoje comprovada sua estabilidade e comportamento frente a diversos íons metálicos.

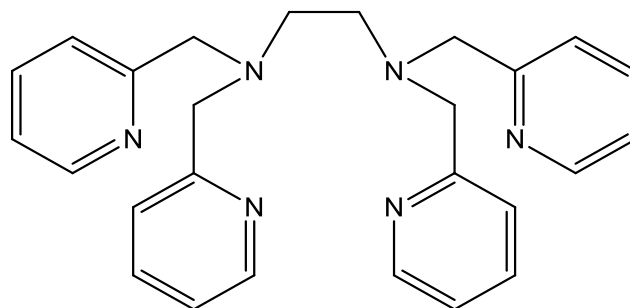
Figura 13 - Estrutura química do bpma.



Fonte: ROMARY; BUNDS; BARGER, 1967.

O bpma é um exemplo de ligante tridentado com duas piridinas quimicamente idênticas. Este reage facilmente à temperatura ambiente com sais de metais de transição produzindo sistemas em que o metal fica em um ambiente engaiolado pelos ligantes (EL-HALIM; MOHAMED, 2016). Quando ligada ao metal Zn^{2+} , sua constante de estabilidade logarítmica é $15,6 M^{-1}$ a pH 7.2, sendo um quelante forte (MEEUSEN; NOWAKOWSKI; PETERING, 2012). Na literatura são descritos diversos complexos onde na estrutura do ligante há presença do **bpma**. Um exemplo é o ligante *N,N,N',N'*-tetraquis(2-piridilmetil)etilenodiamina (TPEN) apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Estrutura química do ligante TPEN.

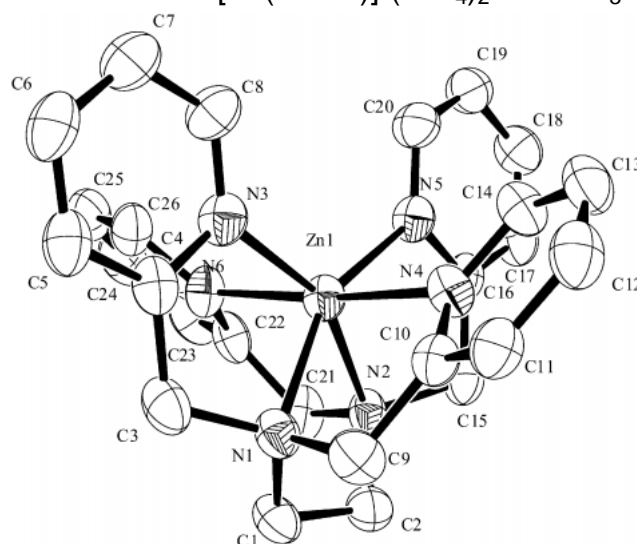


Fonte: ANDEREGG; WENK, 1967.

O TPEN que foi sintetizado por Anderegg e Wenk (1967, p. 2331) possui o grupamento bpma nos dois extremos, tratando-se então de um quelante de íons

metálicos em sua forma desprotonada (neutra), conseguindo cruzar facilmente as membranas celulares. Uma das aplicações do TPEN é ser adicionado às células para quelar com o íon Zn^{2+} lábil ou fracamente ligado no meio, a fim de torná-los funcionalmente deficientes em Zn^{2+} com o propósito de entender as respostas das células a deficiência deste metal (MEEUSEN; NOWAKOWSKI; PETERING, 2012). Complexos de zinco contendo ligante TPEN já foram descritos na literatura, conforme ilustrado pelas estruturas cristalinas da Figura 15 (MIKATA; WAKAMATSU; YANO, 2005; BLINDAUER et al., 2006).

Figura 15 – Estrutura cristalina do $[\text{Zn}(\text{TPEN})] \cdot (\text{ClO}_4)_2 \cdot 0.67\text{CH}_3\text{OH}$

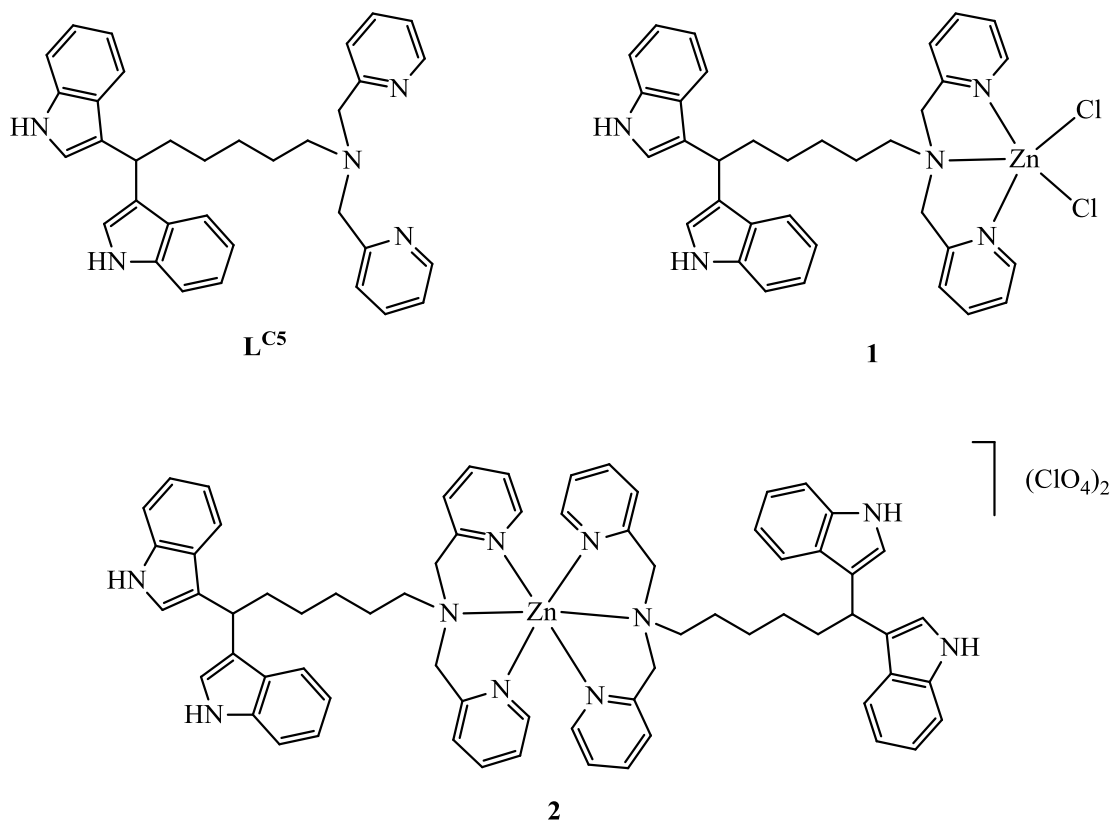


Fonte: MIKATA; WAKAMATSU; YANO, 2005

A literatura relata que o ligante TPEN possui certa fluorescência, porém não suficiente para ser utilizado como sondas fluorescentes. Porém estudos adicionando grupos aromáticos nas piridinas aumentam a níveis muito elevados a fluorescência dos compostos, sendo então conhecidos esses ligantes como o futuro no projeto de sensores fluorescentes baseados em TPEN (MIKATA et al., 2008).

Verificando o potencial das estruturas piridínicas e BIMs, busca-se, neste projeto, uni-los por meio de espaçador (cadeia alquílica), para dar origem a um novo ligante bioinspirado ainda inédito na literatura e seus respectivos complexos de zinco conforme ilustrado na Figura 16.

Figura 16 - Novo ligante bioinspirado e seus complexos de zinco, proposto neste trabalho.



4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

4.1.1 Materiais

Os seguintes reagentes, materiais e solventes utilizados nas sínteses foram adquiridos de fontes comerciais: 1,6-hexanodiol, acetato de etila, acetonitrila (purificação via destilação líquida), acetonitrila deuterada, ácido bromídrico 48%, ácido nítrico 65%, água destilada, bicarbonato de sódio, brometo de potássio, carbonato de potássio, celite 545, cloreto de zinco, clorocromato de piridínio, clorofórmio deuterado, diclorometano, éter etílico, indol, iodeto de potássio, iodo, hexano, hidróxido de sódio, metanol, perclorato de zinco hexahidratado, sílica gel 40-63 μm (230-400 mesh), sulfato de magnésio anidro, tolueno. O composto bis(piridilmetil)amina (bpma) foi sintetizado de acordo com método já descrito na literatura (NEVES et al., 1995).

4.1.2 Métodos e Instrumentação

4.1.2.1 *Cromatografia em coluna (CC) e em camada delgada (CCD)*

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de sílica gel sobre lâminas de alumínio. Como eluente, utilizaram-se soluções de hexano/acetato de etila em diferentes proporções. Os reveladores utilizados foram: iodo e solução ácida de vanilina. A purificação dos compostos, quando necessária, foi feita através de cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel 40-63 μm (230-400 mesh) e, como eluente hexano e soluções de hexano/acetato de etila em diferentes proporções (4:1, 1:1).

4.1.2.2 *Análise Elementar de C, H e N*

As medidas para a determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio com o objetivo de determinar a fórmula mínima e consequente fórmula molecular dos complexos sintetizados foram realizadas em um analisador elementar

de CHNS - Perkin-Elmer 2400 CHNS/O Series II, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC.

4.1.2.3 *Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)*

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker Vertex70, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4,0 cm^{-1} , no departamento de Química da UFPR. As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr (grau espectroscópico).

4.1.2.4 *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

A pureza e estrutura de compostos orgânicos (pró-ligantes e ligantes finais), bem como dos complexos sintetizados foram submetidas à técnica de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais de hidrogênio (^1H), carbono (^{13}C) e nitrogênio (^{15}N), quando conveniente. Tais análises foram realizadas em um espectrômetro FT-NMR Bruker ASCEND400 no Laboratório de Análise Instrumental – LAI, Departamento de Química – CCT/UDESC. Os deslocamentos químicos foram registrados em partes por milhão (ppm), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm), além de clorofórmio ou acetonitrila deuterada como solvente.

4.1.2.5 *Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-EM)*

Os precursores utilizados na síntese do ligante L^{C5} tiveram suas sínteses acompanhadas via em um CG-EM Shimadzu QP2010-Plus no Laboratório de Análise Instrumental – LAI, do Departamento de Química do CCT/UDESC com split 1:20, sendo a temperatura do injetor 250 °C, rampa de aquecimento partindo de 60 °C (1min) até 250 °C (5min) em uma taxa crescente de 10 °C min^{-1} . A fase móvel utilizada foi hélio 5.0 com fluxo de 1,0 mL min^{-1} . Tanto a fonte de íons quanto sua interface foi mantida em 250 °C. Dados de espectrometria de massas foram registrados entre 34-400 Da.

4.1.2.6 Espectrometria de massa com ionização por “electrospray” (ESI-MS)

Tanto o ligante final, bem como seus complexos de zinco foram estudados via espectrometria de massa com ionização via *electrospray* (ESI-MS). Os espectros foram medidos no modo positivo em um equipamento amaZon Ion Trap (Bruker Daltonics) do Centro de Biologia Molecular Estrutural – CEBIME, da UFSC. As análises realizadas partiram-se da dissolução dos compostos em acetonitrila grau MS (ultrapura) em uma concentração de aproximadamente 500 ppb. A condição da fonte de íons foi uma tensão de spray iônico de 4,5 kV. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador (20 psi) e gás de cortina (10 psi), onde as amostras foram diretamente infundidas no espectrômetro de massas a uma vazão de 180 $\mu\text{L h}^{-1}$. A faixa de razão massa/carga (m/z) foi de 150 a 2000 Da. A temperatura do capilar será mantida entre 180 e 200 °C e sua voltagem entre -400 e -500 V.

4.1.2.7 Condutometria

As análises de condutividade molar do complexo foram realizadas em um condutivímetro MS Tecnopon modelo mCA150 no Laboratório de Análise Instrumental – LAI, Departamento de Química – CCT/UDESC. Acetonitrila destilada e seca em peneira molecular foi empregada como solvente, onde a concentração dos compostos analisados foi $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. As análises foram realizadas após a calibração do equipamento com solução aquosa padrão de KCl ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ - $\Lambda_M = 1408 \mu\text{S}$) à temperatura de $25,00 \pm 0,05 \text{ }^\circ\text{C}$ (LIDE, 2000).

4.1.2.8 Espectroscopia Eletrônica

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo foram gerados para o ligante e para os complexos em um espectrofotômetro SHIMADZU UV3600plus, no Laboratório de Análise Instrumental – LAI do Departamento de Química – CCT/UDESC. As análises foram realizadas utilizando acetonitrila de grau espectroscópico e proporções de $\text{CH}_3\text{CN/HEPES}$ em cubetas de quartzo com capacidade para 4 mL e 1,00 cm de caminho ótico. Os valores de coeficiente de absorção (ϵ) são dados em $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.1.2.9 Cálculo de Estrutura Eletrônica (TD-DFT)

As otimizações de geometria dos complexos sintetizados foram realizadas no vácuo, utilizando o software Orca 4.0.1 (NEESE, 2012) no nível DFT usando o funcional BP86 (BECKE, 1988; PEDEW, 1986). O conjunto de bases escolhido foi Def2-TZVP para o átomo de zinco e Def2-SVP para os outros átomos (SCHAFFER; HORN; AHLRICHS, 1992; SCHAFFER; HUBER; AHLRICHS, 1994; WEIGEND; AHLRICHS, 2005). Os cálculos também incluíram correção de dispersão de Grimme com amortecimento D3BJ (GRIMME et al. 2010; GRIMME; EHRLICH; GOERIGK, 2011) e resolução de identidade para a parte Coulombica, com a base auxiliar correspondente (KOSSMANN; NEESE, 2010; ZHANG; YANG, 1998). As frequências vibracionais para ambos os complexos não mostraram frequências imaginárias. Para predição dos espectros de absorção, utilizou-se TD-DFT/TDA para se obter as primeiras 50 excitações singleto-singleto, utilizando o mesmo protocolo de cálculo, diferindo apenas no funcional, que neste caso foi PBE0 (PERDEW; BURKE; ERNZERHOF, 1996; PERDEW; BURKE; ERNZERHOF, 1997). As representações geométricas dos complexos foram obtidas utilizando o programa Chemcraft (CHEMCRAFT).

4.1.2.10 Estudos de interação com o DNA via UV-Vis

Os estudos de interação entre os complexos e o DNA extraído do esperma de salmão (ssDNA) foram realizados através de um experimento de titulação espectrofotométrica, onde a concentração inicial de **1** e **2** foi ajustada em $2,5 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. A concentração de DNA variou entre 0 e $4,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ para os estudos do complexo **1**, 0 e $7,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ para os estudos com o complexo **2**. A concentração de DNA por nucleotídeo foi determinada considerando a absorvidade molar (ϵ) desta biomolécula em 260 nm como $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (NAGARAJ et al., 2014). O meio adotado foi acetonitrila/tampão 50% v/v. Força iônica foi mantida constante com NaCl 50 mmol.L⁻¹; pH fixo em 7,0 através do tampão biológico HEPES 50 mmol.L⁻¹. A absorção do próprio DNA foi descontada pela adição de quantidades iguais deste na cubeta contendo os complexos e na cubeta contendo a solução de referência.

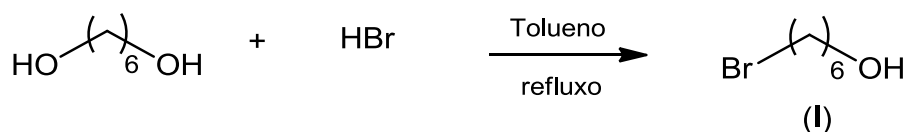
4.1.2.11 Estudos de interação com o DNA via Fluorescência Molecular

Os testes de interação entre os complexos sintetizados e o DNA foram conduzidos em um espectrofluorímetro Cary Eclipse da Agilent Technologies. Para estes ensaios, os complexos **1** e **2** foram dissolvidos em acetonitrila/tampão 50% v/v (pH 7,02 – HEPES) e ajustados as concentrações entre 1,0 e 300 μM , respectivamente. A estas soluções, alíquotas de *calf-thymus* (CT) DNA foram adicionadas e as variações espectrais foram analisadas. No sentido de investigar os possíveis mecanismos de interação entre **1** e **2** e o CT-DNA soluções com concentração de 5 μM foram tratadas com CT-DNA (50 μM) e em seguida foram adicionadas alíquotas de 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de netropsina (VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1982) ou verde de metila (KIM; NORDEN, 1993) para cada um dos complexos, respectivamente. Para avaliar possíveis interações eletrostáticas entre os complexos e o DNA, estes foram submetidos às mesmas condições do experimento anterior (agentes ligadores de sulco) e então alíquotas de uma solução salina de NaCl (50 e 100 μM) foram adicionadas. Para todos os ensaios o comprimento de onda de excitação foi 360 nm.

4.2 SÍNTESES DO LIGANTE

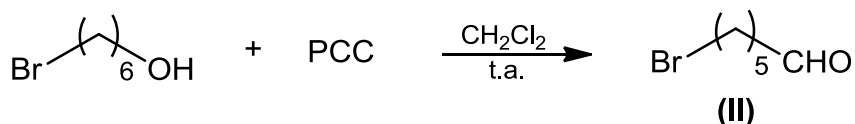
A seguir são apresentadas a síntese do ligante 6,6-di(1*H*-indol-3-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)hexan-1-amina (**L^{C5}**) e seus precursores (**I-III**). O composto bis(piridin-2-ilmetil)amina (**bpma**) foi sintetizado e caracterizado de acordo com o método já descrito na literatura (NEVES et al., 1995). Tanto os precursores quanto o ligante final tiveram suas sínteses acompanhadas e/ou otimizadas via CCD e CG-EM quando conveniente. Os produtos de interesse de cada etapa foram caracterizados via espectroscopias IV e RMN de ^1H e ^{13}C . O ligante final **L^{C5}** foi ainda caracterizando por ESI-MS.

4.2.1 Síntese do 6-bromohexan-1-ol (I)



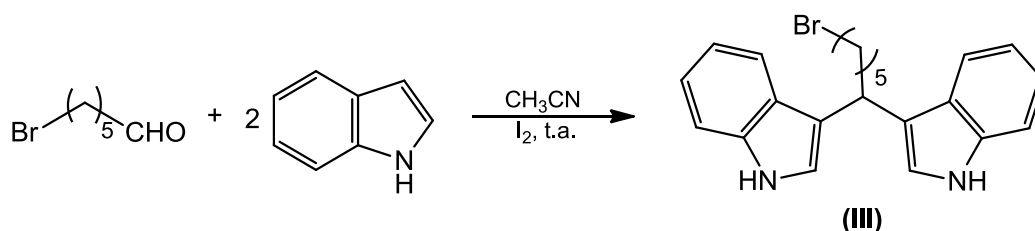
O composto **I** foi sintetizado baseado no método descrito por Chong e colaboradores (CHONG; HEUFT; RABBAT, 2000). Em um balão de fundo redondo de 100 mL, 2,363 g (20 mmol; 118,17 g mol⁻¹) de hexan-1,6-diol e 3,93 mL de HBr 48% (20 mmol; 80,91 g mol⁻¹; 1.49 g mL⁻¹) foram misturados em 50 mL de tolueno e submetidos a refluxo sob agitação magnética por 2 horas e 45 minutos. Após o arrefecimento, a mistura foi transferida para um funil de separação com 20 mL de acetato de etila e lavada três vezes com 20 mL de uma solução aquosa saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi seca sobre MgSO₄ anidro e o solvente foi rotaevaporado sob pressão reduzida obtendo um óleo amarelo claro. Rendimento: 94 % (3,404 g, 18,80 mmol; 181,07 g mol⁻¹).

4.2.2 Síntese do 6-bromohexanal (II)



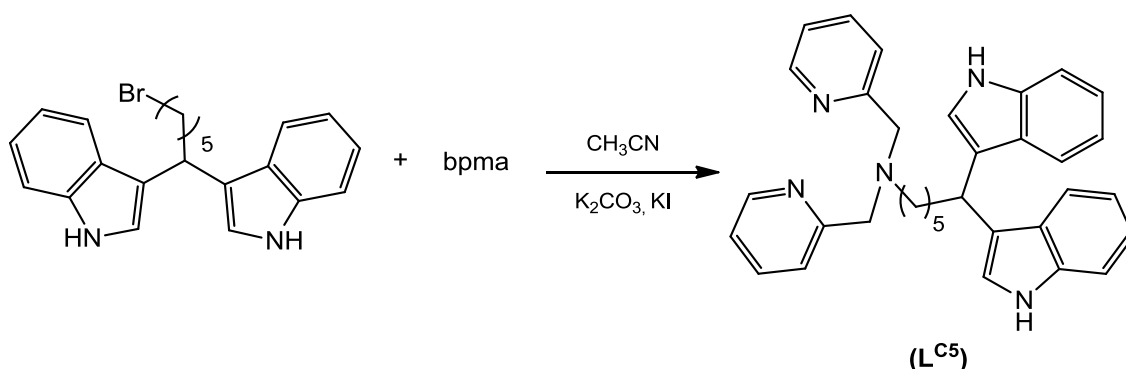
O composto **II** foi sintetizado seguindo o método descrito por Trost e Lautens (1987, p. 1475). Em um banho de gelo com um balão de fundo redondo de 100 mL, 3,396 g (18,75 mmol; 181,07 g mol⁻¹) de 6-bromohexan-1-ol foi dissolvido em 30 mL de diclorometano seguido por 6,035 g de clorocromato de piridínio (PCC) (28,12 mmol; 215,56 g mol⁻¹) adicionado lentamente à mistura sob agitação magnética. A reação foi mantida em banho de gelo durante 15 minutos e, depois disso, à temperatura ambiente durante 3 horas e 20 minutos. Adicionou-se então éter etílico (200 mL) à suspensão e depois filtrou-se a mistura em uma camada de Celite545. A evaporação sob pressão reduzida produziu um líquido verde claro. Rendimento: 72% (2,354 g, 13,15 mmol; 179,05 g mol⁻¹).

4.2.3 Síntese do 3,3'-(6-bromohexano-1,1-diil)bis(1-*H*-indol) (III)



O composto **III** foi sintetizado baseando-se no método descrito por Bandgar e Shaikh (2003, p. 1959). Uma reação típica deve ser sintetizada em uma escala de 1 mmol para obter melhores rendimentos. Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,179 g (1 mmol; 179,05 g mol⁻¹) de 6-bromohexanal em 1 mL de CH₃CN seguido por 0,234 g de indol (2 mmol; 117,15 g mol⁻¹). Após 1 minuto 0,051 g (0,2 mmol; 253,81 g mol⁻¹) de iodo molecular macerado foi adicionado à mistura e a reação foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação magnética durante 2 minutos. Esta mistura foi então transferida para um funil de separação com 20 mL de acetato de etila e lavada três vezes com 20 mL de uma solução aquosa 15 % de Na₂S₂O₃. A fase orgânica foi seca sobre MgSO₄ anidro e o solvente foi rotaevaporado sob pressão reduzida produzindo um óleo avermelhado intenso. O produto bruto foi purificado via cromatografia em coluna (acetato de etila: hexano = 1:4 e sílica gel 40-63 µm (230-400 mesh) para proporcionar o produto puro de cor vermelho claro. Rendimento: 53 % (0,210 g, 0,530 mmol; 395,34 g mol⁻¹).

4.2.4 Síntese do 6,6-di(1*H*-indol-3-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)hexan-1-amina(L^{C5})

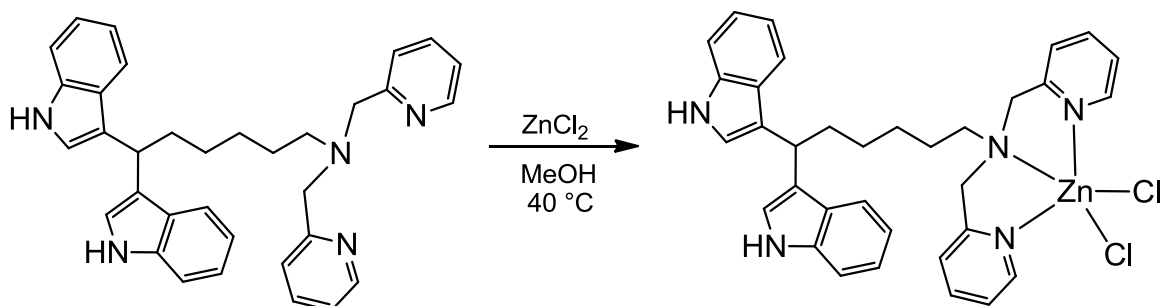


O ligante final foi sintetizado da seguinte forma: Em um balão de fundo redondo de 100 mL 2,095 g (5,30 mmol; 395,34 g mol⁻¹) de **III**, 1,760 g de iodeto de

potássio (10,60 mmol; 166,00 g mol⁻¹), 1,465 g de carbonato de potássio (10,60 mmol; 138,21 g mol⁻¹), e 1,056 g de **bpma** (5,30 mmol; 199,25 g mol⁻¹), foi misturado em 50 mL de acetonitrila e deixado em agitação magnética sob refluxo por 24 horas. A acetonitrila foi removida por evaporação rotativa e a mistura foi transferida para um funil de separação com 20 mL de acetato de etila e lavada três vezes com 20 mL de uma solução aquosa saturada de NaHCO₃. a fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida produzindo uma espuma castanho-claro que foi utilizada sem maiores purificações. Rendimento: 73 % (1,987 g, 3,89 mmol; 513,68 g mol⁻¹).

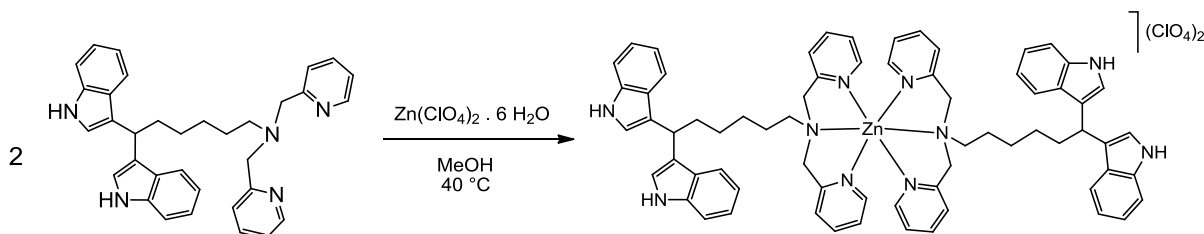
4.3 SÍNTESES DOS COMPLEXOS

4.2.1 Síntese do 6,6-di(1*H*-indol-3-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)hexan-1-aminodiclorozinco(2+) – [Zn(L^{C5})Cl₂] • 2 CH₃OH (1)



O complexo **1** foi sintetizado por adição gota a gota de uma solução do ligante **L^{C5}** em 20 mL de metanol (0,257 g; 0,5 mmol; 513,68 g mol⁻¹) em uma solução de ZnCl₂ (0,0681 g; 0,5 mmol; 136,28 g mol⁻¹) também dissolvido em metanol (15 mL). Durante a adição do ligante, formou-se um sólido amarelo claro. Manteve-se a mistura sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante 10 minutos e depois se arrefeceu a -5 °C durante 1 hora para maximizar a precipitação. O precipitado suspenso foi filtrado, lavado com metanol gelado e éter etílico e seco em alto vácuo. Rendimento: 38 % (0,136 g; 0,190 mmol; 714,04 g mol⁻¹) baseado no ligante.

4.2.2 Síntese do perclorato de *bis*{6,6-di(1*H*-indol-3-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)hexan-1-amino}zinco(2+) – [Zn(L^{C5})₂](ClO₄)₂ (**2**)



O complexo **2** foi sintetizado por adição gota a gota de uma solução de ligante L^{C5} em 20 mL de metanol (0,514 g; 1,0 mmol; 513,68 g mol⁻¹) em $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (0,186 g; 0,5 mmol; 372,37 g mol⁻¹) dissolvido em metanol (15 mL) também. Durante a adição do ligante, formou-se um sólido amarelo claro. A mistura foi mantida sob agitação magnética, a 40 °C até o volume final ser reduzido para 20 mL e, em seguida, resfriado à temperatura ambiente. O precipitado suspenso foi filtrado, lavado com metanol frio e éter etílico e seco em alto vácuo. Rendimento: 85% (0,136 g; 0,190 mmol; 1291,63 g mol⁻¹) baseado no ligante.

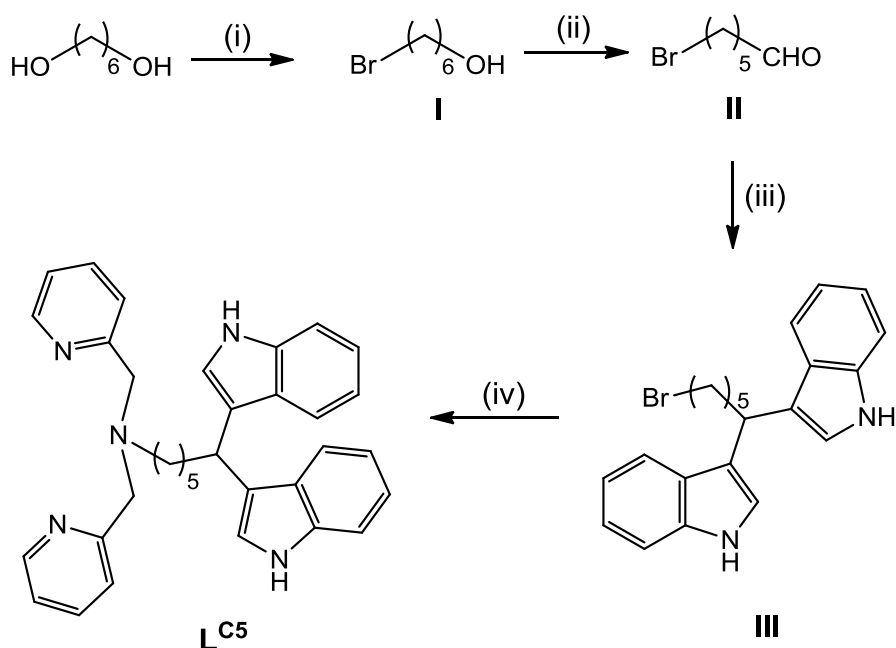
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentadas as caracterizações e respectivas discussões relativas às sínteses do ligante e dos complexos, bem como os testes realizados para verificar o potencial como sonda fluorescente para ácidos nucleico.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE

Para a obtenção do ligante L^{C5} partiu-se de uma reação de halogenação sob refluxo do respectivo hexan-1,6-diol com HBr em tolueno para gerar o produto **I**. Quando **I** é submetido a uma oxidação com clorocromato de piridínio (PCC), em diclorometano e temperatura ambiente, o produto **II** foi prontamente obtido. O composto **III** foi sintetizado a partir de uma condensação de dois equivalentes de indol com **II** na presença de iodo molecular em acetonitrila. Finalmente, o ligante bioinspirado L^{C5} foi preparado através de uma reação com bpma (NEVES et al., 1995) sobre o produto **III**. A rota sintética com as reações está resumidas na Figura 17.

Figura 17 - Rota sintética executada para o ligante L^{C5} . Condições: (i) HBr, tolueno, refluxo; (ii) PCC, CH_2Cl_2 , t.a.; (iii) Indol (2 eqv.), I_2 , CH_3CN , t.a.; (iv) bpma, K_2CO_3 , KI, CH_3CN , refluxo.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

O composto **L^{C5}** é solúvel em solventes orgânicos polares como clorofórmio, diclorometano, metanol, acetonitrila, DMF e DMSO, mas insolúveis em solventes não polares *n*-hexano, THF e éter dietílico.

5.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho foi essencial para a caracterização preliminar dos pró-ligantes e do ligante sintetizado. Com esta análise foram coletadas informações referentes as bandas formadas pelas vibrações das ligações químicas existentes nos compostos sintetizados e devidamente atribuídas conforme apresentada na Tabela 1 (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

Tabela 1 – Modos vibracionais e números de onda (cm⁻¹) do **L^{C5}** e seus precursores (I-III).

	I	II	III	L^{C5}
ν (O-H)	3378	3410	-	-
ν (C-H _{alif})	2933 e 2854	2929 e 2854	2923 e 2855	2928 e 2853
δ (CH _{2 alif})	1456	1454	1454	1459
δ (CH ₂ -Br)	1261	1254	1237	-
ν (C-H _{ald})	-	2730-2750	-	-
ν (C-Br)	1049 e 643	1073 e 642	1035 e 584	-
ν (C=O)	-	1732	-	-
ν (N-H)	-	-	3413	3415
ν (C-H _{ar})	-	-	3053	3366-3096
ν (C-O)	1224	-	-	-
ν (C=C)	-	-	1615 e 1414	1620 e 1433
ν (C=N)	-	-		1585
δ (C=N)	-	-	-	619
ν (C-N)	-	-	1089	1095
δ (C-H _{arom})	-	-	743	738

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

No espectro vibracional de IV do composto **I** (APÊNDICE A) ocorreu a diminuição da largura e intensidade da banda característica O-H, comparativamente

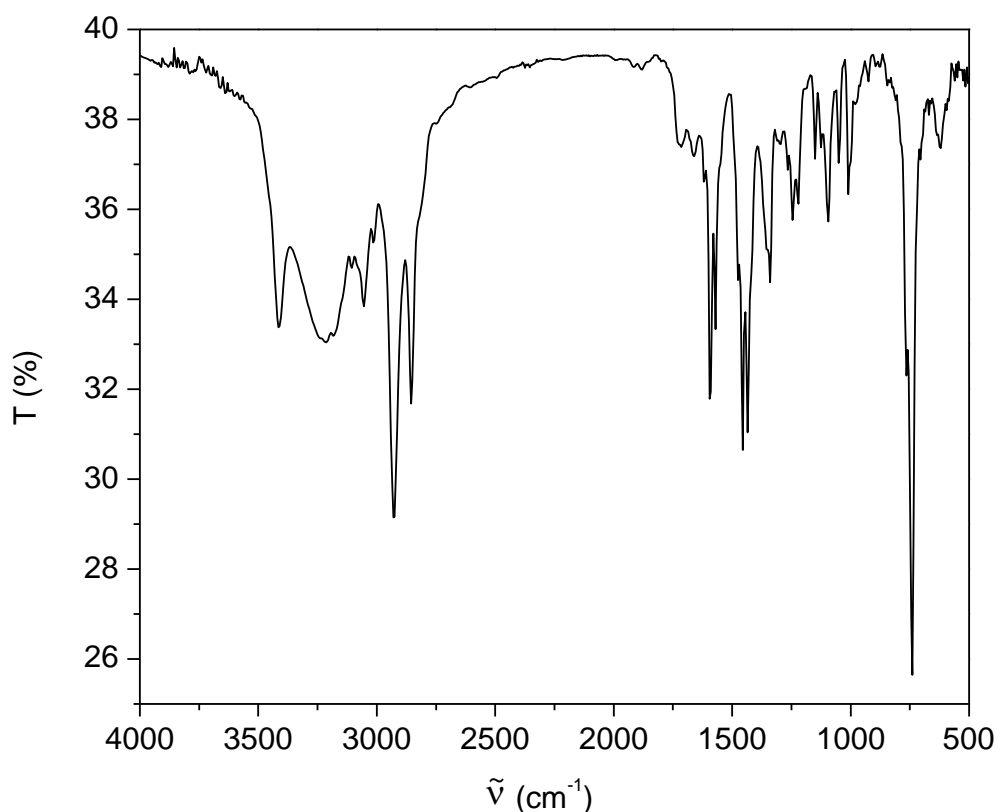
ao seu material de partida (1,6-hexanodiol) (HAMMINGA, et al., 2004). Bandas do estiramento da ligação C-Br foram observadas em 1049 e 643 cm^{-1} e da deformação angular de $\text{CH}_2\text{-Br}$ em 1261 cm^{-1} , indicando a obtenção do composto **I** (PAVIA et al., 2010, p. 82).

Quando **I** sofre oxidação, houve o desaparecimento da banda em 1224 cm^{-1} da ligação C-O, no espectro de **II** (APÊNDICE B), dando origem a estreita e intensa banda em 1732 cm^{-1} característica da carbonila do aldeído presente em **II**. Segundo Pavia et al. (2010, p. 55) os estiramentos de C-H de aldeído, na maioria das vezes, são mascarados pelas bandas de C-H alquílicas, dificultando essa observação. Porém pode-se analisar de forma qualitativa que a intensidade das bandas em 2929 e 2854 cm^{-1} estavam muito maiores comparativamente ao composto **I**, podendo supor que há presença da banda C-H do respectivo aldeído.

No espectro de IV do composto **III** (APÊNDICE C), verificou-se a origem de novas bandas nas regiões aromáticas e notou-se o desaparecimento da intensa banda carbonílica em 1732 cm^{-1} , além da inserção das bandas dos estiramentos e deformações angulares fora do plano dos C-H aromáticos em 3053 e 743 cm^{-1} , respectivamente. Em 3413, 1615 e 1414, e 1089 cm^{-1} estão presentes as bandas da ligação N-H, C=C e C-N características do grupo indol semelhantes aos descritos em SILVEIRA et al. (2012, p. 2918).

O L^{C5} foi gerado inserindo o grupo **bpma** (NEVES et al., 1995) em **III**, obtendo o espectro apresentado na Figura 18. Com a Figura 18 e os estiramentos apresentados na Tabela 1, percebe-se que a intensidade das bandas referentes aos aromáticos aumentaram. Verificou-se que não há presença das bandas que representam a ligação C-Br, gerando um maior número de bandas referentes aos aromáticos. Isto é decorrente da inserção do grupo **bpma**, que possui em sua estrutura piridinas.

Figura 18 - Espectro de infravermelho do ligante L^{C5} em pastilha de KBr.



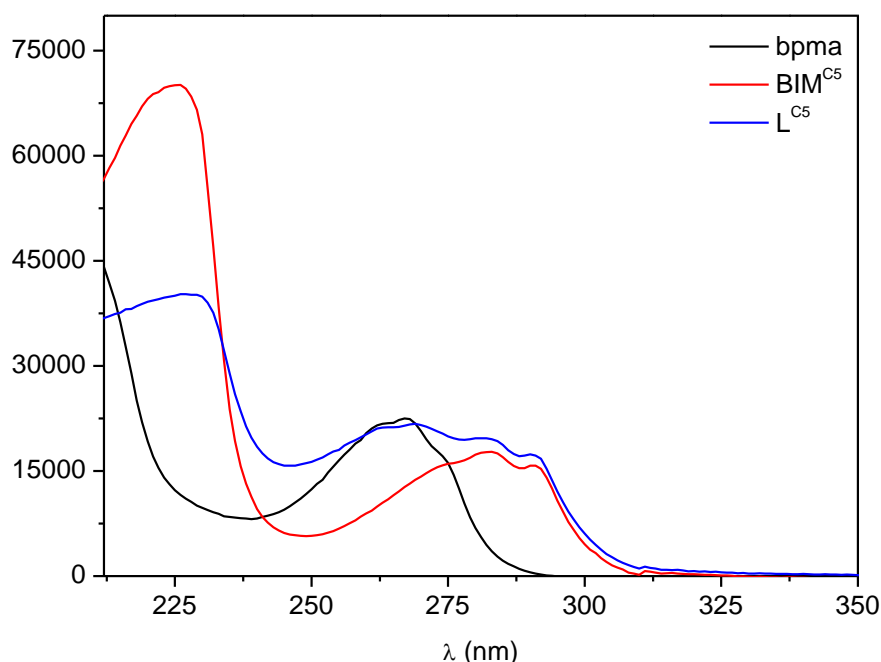
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Observou-se ainda o frequente par do estiramento das ligações aromáticas C=C (1620 e 1433 cm^{-1}) e duas novas bandas referentes ao estiramento e dobramento da ligação C=N (1585 e 619 cm^{-1}) das piridinas do **bpma** visto também por El-Halim e Mohamed (2016, p. 93) para o mesmo composto. Na região de 2994 a 2876 cm^{-1} estão presentes bandas referentes aos estiramentos C-H do esqueleto metilênico proveniente da cadeia alquílica.

5.1.2 Espectroscopia Eletrônica (UV-Vis)

Com o objetivo de determinar cada região de absorção dos grupos cromóforos existentes no ligante final L^{C5} , um estudo quantitativo via espectroscopia eletrônica foi realizado onde, entre 210 e 350 nm , foram medidos as absorções de L^{C5} , do pró-ligante bpma e do composto **III** (*bis*(indolil)metano com sua cadeia espaçadora – BIM C5), utilizando acetonitrila como solvente. A sobreposição destes três espectros eletrônicos está apresentada na Figura 19.

Figura 19 – Sobreposição dos espectros eletrônicos do **bpma**, composto **III** (BIM^{C5}) e do L^{C5} em solução de acetonitrila. Concentrações: $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (todos).



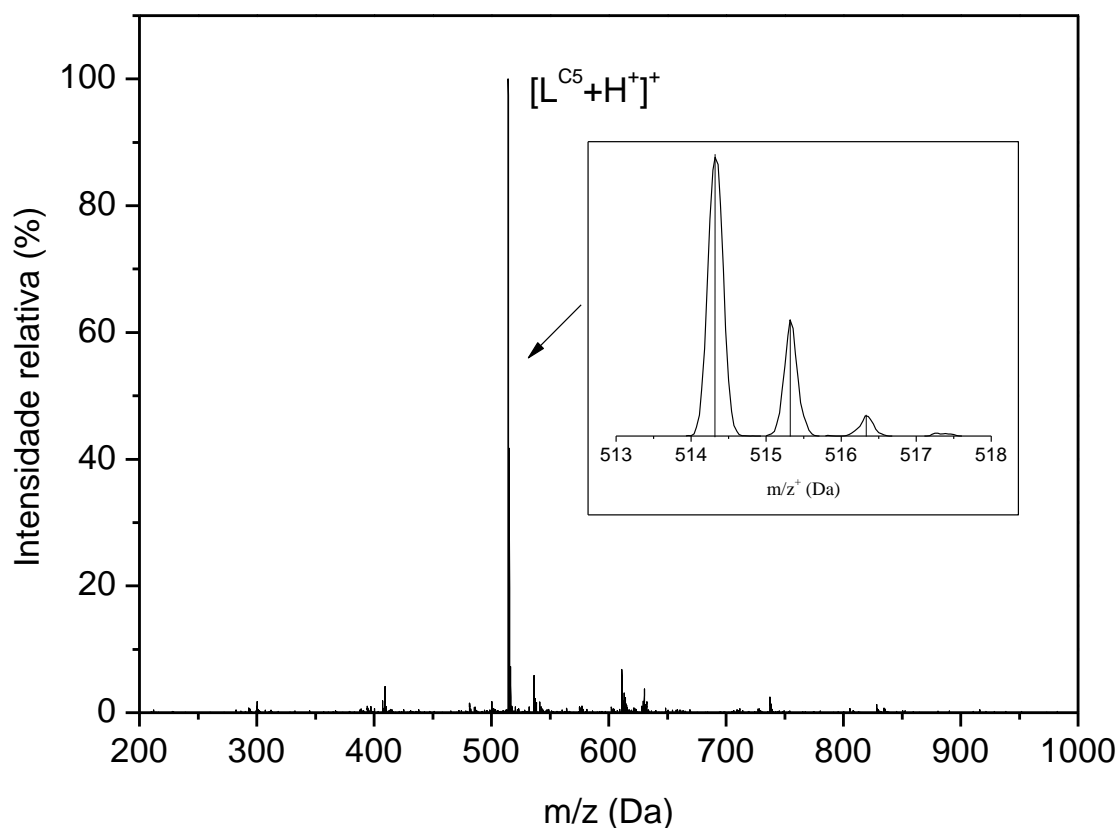
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Claramente é possível visualizar que o espectro eletrônico de L^{C5} é composto pelos espectros de suas moléculas precursoras (Figura 19). Considerando os altos valores de coeficiente de absorção (ϵ), todos estes processos podem ser classificados como transferências de carga (ATKINS et al., 2010). Uma discussão mais abrangente considerando a completa atribuição das transições eletrônicas responsáveis por estas absorções serão feitas na seção 5.2.7 deste trabalho.

5.1.3 Espectroscopia de Massa com Ionização por “Electrospray” (ESI-MS)

A espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS) é uma técnica de ionização suave que permite identificar a presença dos íons moleculares das substâncias de interesse bem como, em algumas vezes, a presença de fragmentos destas. Na Figura 20 consta a imagem do espectro de massas em acetonitrila ultrapura do ligante L^{C5} .

Figura 20 - Espectro de ESI(+)-MS (modo positivo) para o ligante L^{C5} em acetonitrila ultrapura e sua distribuição isotópica. Experimental (barras) e calculado (linha).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

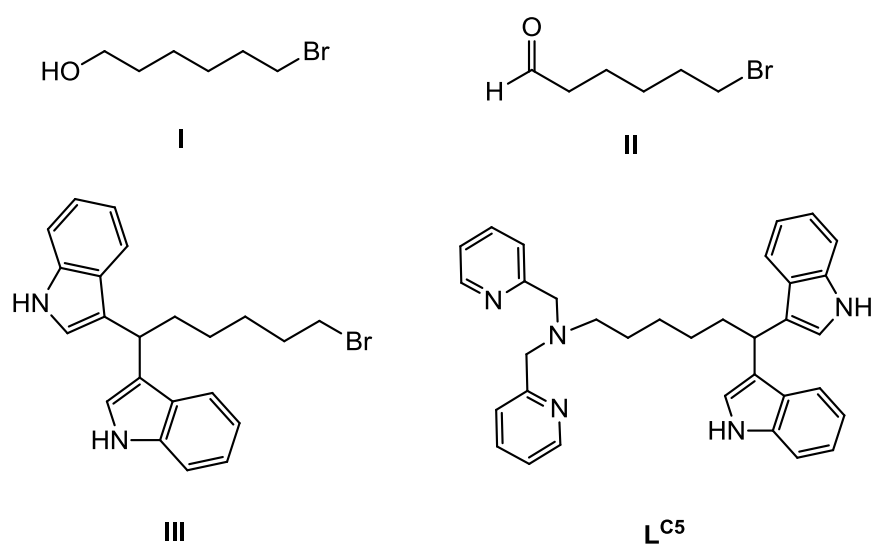
No espectro do ligante L^{C5} de massa molar $513,68 \text{ g.mol}^{-1}$, há presença de um conjunto de picos relevante com razão m/z 514,29 Da, sendo este atribuído ao cátion aduto $\{[L^{C5} + H^+]\}$ referente ao ligante sintetizado e um próton proveniente da solução. Inserido na Figura 20, tem-se o perfil de distribuição isotópica com uma sequência de picos onde constam a razão m/z de 514,29 (M^+ , 100), 515,31 (41,51), 516,32 (7,25) (dados experimentais) e o respectivo espectro de massas calculado (linha) via software mMass (STROHALM et al., 2008; STROHALM et al., 2010). Nenhum outro sinal relevante foi encontrado durante o processo de varredura de massas, indicando que o composto obtido tem composição química condizente com a molécula de interesse.

5.1.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - RMN

A espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C foi uma técnica bastante útil para a caracterização dos compostos orgânicos sintetizados. Para os precursores do ligante L^{C5} foram realizadas apenas análises unidimensionais a fim de verificar pureza e os principais picos dos compostos esperados. Para o L^{C5} , devido a complexidade da molécula, foram necessárias a utilização de técnicas unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D) e, a partir dos deslocamentos químicos e a integração dos sinais observados nos espectros, foi possível determinar o número de átomos de hidrogênio e carbono presentes no composto, assim como suas inequívocas distinções e atribuições.

Os valores de deslocamento químico (δ , ppm), o número de átomos de hidrogênio correspondentes e as atribuições dos sinais obtidos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012) para o L^{C5} e seus precursores (Figura 21), estão listados na Tabela 2. A atribuição de multiplicidade bem como os cálculos referentes às constantes de acoplamento (J) foram efetuados para os sinais com resolução adequada para tal.

Figura 21 - Estrutura química do ligante L^{C5} e seu precursores.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Tabela 2 – Espectro de RMN de ^1H com as atribuições para o L^{C5} e seus precursores.

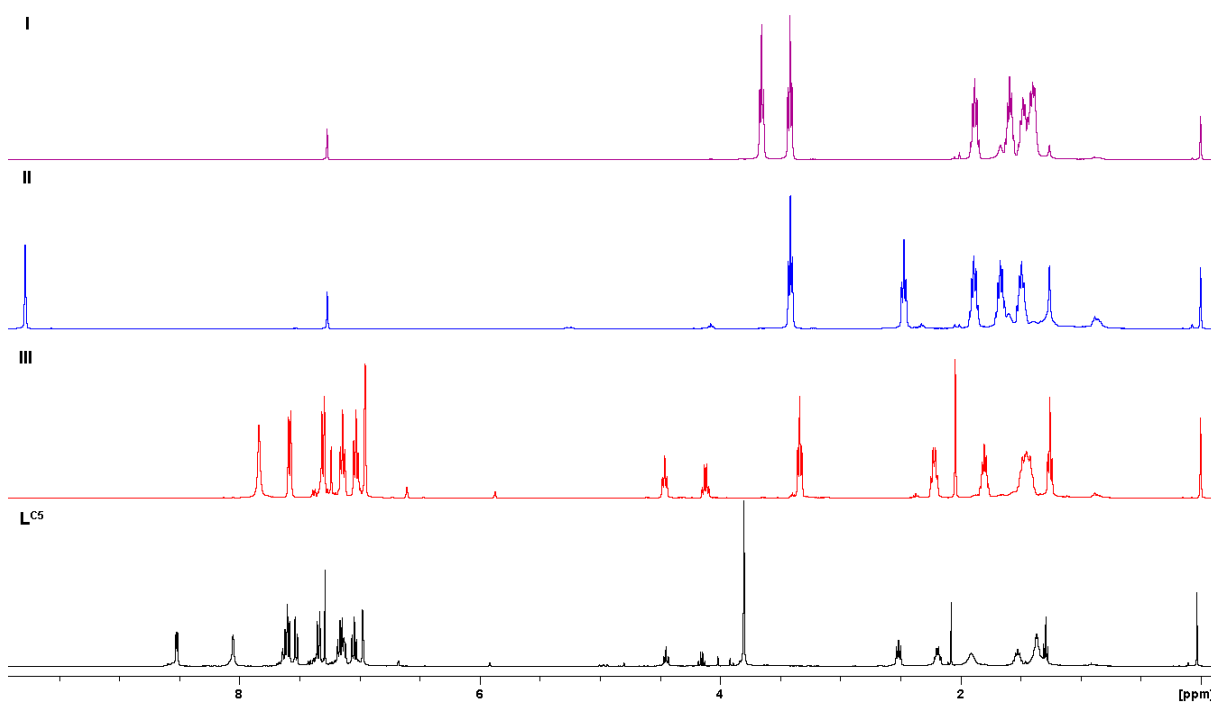
Hidrogênios	I	II	III	L^{C5}
	$\delta / \text{M} / J (\text{Hz})$	$\delta / \text{M} / J (\text{Hz})$	$\delta / \text{M} / J (\text{Hz})$	$\delta / \text{M} / J (\text{Hz})$
H-N			7,66/ s	9,06/ s
H _{ald.}	-	9,78/ s	-	-
H _l	3,42/ t/ 6,86	3,41/ t/ 6,48	3,29/ t/ 6,88	2,42/ t/ 7,17
H _m	1,59/ qn/ 7,08	1,88/ qn/ 6,82	1,75/ qn/ 6,83	1,44/ qn/ 6,88
H _n	1,53-1,35/ m	1,49/ m	1,48-1,33/ m	1,37-1,20/ m
H _o	1,53-1,35/ m	1,617/ m	1,27-1,21/ m	1,37-1,20/ m
H _p	1,88/ qn/ 7,08	2,47/ t/ 7,16	2,17/ q/ 7,31	2,14/ q/ 7,61
H _j	3,65/ t/ 6,41	-	4,42 /t/ 7,19	4,36/ t/ 7,61
H _f	-	-	7,56/ d/ 8,74	7,45/ d/ 7,61
H _g	-	-	7,01/ t/ 7,60	6,89/ t/ 7,61
H _h	-	-	7,11/ t/ 7,82	7,03/ t/ 7,61
H _i	-	-	7,22/ d/ 8,02	7,33/ d/ 7,61
H _e	-	-	7,17/ s	7,09/ s
H _j	-	-	-	3,69/ s
H _d	-	-	-	7,49/ d/ 7,61
H _c	-	-	-	7,63/ t/ 7,61
H _b	-	-	-	7,17-7,11/ m
H _a	-	-	-	8,43/ d/ 4,03

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 22) e ^{13}C (Figura 23) do ligante e seus precursores foram realizados e sobrepostos para melhor visualização das mudanças ocorridas conforme realizadas as sínteses. No espectro de RMN de ^1H (Figura 22), o composto I apresenta dois tripletos deslocados à campo baixo (maior deslocamento químico). No material de partida, hexan-1,6-diol, há presença de apenas um tripleto em 3,62 ppm como visto em *Spectral Database for Organic Compounds* (SDBS) referente aos hidrogênios vizinhos ao átomo de oxigênio dos grupos OH. Quando este composto passa por uma reação de halogenação com ácido bromídrico, o espectro de RMN do composto I apresenta um segundo tripleto em 3,42 ppm (2H, $J = 6,86 \text{ Hz}$), em campo mais alto (menor deslocamento químico), indicando que um

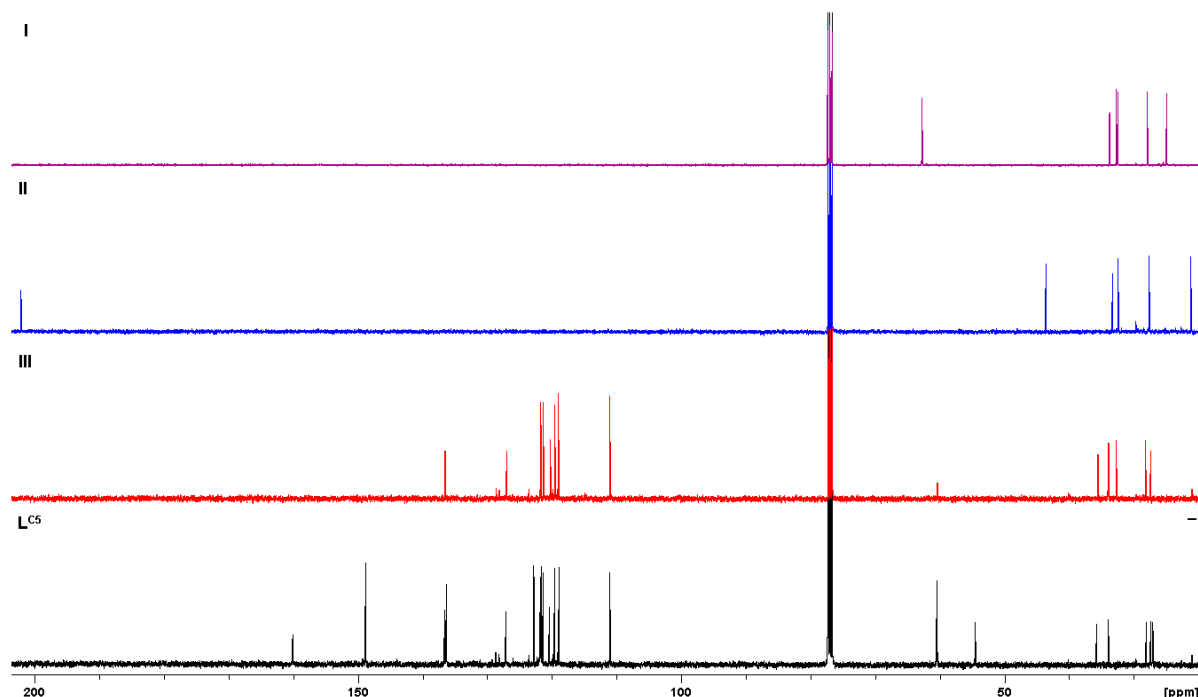
grupo metilênico está agora ligado ao átomo de bromo. O pico referente aos hidrogênios do metileno que está ligado ao oxigênio possui um deslocamento químico maior, pois este átomo eletronegativo possui efeitos de retirada de elétrons, reduzindo a densidade eletrônica de valência ao redor dos prótons ligados aquele carbono, afirmando que estes hidrogênios estão desblindados (PAVIA et al., 2010, p. 119). Este efeito foi observado novamente no espectro de RMN de ^{13}C na (Figura 23) deste mesmo composto, onde o carbono ligado diretamente ao oxigênio possui um deslocamento químico de 62,78 ppm enquanto que o carbono ligado ao bromo está localizado em 33,73 ppm.

Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H para I, II, III e para o L^{C5} de 400MHz (25 °C) dissolvido em CDCl_3 .



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C para **I**, **II**, **III** e para o **L^{C5}** de 400MHz (25 °C) dissolvido em CDCl_3 .



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Confirmando o processo de oxidação do álcool primário ao seu respectivo aldeído, o espectro de ^1H (Figura 22) do composto **II** mostra o desaparecimento do tripleto (3,65 ppm, 2H, $J = 6,41$ Hz), metileno vizinho ao oxigênio. Entretanto, pode-se visualizar (Tabela 2) o aparecimento de um tripleto dos hidrogênios vizinhos ao grupo aldeído em 2.47 ppm (2H, $J = 7,16$ Hz) (PAVIA et al., 2010). Observou-se também um simpleto em 9.78 (s, 1H) característico do hidrogênio desblindado ligado ao carbono da carbonila. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23), devido a alta desblindagem do carbono carbonílico, em 202,15 ppm tem-se o sinal de ressonância deste enquanto os carbonos da cadeia alquílica permanecem na faixa de 43-20 ppm (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

O bisindolilmetano (**III**) de cadeia alifática foi então obtido pela condensação do aldeído (**II**) sintetizado previamente com dois equivalentes de indol (iii) na presença de iodo molecular, em acetonitrila, onde sinais na região aromática (7,66 - 6,84 ppm) em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 22) puderam ser observados. O simpleto referente ao hidrogênio do aldeído não estava mais presente no espectro e um novo sinal foi visto em 7,66 ppm (s, 2H) do hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo *bis*(indolil)metano, encontrado também por Kamal et al. (2009, p. 562) em 7,60 ppm para 3,3-bis(indolil)pentano foi detectado. Outro sinal bastante

característico para esta classe de compostos foi o surgimento do tripleto em 4,42 ppm (1H, $J = 6,83$ Hz) referente ao CH que conecta os dois grupamentos indólicos à cadeia alquílica, também visto por Guo et al. (2009, p. 8851) com deslocamento químico em 4,40 ppm. No espectro de carbono (Figura 23) também foram observadas mudanças, como o desaparecimento do sinal da carbonila referente ao aldeído (I), dando origem a oito novos sinais na faixa de 140-110 ppm pertencentes aos carbonos do grupamento bis(indolil)metano, resultados estes de acordo com compostos já descritos na literatura (KAMAL et al., 2009; GUO et al., 2009).

Quando realizada a última etapa da síntese do ligante **L^{C5}**, verificou-se que no espectro de RMN de ^1H na Figura 22 não estava presente o tripleto referente ao metileno vizinho ao bromo. Porém um novo sinal apareceu em 3,69 ppm (s, 4H) pertencente aos hidrogênios dos metilenos vizinhos as piridinas do **bpma** inserido, sendo confirmado este dado pela literatura (EL-HAMIM; MOHAMED, 2016; CARVALHO et al., 2006, p. 92). Observou-se o aparecimento de mais sinais na região aromática, destacando os sinais em 9,06 e 8,43 ppm (s, 2 H; d, $J = 4,03$ Hz; 2H). O primeiro sinal pode ser atribuído apenas utilizando os espectros de HSQC de ^{15}N (APÊNDICE S), uma técnica de RMN em 2D, como sendo o hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo *bis*(indolil)metano com deslocamento químico maior que o composto **III** devido a conformação deste ligante. O segundo sinal é visto também por Raycroft et al. (2012, p. 10330) em 8,51 ppm que identifica como sendo o hidrogênio vizinho ao átomo de nitrogênio da piridina do grupo **bpma**, tendo um deslocamento químico menor que o primeiro sinal, por não estar ligado diretamente a este átomo eletronegativo. Para o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23) pode-se observar que os deslocamentos químicos dos carbonos vizinhos ao nitrogênio das piridinas, 160 e 148 ppm, eram maiores que os demais carbonos do *bis*(indolil)metano e **bpma** confirmados esses dados com a literatura (RAYCROFT et al., 2012; CARVALHO et al., 2006; KAMAL et al., 2009).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os complexos descritos no presente trabalho foram caracterizados por uma grande variedade de métodos tais como análise elementar de CHN, condutometria, infravermelho, espectroscopia eletrônica, ESI-MS, espectroscopia de RMN e cálculos de estrutura eletrônica (DFT). Tais estudos foram essenciais para elucidar a

composição química e arranjo estrutural, os quais auxiliaram na compreensão dos estudos realizados na verificação do potencial destes compostos como sondas fluorescentes para o DNA.

5.2.1 Análise Elementar de C, H e N

Os complexos **1** e **2** foram caracterizados por análise elemental de C, H e N e apresentaram resultados concordantes com as composições químicas propostas. Na Tabela 3 estão apresentadas as fórmulas moleculares, massa molar e as porcentagens destes elementos (calculada/encontrada) para os respectivos complexos.

Tabela 3 - Porcentagens de C, H e N para os complexos sintetizados via análise elemental (calculada/encontrada).

Complexo	1	2
Fórmula Molecular	$\text{ZnC}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{Cl}_2$	$\text{ZnC}_{68}\text{H}_{70}\text{N}_{10}\text{Cl}_2\text{O}_8$
Massa Molar (g.mol^{-1})	649,96	1291,63
% C	60,55 / 60,85	63,23 / 63,02
% H	6,07 / 5,56	5,43 / 5,61
% N	9,81 / 9,59	10,84 / 10,06
Composição Química Proposta	$[\text{Zn}(\text{L}^{\text{C5}})\text{Cl}_2] \cdot 2 \text{CH}_3\text{OH}$	$[\text{Zn}(\text{L}^{\text{C5}})_2](\text{ClO}_4)_2$

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Os resultados obtidos apresentaram uma boa correlação entre os valores calculados e teóricos, sendo que, a fórmula molecular proposta para o complexo **1** acabou sofrendo um pequeno desvio da fórmula encontrada devido a presença de moléculas de solvente (metanol) adsorvidas pela amostra no momento da síntese.

5.2.2 Condutometria

Os complexos **1** e **2** foram analisados por meio de condutividade molar, onde estes foram dissolvidos em acetonitrila destilada e seca sob peneira molecular, com concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ a 25°C .

O complexo **1** foi confirmado como um eletrólito de razão 1:1 ($\Lambda_M = 128 \mu S$) (GEARY, 1971, p. 108) o que sugere a liberação de um ânion cloreto para gerar a espécie $\{[Zn(L^{C5})Cl]^+\}$. Esse comportamento já está descrito na literatura (SCARPELLINI et al., 2003) para complexos semelhantes.

Para o complexo **2**, a condutividade molar medida foi de $242 \mu S$. Segundo Geary e colaboradores (GEARY, 1971, p. 108) este valor corresponde a uma razão de eletrólitos do tipo 2:1. Para ambos os complexos, as medições de condutividade molar e as espécies formadas em solução estão em total concordância com as espécies observadas durante as análises de espectrometria de massas (ESI-MS) e da análise elementar.

5.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A espectroscopia no IV é geralmente utilizada como uma análise preliminar, uma vez que a formação dos mesmos pode ser acompanhada pela presença das bandas características do ligante e apontando os mesmos nos compostos isolados. Bandas adicionais, referentes ao contração, ligantes exógenos e moléculas de solvente, bem como deslocamentos ou alargamentos, também podem ser observadas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012; NAKAMOTO, 1978). As atribuições das bandas (Tabela 4) e os espectros de IV (Figura 24) do ligante L^{C5} e dos complexos **1** e **2** estão descritas a seguir.

Os espectros de infravermelho de **1** e **2** são caracterizados principalmente pelos modos vibracionais do ligante L^{C5} , com poucas variações. Para o complexo **1** (APÊNDICE I) observou-se uma banda larga em $3496-3146 \text{ cm}^{-1}$ referente a ligação O-H, comprovando a existência de moléculas de metanol adsorvidas no complexo conforme detectado pela análise elementar. No espectro do complexo **1** verificou-se uma banda fina em 3653 cm^{-1} , que segundo Pavia et al. (2010, p. 47) afirma ser da ligação OH livre que, devido as ligações intermoleculares de hidrogênio, enfraquecem a ligação O-H, deslocando assim a banda para uma frequência de menor energia.

Tabela 4 - Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) do L^{C5} e seus complexos **1** e **2**.

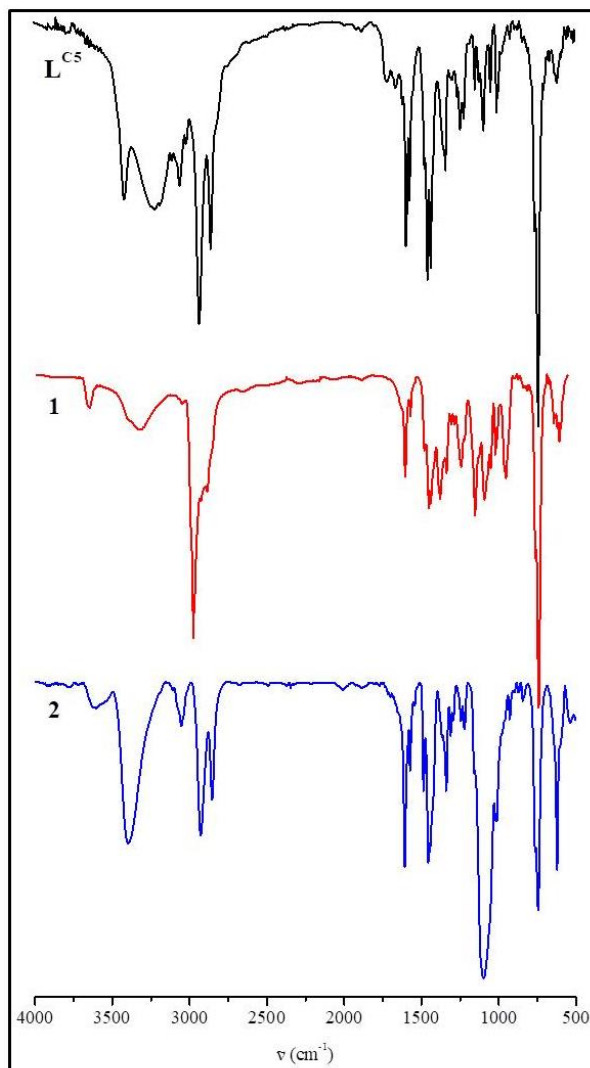
	L^{C5}	1	2
$\nu (\text{O-H})_{\text{livre}}$	-	3653 e 3496-3146	-
$\nu (\text{C-H})_{\text{alif}}$	2928 e 2853	2981-2886	2927 e 2851
$\delta (\text{CH}_2_{\text{alif}})$	1459	1454	1452
$\nu (\text{N-H})$	3415	3496-3146	3399
$\nu (\text{C-H})_{\text{ar}}$	3057	3056	3054
$\nu (\text{C=C})$	1620 e 1433	1613 e 1379	1609 e 1481
$\nu (\text{C=N})$	1585	1568	1566
$\delta (\text{C=N})$	619	608	624
$\nu (\text{C-N})$	1095	1100	1019
$\nu (\text{Cl-O})$	-	-	1095
$\delta (\text{C-H})_{\text{arom}}$	738	737	746

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

A região entre 1613 e 1379 cm^{-1} está relacionada aos estiramentos das ligações C=C / C=N dos anéis aromáticos piridínicos e dos grupamentos indólicos, bem como a forte absorção em torno de 750 cm^{-1} relacionada à deformação angular fora do plano para os anéis aromáticos acima descritos. Tais bandas fornecem então boas evidências de que o ligante L^{C5} está presente na composição química de **1** e **2**, respectivamente.

Uma vez que não há uma significativa mudança na região do espectro onde absorvem as ligações N-H quando L^{C5} é comparado com **1** e **2**, é possível então inferir que os centros de zinco não são coordenados aos grupos indóis (confirmados por estudos de RMN adiante). O aumento da intensidade da absorção a 1095 cm^{-1} em **2** (APÊNDICE N) sugere fortemente a presença do contraíon de perclorato (ClO_4^-), sobrepondo parte da banda característica do estiramento da ligação C-N . Perfil similar de IV foi observado na literatura (XAVIER; BORTOLUZZI; NEVES, 2012).

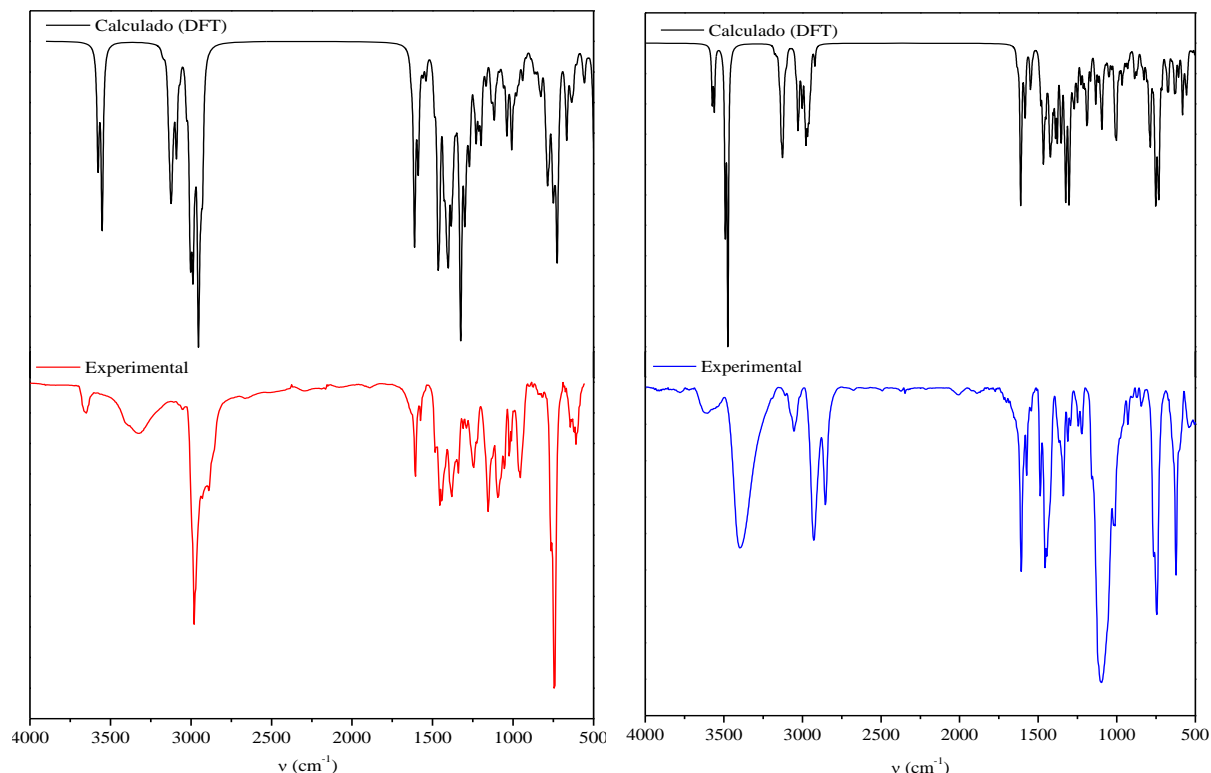
Figura 24 – Comparativo dos espectros de IV (KBr, cm^{-1}) para o ligante L^{C5} , complexo **1** e **2**.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Considerando as estruturas moleculares dos complexos **1** e **2** já previamente com suas energias minimizadas (vide seção 5.2.5) foi possível o cálculo das frequências vibracionais e então a construção dos espectros na região do infravermelho simulado para ambos os complexos (Figura 25). Como pode ser observada, a correlação experimental/teórica apresentou resultados concordantes entre si, sendo que para o complexo **2**, banda de absorção referente ao contração perclorato não aparece no espectro teórico por este não ter sido considerado parte da estrutura do complexo durante o cálculo.

Figura 25 - Espectros de IV calculados e experimentais para os complexos 1 (esquerda) e 2 (direita).



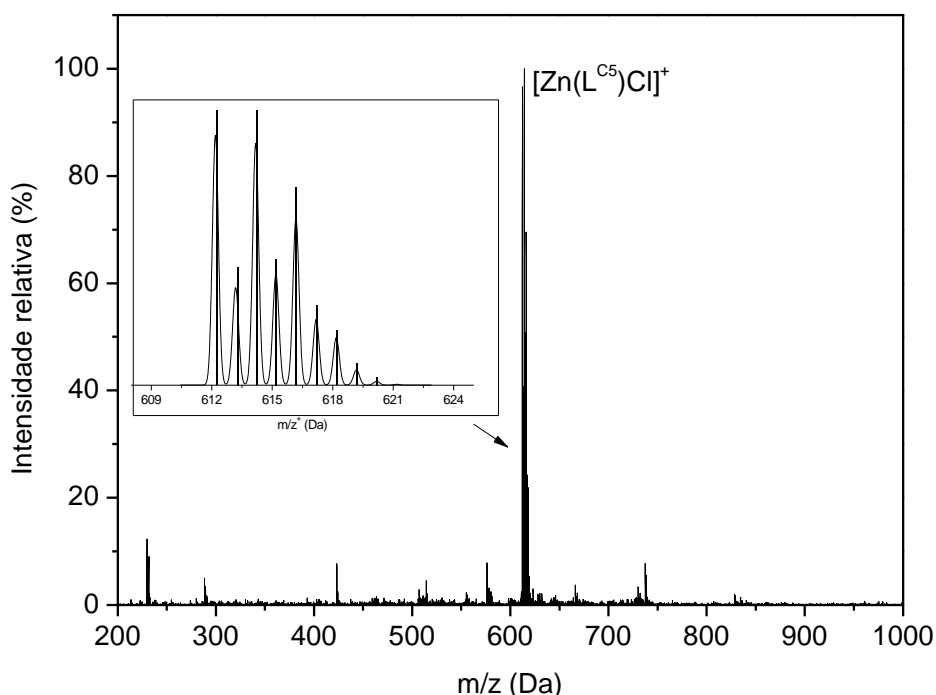
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

5.2.4 Espectroscopia de Massa com Ionização por *Electrospray*

A espectrometria de massas com ionização por *electrospray* apresenta-se como uma técnica de análise aplicada com sucesso na caracterização de complexos em solução, ao produzir íons em fase gasosa diretamente da solução contendo o composto a ser analisado, obtendo-se assim informações qualitativas acerca das espécies carregadas existentes em solução (HENDERSON; MCINDOE, 2005).

Os estudos de espectrometria de massa ESI foram realizados para **1** e **2** em CH₃CN ultrapura, considerando o modo de varredura positivo. Os perfis de distribuição isotópica experimental/simulado (STROHALM, et al., 2008) foram realizados para verificar a concordância dos dados obtidos experimentalmente. Na Figura 26 o espectro de ESI-MS para o complexo **1**, juntamente com sua distribuição isotópica experimental e calculada.

Figura 26 - Espectro de ESI(+)-MS para o complexo 1 em acetonitrila ultrapura e sua distribuição isotópica. Experimental (barras) e calculado (linha).

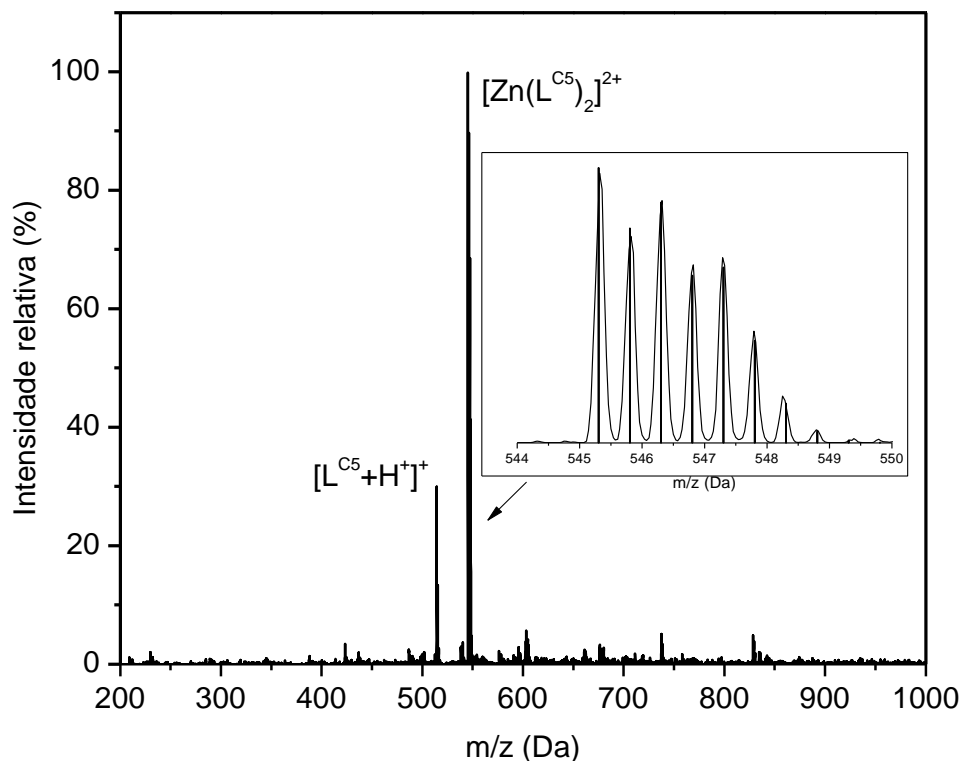


Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

A principal característica observada nos espectros de massa dos complexos obtidos é a baixa fragmentação, característica da técnica empregada (suave), a qual permite a identificação do íon molecular e as espécies mais estáveis frente aos processos de ionização. Além disso, pela espectrometria de massa confirmou-se a massa do íon de carga +1 e +2 de cada um dos complexos **1** e **2**, respectivamente, já que para espécies com carga +1, a diferença entre um pico e outro é sempre de uma unidade e para compostos duplamente carregados esta diferença é de meia unidade de massa.

Para o complexo **1** de massa molar $649,96 \text{ g mol}^{-1}$ foi obtido um espectro contendo apenas um conjunto de sinais relevantes, onde foi observado a razão de m/z de 612,25 Da como uma espécie monovalente. Este valor m/z pode ser atribuído à porção $\{[Zn(L^{C5})Cl]^+\}$ que, ao ser dissolvido em acetonitrila, um dos ligantes cloro é liberado na solução. Tal dado concorda com a análise condutométrica. O espectro de ESI-MS para o complexo **2** está apresentado na Figura 27 com seus respectivos dados.

Figura 27 - Espectro de ESI(+)-MS para o complexo 2 em acetonitrila ultrapura e sua distribuição isotópica. Experimental (barras) e calculado (linha).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Quando o complexo **2** é submetido à análise de ESI-MS, dois aglomerados de sinais relevantes são detectados em m/z 514,29 e 545,25 Da, respectivamente. O primeiro pode ser atribuído ao ligante livre associado a um próton $\{[L^{C5}+H^+]^+\}$ visto também no espectro de ESI-MS do ligante L^{C5} (vide 5.1.3), enquanto o segundo indica a presença da espécie duplamente carregada $\{[Zn(L^{C5})_2]^{2+}\}$ indicando que a unidade estrutural de interesse foi então obtida.

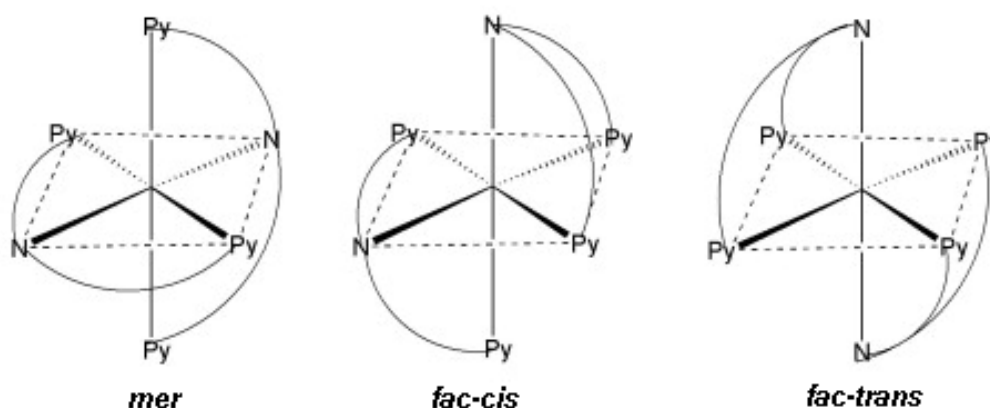
5.2.5 Cálculos Estruturais via DFT

A difratometria de raios X é um método utilizado para resolver estruturas cristalinas de complexos. Porém, apesar de diversas tentativas, não foi possível a obtenção de monocristais dos complexos sintetizados. Neste sentido, uma ferramenta estrategicamente importante foi empregada: Cálculos de estrutura eletrônica via DFT a fim de buscar informações estruturais. As otimizações geométricas dos complexos foram realizadas no vácuo, usando o pacote de

software Orca 4.0.1 (NEESE, 2012) no nível DFT usando o BP86 funcional (BECKE, 1988).

Apesar do complexo **1** não apresentar formas isoméricas, a composição química de **2** (razão ligante/metálico de 2:1) juntamente com as características do ligante bpma que permitem conformações na forma meridional ou facial, onde o arranjo facial poderia ter a configuração espacial em um alinhamento *cis* ou *trans* considerando os grupos doadores ligados ao metal como visto na Figura 28. Todas essas possibilidades foram levadas em conta e tiveram suas energias calculadas.

Figura 28 - Possíveis conformações estruturais para o complexo **2**



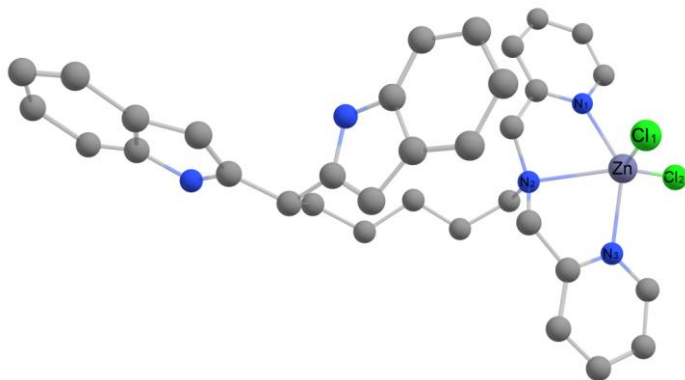
Fonte: KIM et al., 2011.

Os resultados obtidos nestes estudos geraram dados em que a estrutura molecular *trans*-facial é em torno de 6,0 kcal mol⁻¹ mais estável que a meridional. Isso significa que, a 298 K, deve haver apenas 0,004% das espécies meridionais formadas durante o processo de síntese. Este comportamento está em total concordância com outros compostos similares já descritos na literatura (GLERUP et al., 1992; KIM et al., 2011). O arranjo molecular para **1** e **2** foi representado na Figura 29 e na Figura 30, respectivamente. Comprimentos e ângulos de ligação selecionados foram apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Comprimentos de ligação calculados (Å) e ângulos (°) para os complexos **1** e **2**.

Complexo 1							
Zn–N1	2.154	Zn–N2	2.414	Zn–N3	2.163	Zn–Cl1	2.275
Zn–Cl2	2.265	N1–Zn–Cl1	99.3	N1–Zn–Cl2	97.2	N1–Zn–N2	73.2
N2–Zn–Cl1	93.5	N2–Zn–Cl2	138.8	Cl1–Zn–Cl2	127.7	N2–Zn–N3	72.8
Cl1–Zn–N3	100.0	Cl2–Zn–N3	96.7	N1–Zn–N3	141.7	N2–Zn–Cl2	138.8
Complexo 2							
Zn–N1	2.285	Zn–N2	2.237	Zn–N3	2.155	Zn–N1'	2.151
Zn–N2'	2.260	Zn–N3'	2.245	N1–Zn–N2	74.0	N1–Zn–N3	90.9
N1–Zn–N2'	91.9	N1–Zn–N3'	89.3	N2–Zn–N3	78.7	N3–Zn–N2'	110.3
N2'–Zn–N3'	74.8	N3'–Zn–N2	96.4	N2–Zn–N1'	116.2	N3–Zn–N1'	87.6
N2'–Zn–N1'	78.6	N3'–Zn–N1'	93.1				

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura 29 - Arranjo molecular para o complexo **1** via cálculo de DFT.

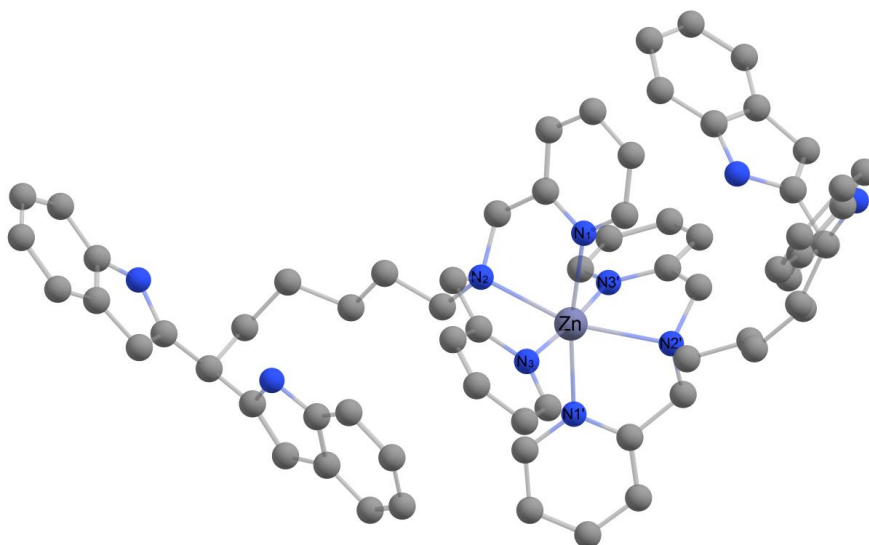
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Em **1**, o centro de zinco é coordenado por um uma amina terciária (N2), dois átomos de nitrogênio piridínicos (N1 e N3) e dois ânions cloreto (Cl1 e Cl2), resultando em um complexo pentacoordenado com um ambiente de coordenação N_3Cl_2 em torno do centro metálico.

O ligante bioinspirado é ligado ao íon zinco por dois anéis de cinco membros, com os seguintes ângulos de ligação: $73,2^\circ$ de N1–Zn–N2 e $72,8^\circ$ de N2–Zn–N3. Ao considerar-se o parâmetro de Addison $\{\tau=(\beta-\alpha)/60=0.05\}$ o átomo de zinco em **1** está inserido em um ambiente de geometria piramidal quadrada levemente

distorcida (ADDISON et al., 1984). As posições basais são ocupadas por N1, N2, N3 e Cl2, enquanto a posição axial é ocupada pelo átomo Cl1. A base da pirâmide mostra os seguintes ângulos: $\beta = 141,7^\circ$ de N1–Zn–N3 e $\alpha = 138,8^\circ$ de N2–Zn–Cl2. O comprimento de ligação médio ao redor do centro de zinco em **1** (2,254 Å) são similares àqueles observados em estruturas cristalinas correspondentes dos complexos de zinco [Zn(bpma)Cl₂] já descritos (média 2,196 Å) (FERNANDES et al., 2014) e (média 2,205 Å) (KIM et al., 2007).

Figura 30 - Arranjo molecular para o complexo **2** calculado via DFT.



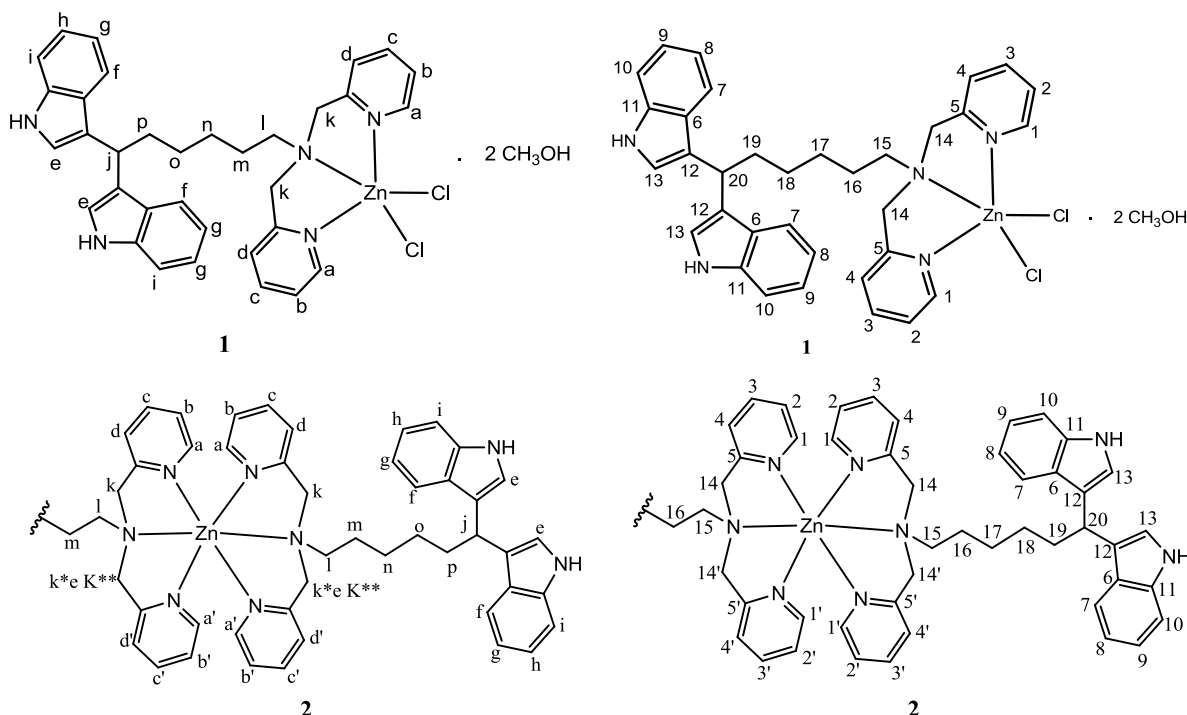
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Para o complexo **2**, considerando o isômero geométrico *trans*-facial, a esfera de coordenação ao redor do átomo de zinco é pseudo-octaédrica, como apresentado na Figura 30. O centro de zinco está inserido em um ambiente N₆-doador via aminas terciárias (N2/N2') e quatro átomos de nitrogênio piridínicos (N1/N1' e N3/N3', respectivamente). Os átomos N1/N1' e N3/N3' dos grupos piridina são coordenados pelo Zn em uma configuração *trans* um do outro, respectivamente, enquanto a amina terciária N2 está em uma configuração *trans* a amina terciária N2' também do outro ligante **L**^{C5}. As distâncias médias da ligação Zn–N_{amina} (2,250 Å) estão na mesma faixa das distâncias da ligação Zn–N_{py} (N1/N1'–Zn, 2,218 e N3/N3'–Zn, 2,200 Å). Estas características estão em total concordância com algumas estruturas cristalinas já relatadas na literatura (BANDGAR; SHAIKH, 2003; KIM et al., 2011).

5.2.6 Ressonância Magnética Nuclear – RMN

Considerando os modelos de arranjos estruturais fornecidos pelos cálculos de estrutura eletrônica via DFT para **1** e **2** (sob vácuo) e sua boa correlação com estruturas cristalinas similares já relatadas, foram estudados os comportamentos desses complexos em solução usando técnicas de RMN para verificar se o arranjo da molécula proposta inicialmente é mantido. Todas as atribuições dos sinais de ^1H e ^{13}C foram feitas com base em técnicas homo e heteronucleares de RMN 2D para **L^{C5}**, **1** e **2**. As correlações apropriadas foram observadas para os prótons piridínicos utilizando o espectro de ^1H - ^1H COSY (APÊNDICE J e O) enquanto que os experimentos ^1H - ^{13}C HSQC (APÊNDICE K e P) e HMBC (APÊNDICE L e Q) permitiram a atribuição inequívoca de prótons metilênicos diastereotópicos para os respectivos grupos piridínicos bem como para a cadeia metilênica. A Figura 31 apresenta as estruturas químicas do complexo **1** e **2** com as identificações dos hidrogênios e as atribuições (Tabela 6) são consistentes com o padrão de contatos interprotônicos do mapa ^1H - ^1H -NOESY (APÊNDICE M e R).

Figura 31 - Figuras dos complexos **1** e **2** com as atribuições dos hidrogênios e carbonos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018

Tabela 6 - Espectro de RMN de ^1H com as atribuições para o L^{C5} e complexos **1** e **2**.

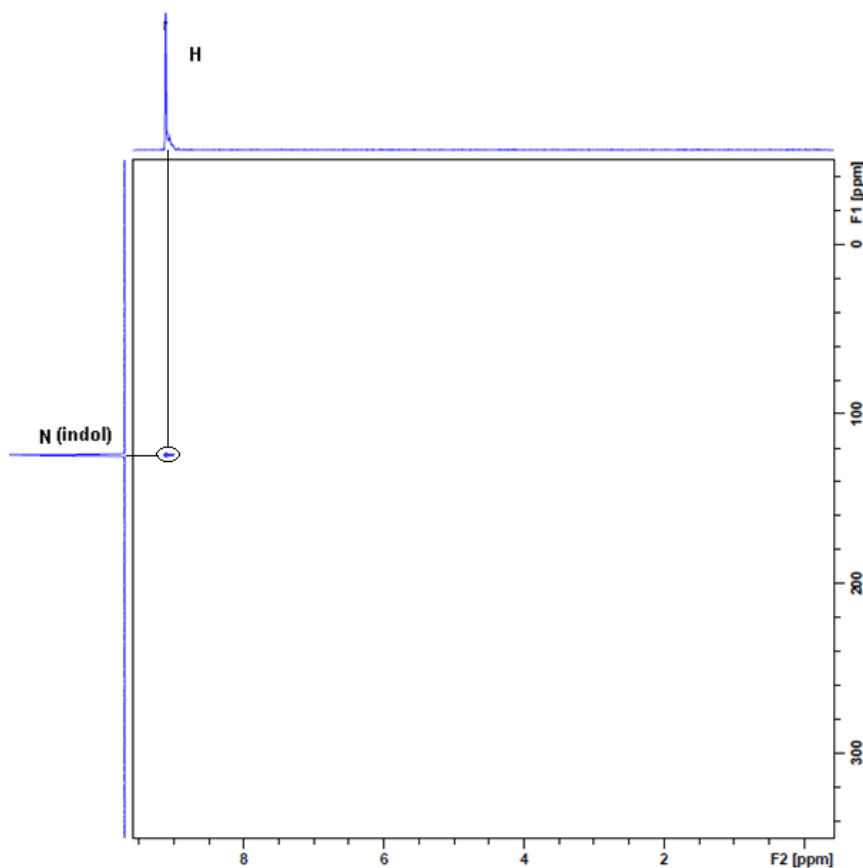
Hidrogênios	L^{C5}	1	2
	$\delta / \text{M} / J (\text{Hz})$	$\delta / \text{M} / J (\text{Hz})$	$\delta / \text{M} / J (\text{Hz})$
H-N	9,06/ s	9,05/ s	9,09/s
H _p	2,42/ t/ 7,17	2,48-2,41/ m	1,90-1,69/ m
H _o	1,44/ qn/ 6,88	1,33-1,20/ m	1,23-1,10/ m
H _n	1,37-1,20/ m	1,19-1,03/ m	0,97-0,77/ m
H _m	1,37-1,20/ m	1,19-1,03/ m	1,04/ qn/ 7,38
H _p	2,14/ q/ 7,61	2,05/ q/ 7,39	2,04/ q/ 7,50
H _j	4,36/ t/ 7,61	4,31/ t/ 7,34	4,31/ t/ 7,41
H _f	7,45/ d/ 7,61	7,42/ t/ 7,24	7,45/ d/ 7,85
H _g	6,89/ t/ 7,61	6,91/ t/ 7,34	6,91/ t/ 7,41
H _h	7,03/ t/ 7,61	7,09-7,03	7,09-7,00/ m
H _i	7,33/ d/ 7,61	7,35/ d/ 8,17	7,36/ d/ 8,03
H _e	7,09/ s	7,09-7,03/ m	7,09-7,00/ m
H _k	3,69/ s	4,15/ s	4,09-3,95/ m
H _k *	-		3,85 / d/ 16,09
H _k **	-	-	3,53 / d/ 16,09
H _d	7,49/ d/ 7,61	7,56-7,51/ m	7,55/ d/ 7,85
H _d '	-	-	7,25/ d/ 7,85
H _c	7,63/ t/ 7,61	7,98-7,93/ m	8,14/ t/ 7,59
H _c '	-	-	7,74-7,64/ m
H _b	7,17-7,11/ m	7,42/ t/ 7,24	7,74-7,64/ m
H _b '	-	-	7,09-7,00/ m
H _a	8,43/ d/ 4,03	9,00/ d/ 4,93	8,56/ d/ 4,89
H _a '	-	-	7,16-7,08/ m

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Considerando a região aromática para todos os espectros (Figura 33), é possível observar que o próton NH presente no grupo indol é desblindado devido ser ligado a um átomo eletronegativo e estar em um sistema aromático, tendo deslocamentos químicos acima de 9,00 ppm, observado no espectro de ^1H - ^{15}N

HSQC (Figura 32). Os perfis dos espectros são consistentes com a presença de grupos piridínicos e indólicos.

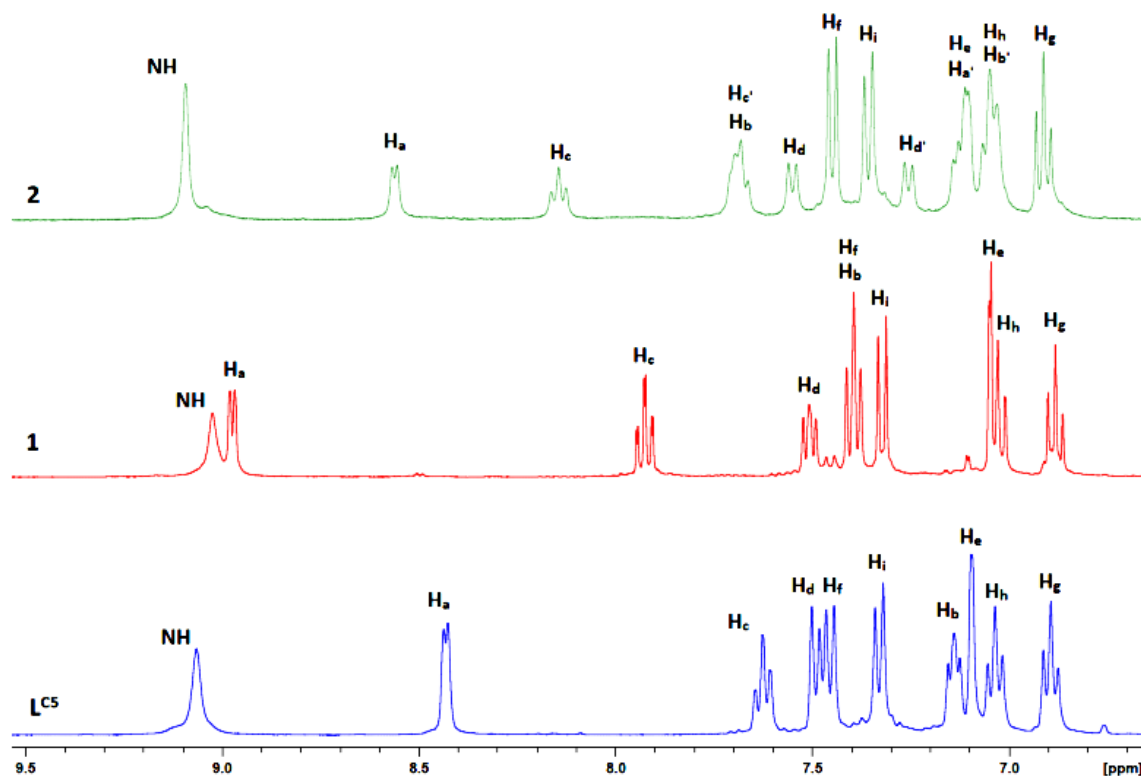
Figura 32 - Espectro de ^1H - ^{15}H HSQC do complexo **2** em CD_3CN .



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Quando os espectros de **1** e **2** são comparados com o L^{C5} , os prótons H_a (vicinal a N_{py}) são deslocados indicando a presença do centro diamagnético de zinco. Outra característica é a perda de equivalência magnética de duas piridinas do mesmo ligante, no complexo **2**, onde estas possuem sistemas de spin diferentes (Figura 33).

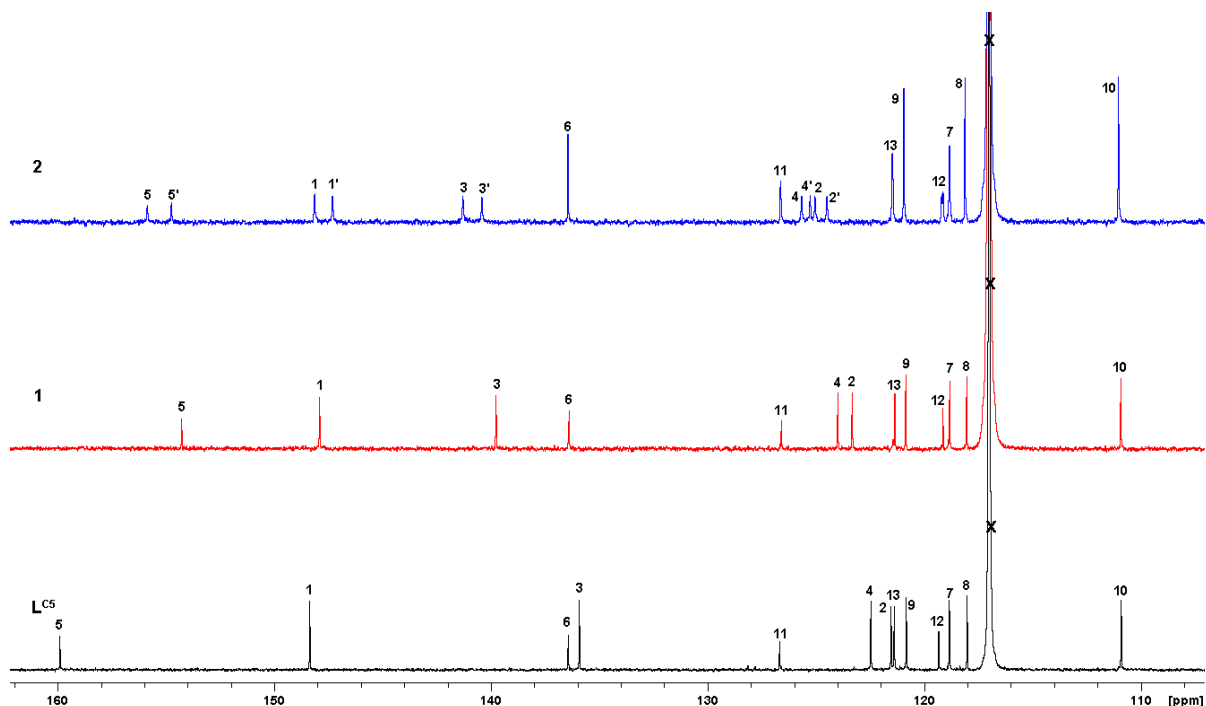
Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H para L^{C5} (abaixo) e para os complexos **1** (meio) e **2** (topo) de 400MHz (25 °C) dissolvido em CD_3CN .



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Esse comportamento pode ser atribuído à diferenciação das posições axiais (piridinas contendo átomos N1 e N1') das posições equatoriais (átomos N3 e N3' átomos) como mostrado na Figura 30. Este mesmo fenômeno é descrito por Åkermark e colaboradores (2004). O sistema de spin de piridina particularmente blindado ($\text{H}_a' - \text{H}_d'$) é provavelmente um resultado da anisotropia magnética originada pelo anel aromático do grupo indol pertencente ao segundo ligante coordenado ao átomo de zinco em uma posição perpendicular a ele. Esta aproximação espacial pode ser vista na Figura 30. Tal fato é corroborado pela presença de cruzamento de sinais destes grupos no espectro ^1H - ^1H -NOESY (APÊNDICE R). Quando analisado o espectro de RMN de carbono para o complexo **2** (Figura 34) verifica-se também a perda de equivalência magnética dos carbonos de duas piridinas do mesmo ligante, aparecendo novos sinais para a piridina mais blindada ($\text{C}_1' - \text{C}_5'$).

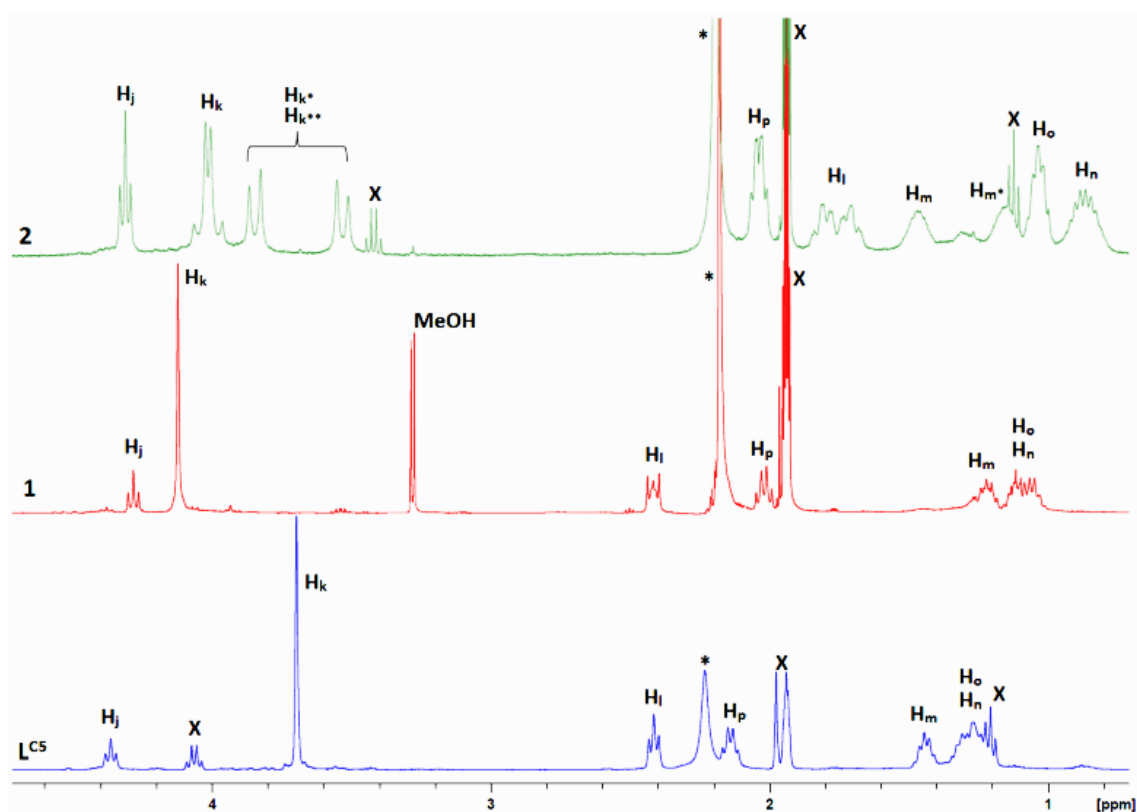
Figura 34 - Espectros de RMN de ^{13}C da região aromática para L^{C5} (abaixo) e complexos **1** (meio) e **2** (topo) a 400 MHz (25 °C) dissolvidos em CD_3CN . Os sinais “X” estão relacionados ao acetato de etila, acetonitrila e água como solventes residuais.



Fonte : Elaborada pela autora, 2018.

Na região de campo superior (Figura 35), o próton CH entre os dois grupos indol (H_i) não apresentou grandes variações tanto para o ligante livre quanto para ambos os complexos estudados, sugerindo que eles estão suficientemente longe do centro metálico. Os grupos metilênicos isolados ligados às piridinas para o L^{C5} e **1**, apresentaram equivalência magnética (H_k) onde para **1**, o sinal de ressonância é deslocado mais para campo baixo (4,13 ppm) quando comparada com o ligante livre (3,70 ppm). É importante destacar que o duplete em 3,28 ppm ($J = 5,5$ Hz) correspondente ao metanol preso no sólido microcristalino já detectado pela análise elementar (FULMER, et. al., 2010).

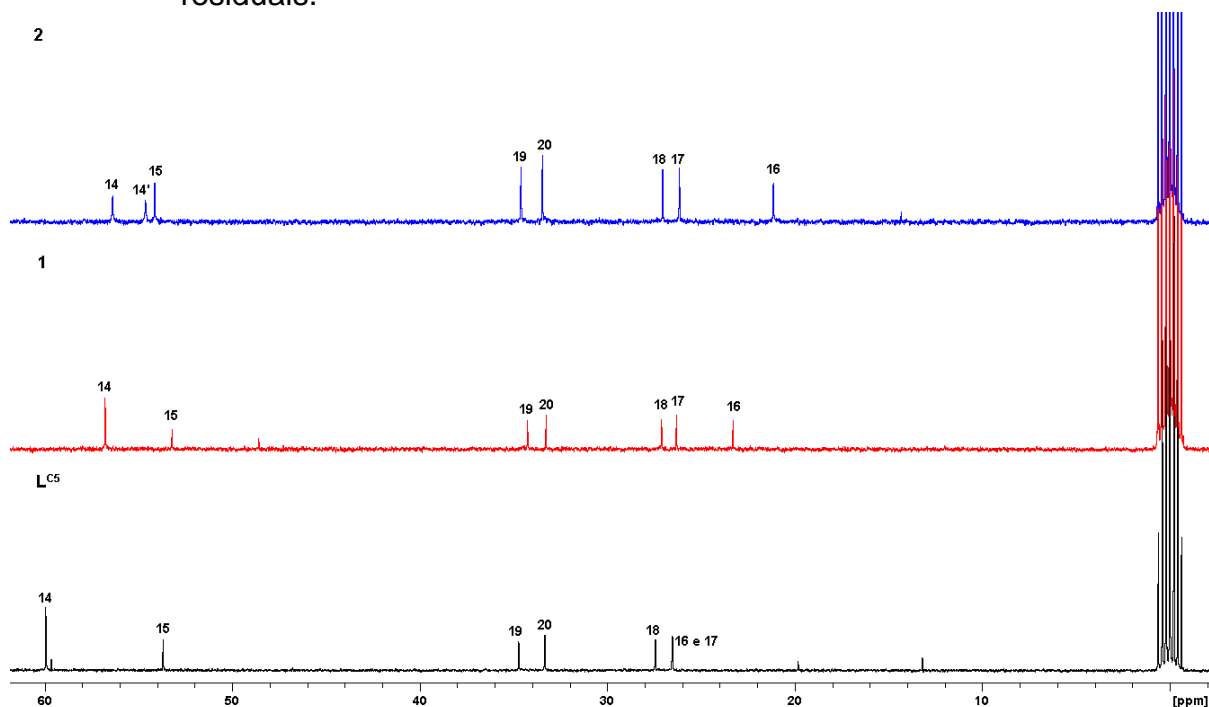
Figura 35 - Espectros de RMN de ^1H para L^{C5} (abaixo) e complexos **1** (meio) e **2** (topo) a 400 MHz (25 °C) dissolvidos em CD_3CN . Os sinais “X e *” estão relacionados ao acetato de etila, acetonitrila e água como solventes residuais.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

No complexo **2**, novamente as posições axiais e equatoriais são agora magneticamente diferenciadas. Quatro prótons (H_k) de duas piridinas equatoriais são quase equivalentes (multiplete, 4,09-3,95 ppm). Para o axial, os prótons CH_2 geminais estão em um ambiente químico completamente diferente (H_k^* e H_k^{**} , Figura 35) sob uma constante de acoplamento cada um de $J = 16,09$ Hz, enquanto um desses prótons é fracamente acoplado a um hidrogênio H_d ($J_{1,3} = 16,23$ Hz). Sobrepondo os espectros de RMN de ^{13}C do L^{C5} , **1** e **2** pode-se notar claramente que os carbonos dos CH_2 geminais as piridinas na posição axial se diferem das equatoriais, gerando sinais C_{14} e C_{14}' como visto na Figura 36.

Figura 36 - Espectros de RMN de ^{13}C para L^{C5} (abaixo) e complexos **1** (meio) e **2** (topo) a 400 MHz (25 °C) dissolvidos em CD_3CN . Os sinais “X e *” estão relacionados ao acetato de etila, acetonitrila e água como solventes residuais.



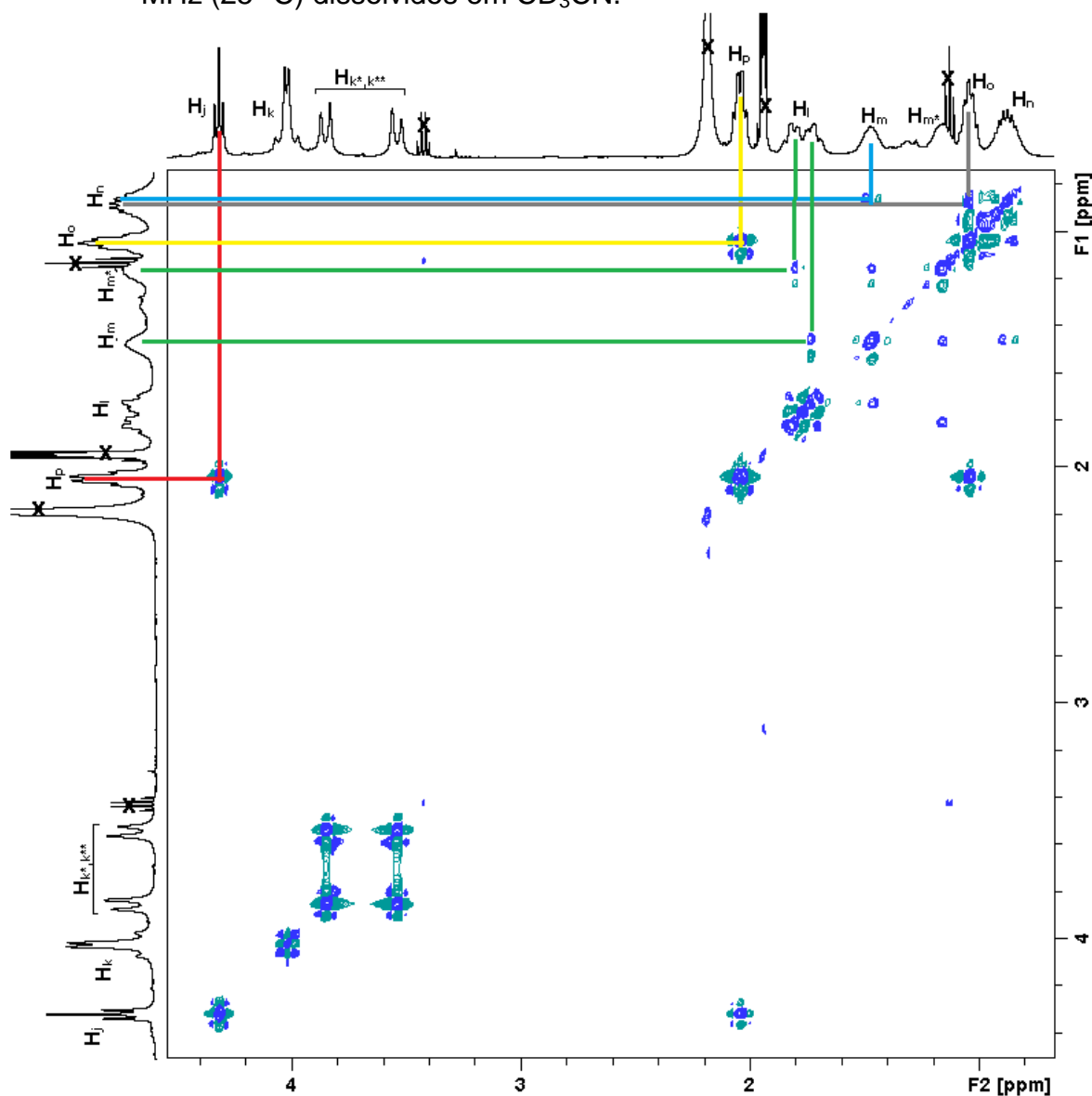
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Considerando os prótons dos grupos CH_2 da cadeia alquílica (H_l até H_p), o ligante L^{C5} e **1** apresentaram um perfil muito semelhante, com um pequeno deslocamento para H_p em **1**, que é ligeiramente protegido quando comparado com o ligante. Para hidrogênios entre 1,6 e 1,2 ppm (H_m a H_o) devido à semelhança magnética entre eles e à razoável distância do centro de zinco, foi observada uma fraca diferenciação.

Para o complexo **2**, prótons H_l (vicinais à porção amina terciária) são significativamente blindados (1,8 ppm) quando comparados com L^{C5} e **1** (2,40 ppm), bem como uma diferença notável no desdobramento dos picos. Esse comportamento pode indicar que os prótons H_l não são mais magneticamente equivalentes (desdobramento de linha) que também afeta os prótons H_m (vicinais a H_l), agora subdivididos em dois sinais (1,56-1,40 e 1,23-1,10 ppm, H_m e H_m^*), respectivamente. Essas interações espaciais entre H_l , H_m e H_k (CH_2 vicinal as piridinas) foram confirmadas por experimentos de ^1H - ^1H -NOESY (APÊNDICE H, M e R). Finalmente, para **2**, os prótons H_n e H_o puderam ser magneticamente diferenciados em 1,04 e 0,87 ppm, respectivamente. Para auxiliar na atribuição dos

sinais de hidrogênios da cadeia alifática foi o experimento de ^1H - ^1H -COSY (Figura 37) que informa o acoplamento dos hidrogênios vizinhos.

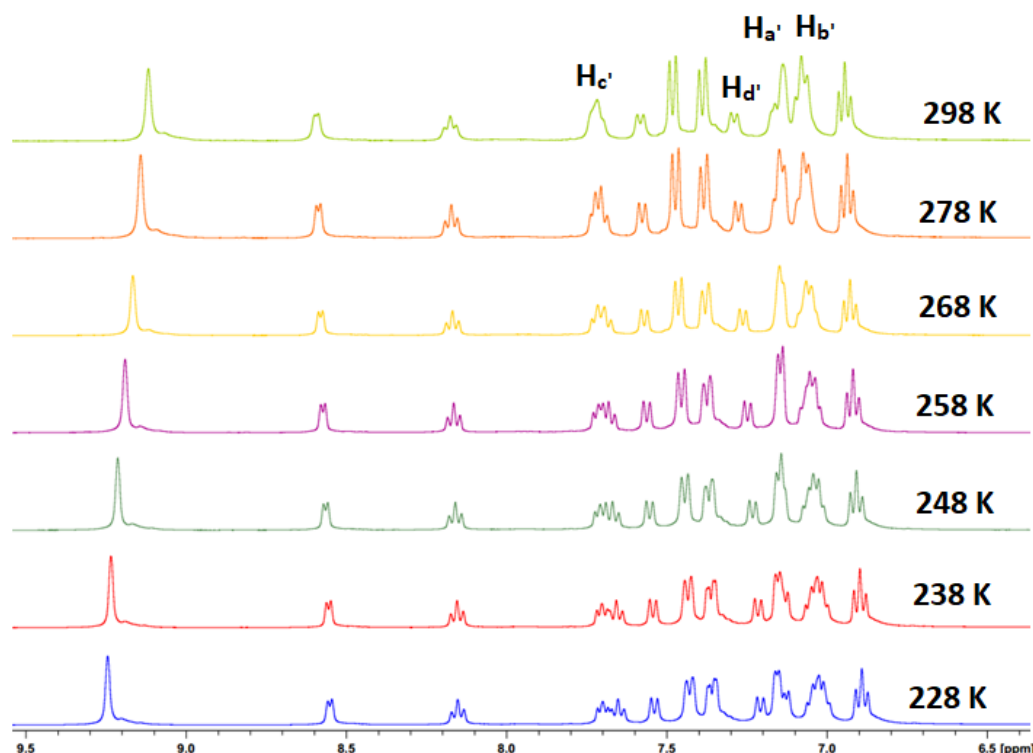
Figura 37 - Espectro de ^1H - ^1H COSY na região de campo alto do complexo **2** a 400 MHz (25 °C) dissolvidos em CD_3CN .



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Experimentos de RMN de ^1H variando a temperatura entre 298 e 238 K, foram realizados para o complexo **2**, a fim de explorar as principais diferenças apresentadas nele quando comparado com o complexo **1** e L^{C5} (comportamento similar), respectivamente (Figuras 38 e 39).

Figura 38 – Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3CN) para o complexo **2** ilustrando o efeito da temperatura para a região dos hidrogênios aromáticos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Na região aromática (9,50 a 6,50 ppm) as piridinas axiais particularmente blindadas (prótons H_{d}' a H_{a}') mostraram uma forte dependência de temperatura na faixa estudada. Como pode ser observado na Figura 38, quanto menor a temperatura, melhor é a resolução do espectro para as linhas de ressonância em questão. Esta característica está de acordo com a ideia de uma proximidade espacial perpendicular entre estes grupos axiais de piridina e os anéis aromáticos indólicos. Uma vez que a temperatura é menor, ocorre diminuição nas rotações livres na estrutura e todos os ambientes químicos sensíveis ao espaço apresentam uma maior diferenciação magnética. Este comportamento está de acordo com um complexo já descrito por Åkermark e colaboradores (2004).

Para a região alifática (4,60 a 0,60 ppm), de um modo geral, todas as linhas de ressonância mudaram para um campo mais alto (prótons H_{j} a H_{n}) à medida que a temperatura diminui (Figura 39). Particularmente para prótons H_{k} , (grupos CH_2 entre a amina terciária e as piridinas equatoriais) uma forte dependência de temperatura pode ser observada onde sua multiplicidade muda de um multipletto (m, 4H) para dois dupletos (confirmando que uma vez que a temperatura diminui, os movimentos

moleculares diminuem e os ambientes químicos aumentam a diferenciação magnética.

Figura 39 – Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3CN) para o complexo **2** ilustrando o efeito da temperatura para a região dos hidrogênios alifáticos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

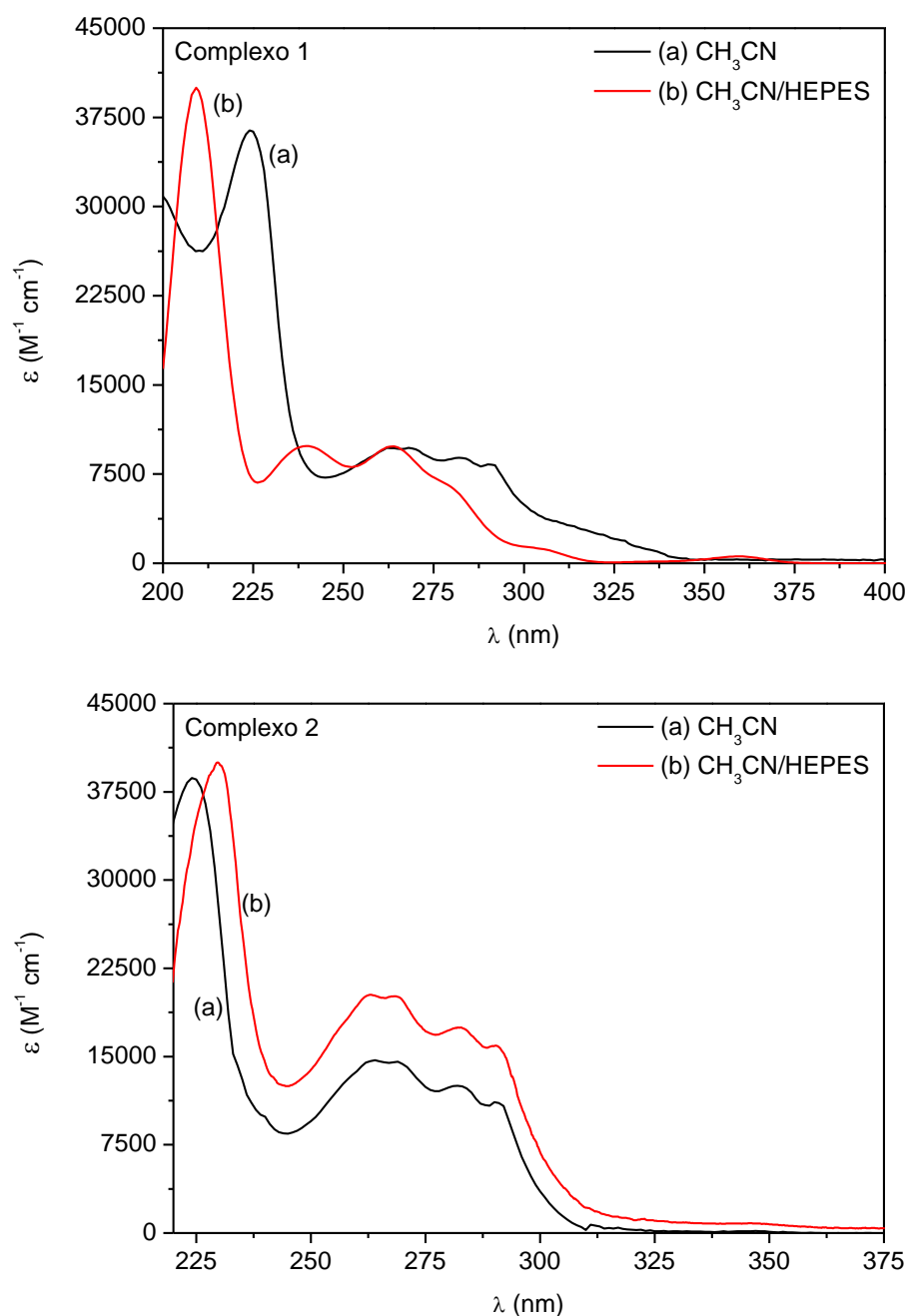
5.2.7 Espectroscopia Eletrônica UV-Vis

Para metais com configuração d^{10} , como é o caso dos íons Zn^{2+} , não se deve esperar a ocorrência de bandas de absorção referentes a transições do tipo $d-d$, já que os orbitais d deste centro metálico estão totalmente preenchidos. Entretanto estes compostos podem apresentar transições eletrônicas descritas como processos de transferência de carga (TC), as quais são permitidas por simetria e caracterizadas por altos valores de coeficiente de absorção (ϵ) (ATKINS et al., 2010).

Os espectros eletrônicos dos complexos sintetizados (Figura 40) foram investigados na região entre 200 e 400 nm, utilizando-se CH_3CN ou $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ 50% v/v (em condição de teste de interação com DNA) como solventes. Os dados espectrais obtidos estão dispostos na Tabela 7. Os gráficos foram feitos em função dos valores de suas absorvidades molares ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) para facilitar a comparação entre os mesmos.

Sob um aspecto qualitativo é possível comparar os espectros eletrônicos de **1** e **2** ao do ligante L^{C5} (seção 5.1.2), os quais apresentam profunda semelhança quando dissolvidos em um mesmo solvente (acetonitrila). Todas as bandas observadas referentes às transições eletrônicas possuem valores de coeficiente de absorção elevado (maiores de $1000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), caracterizando preliminarmente tais processos como TC (ATKINS et al., 2010).

Figura 40 - Espectros eletrônicos dos complexos **1** (acima) e **2** (abaixo) em soluções de (a) acetonitrila e (b) acetonitrila/HEPES 50% v/v, pH=7,02.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Outro indicativo importante é a presença do fenômeno de solvatocromismo quando tais complexos são submetidos a outro sistema de solvente (CH₃CN/HEPES 50% v/v), por exemplo. Enquanto o complexo **1** sofre um forte hipsocromismo onde todas suas absorções são deslocadas para regiões de maior energia, o complexo **2** apresenta pequenas variações energéticas, entretanto um pronunciado hipocromismo pode ser observado. Estas diferenças podem estar associadas ao fato de que em **1**, os ligantes cloro cedem lugar aos ligantes aquo e então tanto a geometria quanto o número de coordenação são alterados, o que explicaria estas significativas alterações. Já em **2** a esfera e geometria de coordenação possivelmente é mantida.

Tabela 7 - Dados de espectroscopia eletrônica para os complexos **1** e **2** no estado líquido.

Complexo	$\lambda_{\max} \text{ (nm)} / \epsilon \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	
	CH ₃ CN	CH ₃ CN / HEPES 50% v/v*, pH=7,02
1	224 (36465); 263 (9685); 268 (9609); 282(8926); 290 (8332)	209 (36478); 239 (9938); 263 (9875); 278 (6638) ^a ; 302 (1213) ^a
2	224 (38792); 264 (14781); 268 (14642); 281 (12556); 290 (11164)	229 (39993); 262 (20306); 268 (20192); 282 (17524); 290 (15944)

*Para condições de teste de interação com DNA vide seção 5.2.8 – espectroscopia eletrônica.

^aOmbro (valor aproximado)

No sentido de buscar mais informações sobre a estrutura eletrônica dos complexos sintetizados, bem como algumas propriedades de seus estados excitados, técnicas de cálculo de estrutura eletrônica foram empregadas. Para tal, foi utilizada a abordagem DFT dependente do tempo (TD-DFT), baseada na estrutura otimizada utilizando o funcional PBE0 a fim de simular os efeitos de solvente, neste caso, acetonitrila (PERDEW; BURKE; ERNZERHOF, 1996; PERDEW; BURKE; ERNZERHOF, 1997).

Os valores dos máximos de absorção, força do oscilador (f) e as configurações para as principais transições para o estado excitado do complexo estão apresentados na Tabela 8. As transições eletrônicas foram atribuídas a partir das representações gráficas das funções de onda obtidas no cálculo. O parâmetro f é um número adimensional, que expressa a probabilidade de uma transição eletrônica ocorrer e é proporcional ao coeficiente de absorção (LAURENT; ADAMO; JACQUEMIN, 2014). Os orbitais de fronteira para os complexos **1** e **2** são apresentados na Figura 41.

Tabela 8 - Dados calculados para os espectros de absorção de **1** e **2** via TD-DFT.

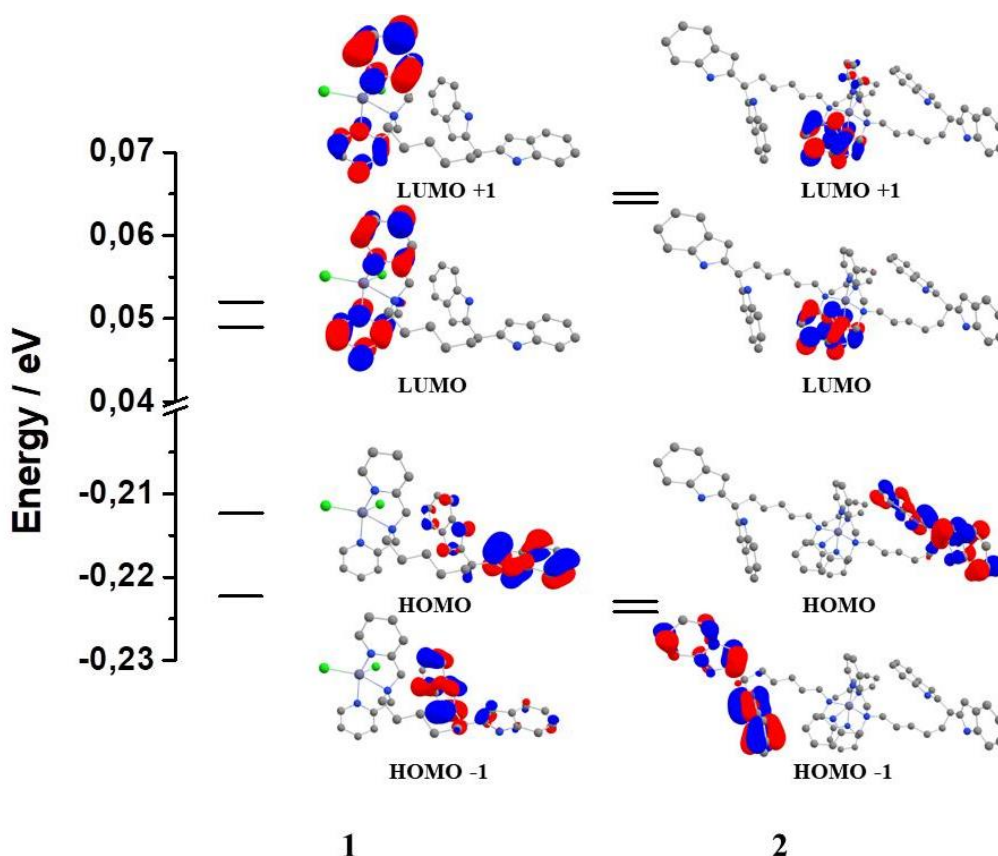
Estado	Energia		<i>f</i>	Atribuição
	eV	nm		
[Zn(L ^{C5})Cl ₂] - 1				
S ₁	3,42	361	0,1546	¹ TCIL
S ₁₀	4,41	280	0,1236	¹ TCIL
S ₁₃	4,64	266	0,1041	¹ TCIL
S ₃₁	5,35	231	0,0852	¹ TCIL/ ¹ TCLL
S ₃₈	4,89	252	0,0335	¹ TCIL
S ₄₃	4,88	242	0,0870	¹ TCIL
S ₄₇	5,93	209	0,9349	¹ TCIL
[Zn(L ^{C5}) ₂] ²⁺ - 2				
S ₃	2,97	417	0,0200	¹ TCIL
S ₂	3,15	393	0,1544	¹ TCIL
S ₁₈	2,34	349	0,0367	¹ TCIL
S ₂₁	2,74	326	0,0636	¹ TCIL
S ₃₆	4,79	307	0,0669	¹ TCIL
S ₃₈	2,30	286	0,0128	¹ TCIL/ ¹ TCLL
S ₄₄	2,82	278	0,0989	¹ TCIL/ ¹ TCLL

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Para o complexo **1**, as transições eletrônicas em 361 e 280 nm dizem respeito a processos de transferência de carga intraligante (¹TCIL) que partem dos orbitais $p\pi$ indólicos (HOMO/HOMO-1) para os orbitais $p\pi^*$ dos anéis piridínicos (LUMO/LUMO+1), respectivamente. As absorções em 266 e 252 nm também indicam ¹TCILs entre os orbitais $p\pi \rightarrow p\pi^*$ internos aos grupos indólicos. Em 231 nm tem-se uma transição eletrônica que ocorre de um orbital que tem contribuição dos ligantes cloro (Cl⁻) e dos anéis piridínicos ($p\pi$) para os orbitais $p\pi^*$ piridínicos (¹TCIL/¹TCLL). Por fim, as últimas duas absorções em 242 e 209 nm dizem respeito a transições ¹TCIL de orbitais $p\pi \rightarrow p\pi^*$ internas aos grupos indólicos.

No complexo **2**, as transições eletrônicas de menor energia, entre 417 e 307 nm são majoritariamente intraligante ($^1\text{TCIL}$) partindo de orbitais $p\pi$ (indólicos) $\rightarrow p\pi^*$ (piridínicos), (HOMO/HOMO-1 \rightarrow LUMO/LUMO+1), como também observado no complexo **1**. Em contrapartida, as absorções em 286 e 278 nm apresentam um caráter $p\pi \rightarrow p\pi^*$, mas agora entre ligantes diferentes, geralmente dos anéis indólicos ($p\pi$) para as piridinas do outro ligante ($p\pi^*$). Durante o processamento destes cálculos, não foram observadas contribuições dos orbitais atômicos do centro metálico (zinco). As transições eletrônicas intraligante envolvendo os grupamentos piridínicos (QIAN et. al., 2011) e indólicos (LEE; CRAIG; COLBRAN, 2009) são compatíveis com dados apresentados para compostos já descritos na literatura.

Figura 41 - Recorte do diagrama de orbitais moleculares para os complexos **1** e **2** e representação gráfica dos principais orbitais moleculares envolvidos no processo de absorção.

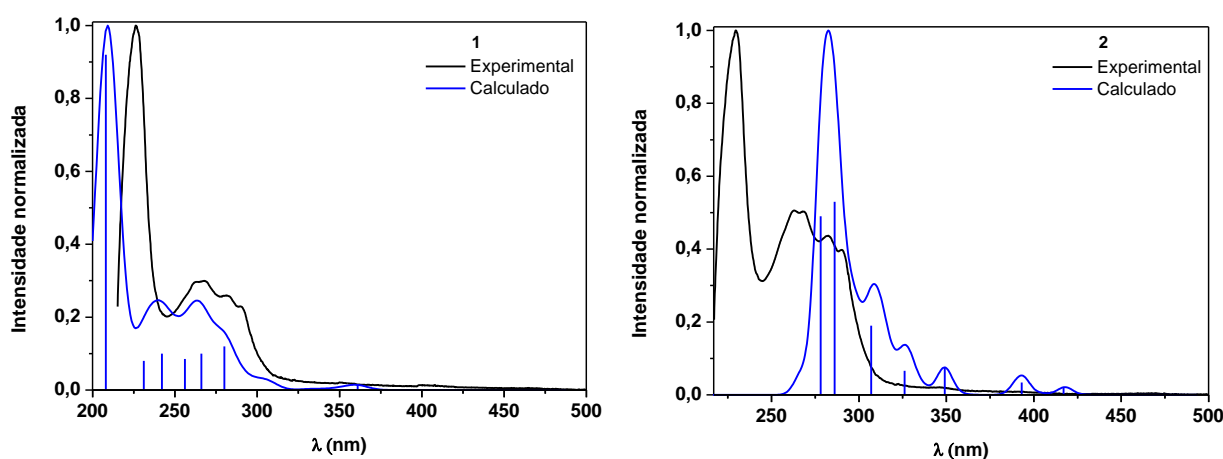


Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

As comparações das curvas de absorção Gaussiana ajustadas (experimentais e teóricas, Figura 42) mostraram-se coerentes para o complexo **1**, entretanto no complexo **2**, uma maior discrepância pode ser observada. Tal fato pode estar

relacionado ao funcional selecionado para simular os efeitos de solvente (PBE0) que, para efeitos de economia de cálculo, não levam em consideração o efeito de solvente no estado de transição da molécula estudada.

Figura 42 - Sobreposição da curva de absorção calculada com o espectro eletrônico obtido experimentalmente para os complexos 1 e 2. As barras azuis representam a força do oscilador (f) para as transições eletrônicas descritas na Tabela 8.



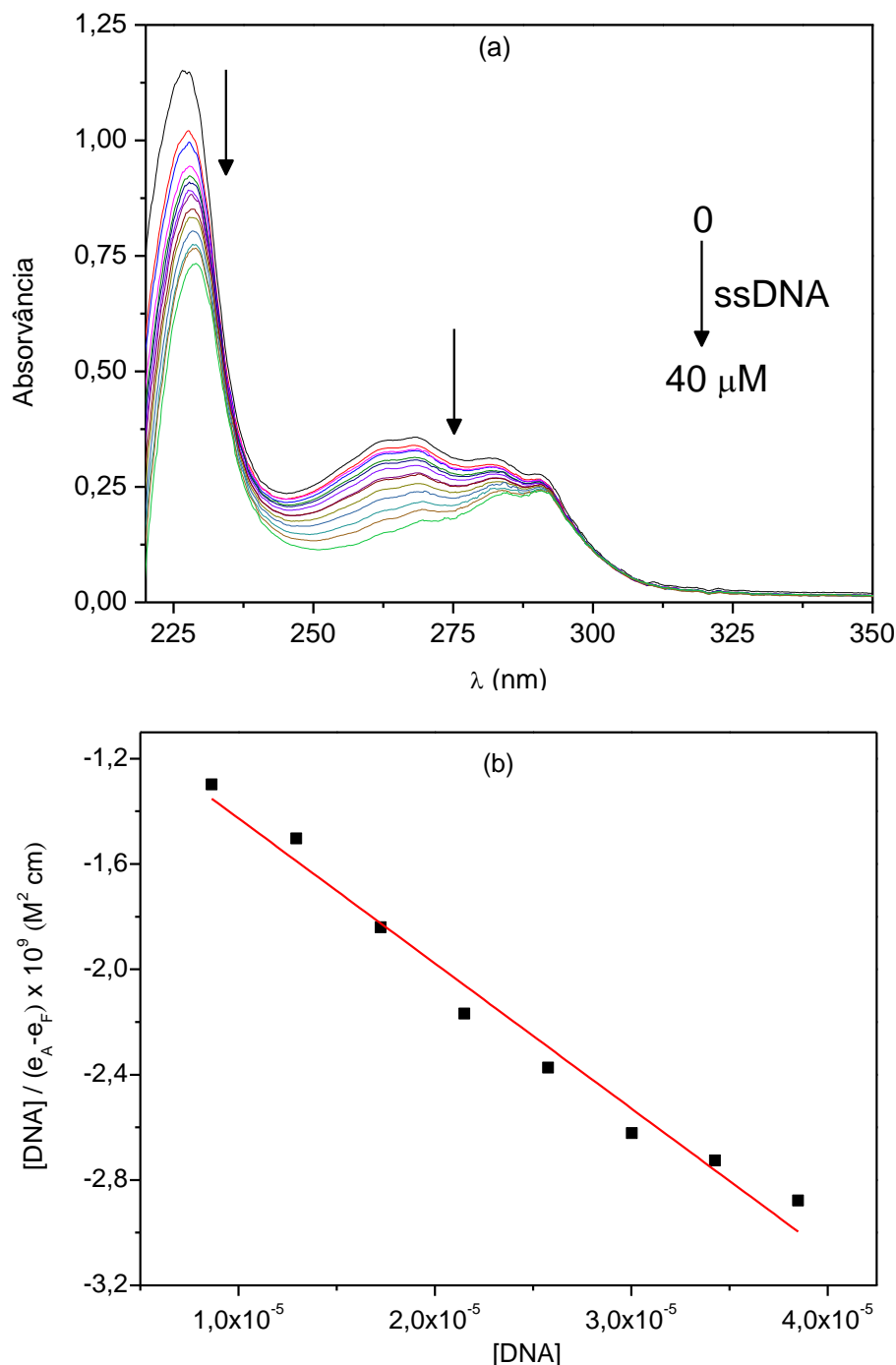
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

5.2.8 Interação com DNA via Espectroscopia Eletrônica

Estudos de interação dos complexos metálicos sintetizados e ácidos nucleicos são comumente realizados através de titulações espectrofotométricas na região do ultravioleta-visível do espectro eletromagnético (MISHRA et al., 2014, p. 459). Este estudo tem por objetivo verificar se o composto de interesse interage com o DNA de maneira intercalativa ou por ligação em seus sulcos (MAHADEVAN; PALANIANDAVAR, 1998).

A variação espectral dos complexos **1** e **2** frente as sucessivas adições de DNA de esperma de salmão (ssDNA) foi acompanhada na faixa de 220 a 350 nm (Figuras 43a e 44a), fixando a concentração dos complexos em $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. A concentração de DNA variou entre 0 e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ nos estudos de **1** e 0 e $7,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ para os estudos com o complexo **2**. Na Tabela 9 estão apresentados os valores de comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) onde foram extraídos os dados de absorvância máxima para cada composto, variações no comprimento de onda (batocromismo) e na absorvância (hipocromismo) e os valores de K_b calculados.

Figura 43 - a) Variação espectral do complexo **1** após sucessivas adições de ssDNA. Condições: CH₃CN/HEPES 50% v/v; pH 7,02, $I = 50 \text{ mmol.L}^{-1}$ (NaCl); 25 °C. b) Regressão linear $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) \times [\text{DNA}]$. $\lambda_{\text{máx}}$: 227 nm.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Observa-se nas Figuras 43a e 44a que, à medida em que se adicionam alíquotas de ssDNA, não há uma alteração pronunciada no valor do $\lambda_{\text{máx}}$ uma vez que o batocromismo observado foi 1,8 e 1,1 nm para os complexos **1** e **2**,

respectivamente. Desta forma, pode-se presumir que a interação entre os complexos estudados e o ssDNA se dá por ligação ao sulco maior deste. Resultados similares foram descritos para complexos reportados por Souza et al., 2010.

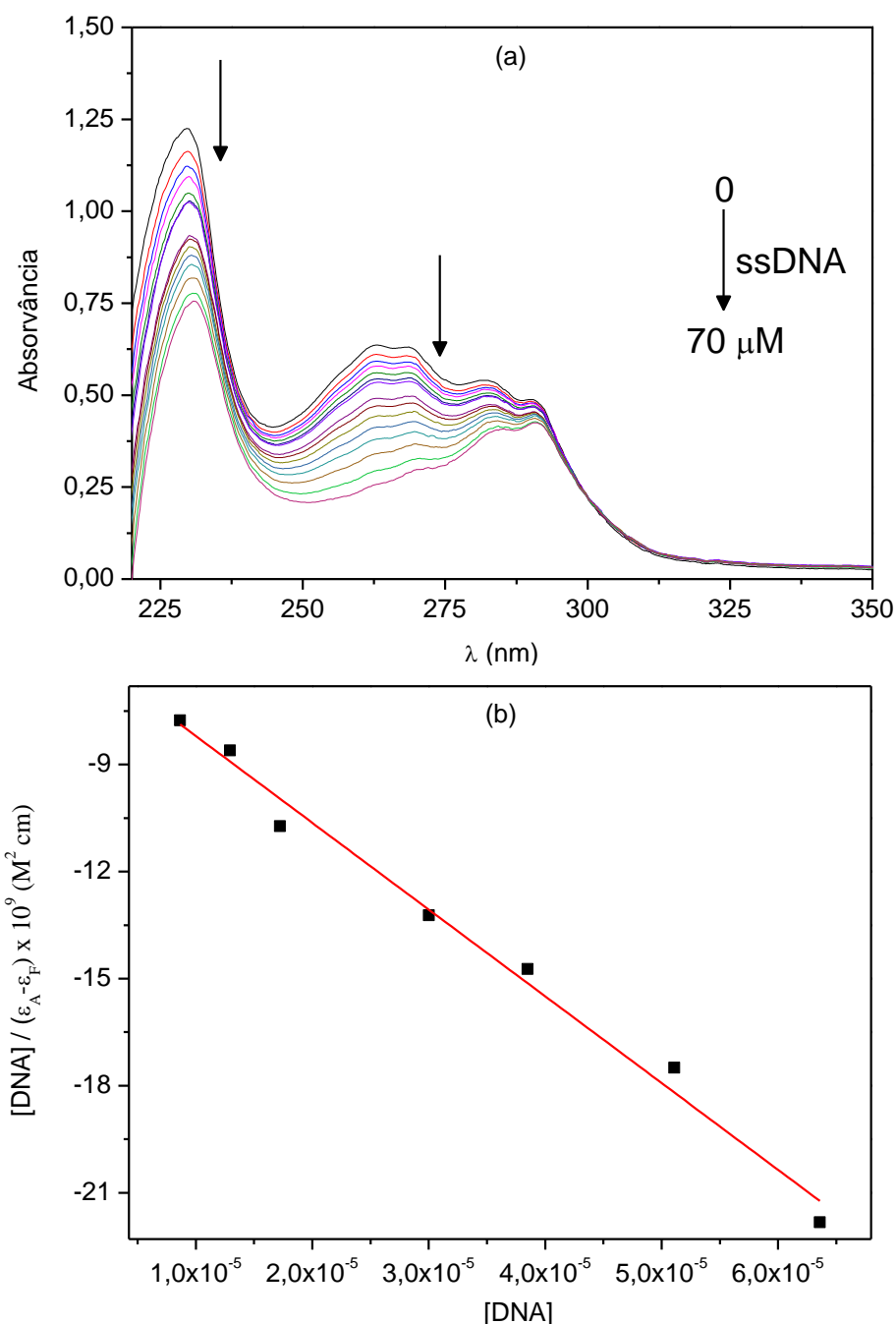
Para ambos os complexos, é observado um forte hipocromismo nas bandas de absorção destes a cada adição de ssDNA. Ao final do experimento o complexo **1** apresentou um hipocromismo de 42% ($\lambda_{\text{máx}} = 227 \text{ nm}$) enquanto no complexo **2** foi de 47% ($\lambda_{\text{máx}} = 230 \text{ nm}$). Complexos metálicos que se ligam ao DNA através de intercalação geralmente resultam em hipocromismo devido ao modo intercalativo envolvendo interação de empilhamento entre o cromóforo aromático e os pares de base do DNA. A intensidade do hipocromismo é comumente consistente com a afinidade da interação de intercalação (LIU, 2002; NIKOLIS; METHENITIS; PNEUMATIKAKIS, 2003). Neste sentido é lícito afirmar que ambos os complexos interagem com o DNA tanto por ligação ao sulco maior do DNA quanto por vias intercalativas entre suas bases nitrogenadas.

Após o tratamento dos dados coletados de absorvância nos respectivos comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) de **1** e **2** foi possível calcular a constante de ligação intrínseca (K_b) entre estes e o DNA através da Equação 1 (PYLE et al., 1989; MISHRA et al., 2014; DIXIT et al., 2011) (Figura 43b e 44b):

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_A - \varepsilon_F)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_B - \varepsilon_F)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_B - \varepsilon_F)} \quad \text{Equação 1}$$

Onde ε_a , ε_F e ε_b corresponde, respectivamente a absortividade molar para o composto estudado em cada adição de DNA, para o composto livre e para o composto totalmente ligado ao DNA.

Figura 44 - a) Variação espectral do complexo **2** após sucessivas adições de ssDNA. Condições: CH₃CN/HEPES 50% v/v; pH 7,02, $I = 50 \text{ mmol.L}^{-1}$ (NaCl); 25 °C. b) Regressão linear $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) \times [\text{DNA}]$. $\lambda_{\text{máx}}$: 230 nm, $r^2 = 0,986$.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Considerando o complexo **1**, apenas um equivalente de L^{C5} está presente e interagindo com a estrutura do DNA a partir tanto dos grupamentos piridínicos quanto indólicos, uma vez que a variação espectral está presente nas bandas relativas a ambos os cromóforos. Porém, quando seu valor de K_b ($2,47 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) é comparado ao do composto **2** ($3,88 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) verifica-se que ocorreu um aumento de

57% em sua magnitude, indicando uma maior interação de **2** com o ssDNA. Tal fato é condizente com as diferenças de composição química de cada um dos compostos, que **2** possui o dobro de grupamentos piridínicos e indólicos presentes em sua estrutura.

Ao compararmos os valores de K_b com outros compostos já descritos na literatura, é possível destacar que são comparáveis a complexos zinco descritos por Manikandamathavan e colaboradores (MANIKANDAMATHAVAN et al., 2014) com valores de $3,71 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $2,31 \times 10^4$ e Mandegani e colaboradores (MANDEGANI et al., 2016) com complexos de zinco contendo ligantes bipyridinas com valores de $2,61 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Porém, não possui o mesmo potencial que o brometo de etídio que em seus estudos comprovam constantes de ligação de $1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (WARING, 1965) e $7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (LEPECQ; PAOLETTI, 1967). Uma vez comprovado que ambos os complexos podem interagir com o DNA, partiu-se então para os estudos de fluorescência molecular.

5.2.9 Interação com DNA via Fluorescência Molecular

No sentido de verificar se os complexos sintetizados podem atuar como sondas detectoras de DNA, além de analisar de uma maneira mais sistemática os modos de interação destes com o DNA, estudos de fluorescência molecular foram realizados.

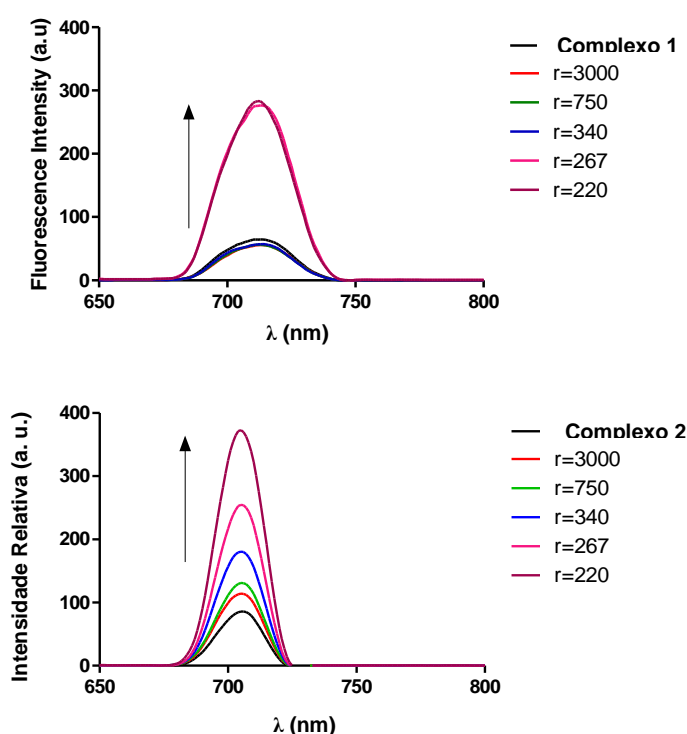
Em um teste preliminar, soluções feitas em acetonitrila/tampão 50% v/v (condições de teste de interação com DNA, vide seção 4.1.2.11) de concentração 300 μM para os complexos **1** e **2** foram excitadas em 360 nm e seus espectros de fluorescência medidos (Figura 45).

Para ambos os complexos uma emissão em 720 nm pode ser observada com intensidade de fluorescência abaixo de 100 unidades para ambos apesar de, visualmente, perceber-se que o complexo **2** apresenta maior fluorescência que **1** ainda na ausência de ctDNA (espectro em linha preta). Tal fato pode estar relacionado com a maior quantidade de grupamentos cromóforos que absorvem radiação no complexo **2** (duas unidades de L^{C5}) se comparado ao complexo **1** (uma unidade de L^{C5}). Quando alíquotas de ctDNA são adicionadas em ambos os complexos, é possível observar um significativo aumento de intensidade de

fluorescência chegando a próximo de 300 unidades para **1** e 400 unidades (25% maior) para **2** quando a razão complexo/DNA $r = 220$.

Esse mesmo comportamento de aumento de fluorescência em complexos que possuem em sua estrutura grupos indólicos já foi relatado por diversos autores, como uma explicação para modelos de interações do tipo intercalação ou conexões de sulco, sendo possível a utilização como sondas fluorescentes de DNA (ANEJA et al., 2018; KOÇAN et al., 2017; KUBISTA; AAKERMAN; NORDEN, 1987; KAPUSCINSKI, 1995). O fato dos complexos aumentarem a sua fluorescência ao entrar em contato com o DNA pode ser comparado ao brometo de etídio livre em solução não gera valores de emissão significantes, mas com a adição de ctDNA ocorre ganho na intensidade de emissão devido à interação entre as espécies (WARING, 1965; LEPECQ; PAOLETTI, 1967).

Figura 45 - Espectros de fluorescência dos complexos **1** (acima) e **2** (abaixo) com a adição de alíquotas de ctDNA, onde $r = [\text{complexo}]/[\text{ctDNA}]$. Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ 50% v/v (pH 7,0), $\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$.

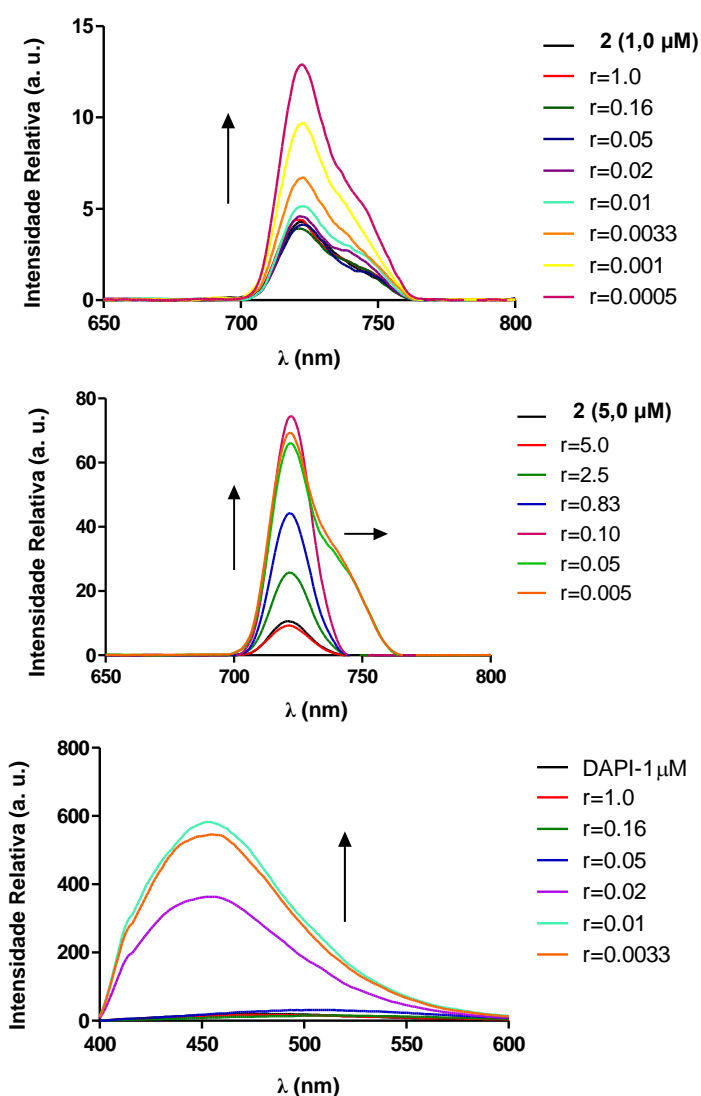


Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Levando em conta a maior capacidade de emissão do complexo **2** quando na presença de ctDNA, todos os testes subsequentes foram realizados apenas para este composto **2**.

Considerando que sondas moleculares tem como uma de suas principais características apresentar boa intensidade de fluorescência mesmo em concentrações relativamente baixas, testes de emissão de **2** a concentrações mais baixas (1,0 e 5,0 μM) foram realizadas. A título de comparação, a Figura 46 apresenta ainda testes de fluorescência com o corante comercial DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (KAPUSCINSKI, 1995).

Figura 46 - Espectros de fluorescência do complexo **2** a 1,0 μM (acima), 5,0 μM (meio) e para o corante fluorescente comercial DAPI (abaixo) com sucessivas adições de ctDNA, onde $r = [\text{complexo}]/[\text{CT-DNA}]$. Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ 50% v/v (pH 7,0), $\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$.



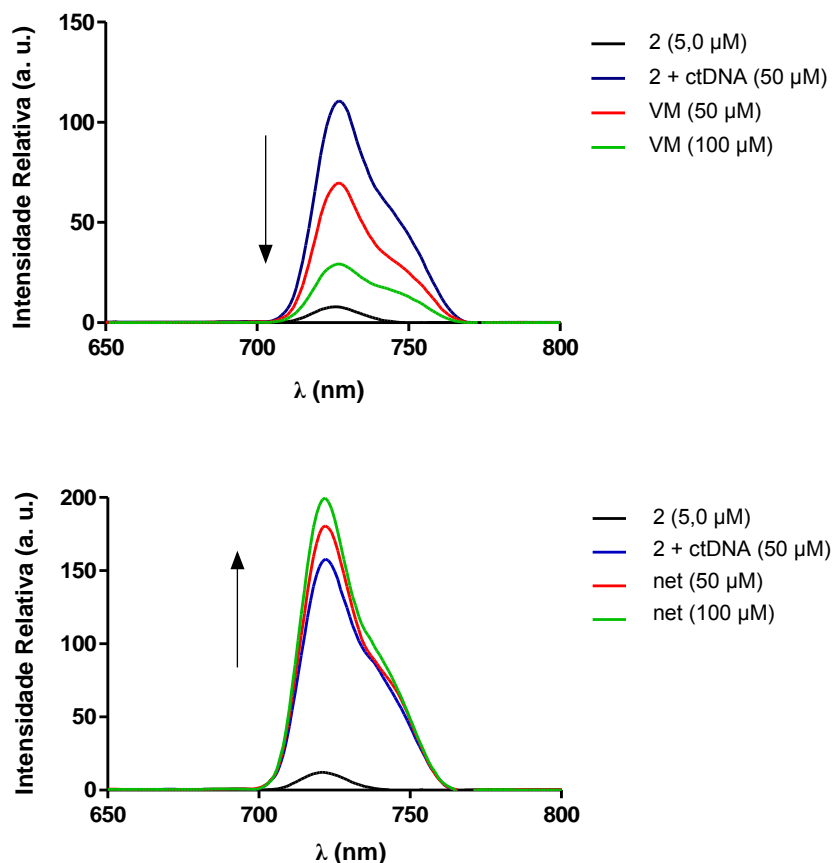
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Em concentração de 1,0 μM , o complexo **2** apresenta emissão menor que 5 unidades arbitrárias (Figura 46, acima) enquanto em concentração de 5,0 μM sua emissão sobe para cerca de 10 unidades arbitrárias (Figura 46, meio), ambos os testes na ausência de ctDNA. A 1,0 μM , a sonda DAPI praticamente não emite fluorescência (Figura 46, abaixo). Quando a relação complexo/ctDNA (r) é de 0,05, por exemplo, a emissão de **2** a 1,0 μM praticamente não sofre alteração enquanto o teste a 5,0 μM fica em 65 unidades arbitrárias (um aumento de 6,50 vezes). Neste sentido, o complexo **2** possui uma baixa sensibilidade a presença de ctDNA a 1,0 μM porém esta é sensivelmente aumentada a 5,0 μM . Ao compararmos a utilização do complexo **2** (1,0 μM e $r = 0,02$) que permanece com emissões praticamente inalteradas se comparada ao complexo livre de ctDNA (~ 5 unidades de emissão), o corante DAPI nas mesmas condições pode atingir cerca de 350 unidades de emissão, sendo então significativamente mais potente.

Levando em conta que os complexos **1** e **2** não parecem interagir tão fortemente com o DNA por vias intercalativas (valores de $K_b \sim 10^4 \text{ M}^{-1}$), o complexo **2**, com melhor capacidade de emissão, foi submetido a experimentos que buscaram avaliar sua capacidade de interagir com os compostos verde de metila (VM) e netropsina (net), bloqueadores dos sulcos maior e menor do DNA, respectivamente (Figura 47). Quando o complexo **2** está em baixa concentração (5,0 μM) sua emissão é baixa (curva em preto), e, quando 50 μM de ctDNA são adicionados à solução, uma significativa fluorescência (> 100 unidades) pode ser detectada (curva azul). Entretanto com alíquotas totalizando 50 e 100 μM de verde de metila (VM) adicionadas à solução, a emissão é claramente reduzida (Figura 47, acima). Neste sentido é lícito afirmar que o complexo **2** e o verde de metila estão competindo pelo mesmo sítio de ligação no ctDNA, o sulco maior (KIM, NORDEN, 1993).

Em seguida um experimento semelhante foi realizado com o agente ligador de sulco menor netropsina (VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1982). Quando alíquotas de netropsina (net) são adicionadas à solução, a emissão é praticamente constante (levemente aumentada) (Figura 47, abaixo). Sendo assim é possível notar que o composto e a netropsina de fato não competem pelo mesmo sítio de ligação no ctDNA, o que corrobora os dados obtidos para o experimento com o verde de metila.

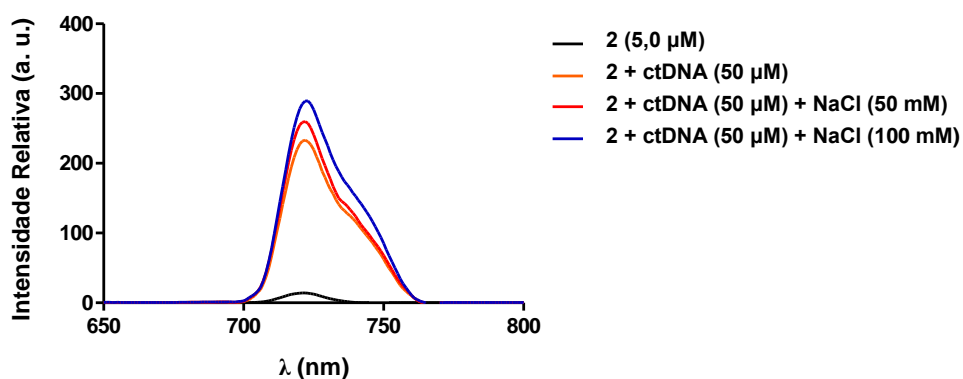
Figura 47 – Espectros de fluorescência do complexo **2** (5,0 μM) com a adição de 50 μM de ctDNA e posterior adição de 50 e 100 μM de verde de metila (VM, acima) e netropsina (net, abaixo). Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ 50% v/v (pH 7,0).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Para avaliar se um possível modo de interação através de atração eletrostática estaria presente entre o complexo **2** e o ctDNA, alíquotas de uma solução de NaCl foram adicionadas à solução contendo **2** (5,0 μM) e ctDNA (50 μM). As concentrações finais de NaCl ficam então na casa de 50 e 100 mM. Conforme ilustrado na Figura 48, é possível notar que, apesar do aumento da força iônica da solução estudada, o espectro de fluorescência molecular de **2** é pouco influenciado pela adição de cloreto de sódio. Tal fato demonstra baixa influência das interações eletrostáticas entre o complexo estudado e o ctDNA, pois praticamente não há competição deste e dos íons sódio pelo esqueleto contendo os diésteres fosfóricos aniônicos do DNA.

Figura 48 – Espectros de fluorescência do complexo **2** (5,0 μM) com a adição de 50 μM de ctDNA e posterior adição de 50 e 100 mM de NaCl. Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ 50% v/v (pH 7,0).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Com base em todos os estudos apresentados, pode-se concluir que ambos os complexos podem atuar como sondas fluorescentes sendo o complexo **2** mais sensível que **1** nas condições testadas. Conforme demonstrado, **2** apresenta uma preferência de ligação pelo sulco maior do ctDNA, dados estes também conformados via titulação espectrofotométrica, além de efeitos negligenciáveis de interações do tipo eletrostáticas.

6 CONCLUSÕES

Foram sintetizados e caracterizados por técnicas espectroscópicas e de massas o ligante bioinspirado L^{C5} e seus precursores com bons rendimentos e alto grau de pureza adequados então à síntese dos compostos de coordenação descritos neste trabalho.

Técnicas de ressonância magnética nuclear uni- e bidimensionais foram essenciais para a determinação inequívoca de todos os átomos de hidrogênio e carbono presentes nestes compostos.

Partindo-se do ligante L^{C5} , foram sintetizados dois novos complexos: $[Zn(L^{C5})Cl_2] \cdot 2CH_3OH$ (**1**) e $[Zn(L^{C5})_2](ClO_4)_2$ (**2**). Estes compostos foram preliminarmente caracterizados por análise elementar de C, H, e N, medidas de condutividade elétrica; espectroscopia na região do infravermelho e espectrometria de massas (ESI-MS).

Os dados de condutividade molar confirmaram as razões de eletrólitos esperadas para os compostos sintetizados. As análises de infravermelho confirmaram a presença do ligante L^{C5} na composição química dos complexos, bem como a proeminente presença do ânion perclorato no complexo **2**. Esses resultados estão em total concordância com as espécies observadas durante as análises de massas onde a correlação teórica (calculada) e experimental (encontrada) nos perfis de distribuição isotópica puderam ser traçadas para **1** e **2**, respectivamente.

Estudos utilizando cálculos de estrutura eletrônica via DFT forneceram um possível arranjo estrutural dos átomos componentes destas moléculas no vácuo. Enquanto no complexo **1** o centro de zinco(2+) está inserido em um ambiente pentacoordenado N_3Cl_2 -doador com geometria piramidal quadrada distorcida, o complexo **2** teve como isômero geométrico de menor energia o arranjo *trans*-facial dos ligantes. A esfera de coordenação apresenta apenas átomos de nitrogênio e o centro metálico está inserido em um ambiente octaédrico distorcido. Os dados estruturais calculados tiveram seus resultados corroborados quando comparados com estruturas cristalinas já descritas na literatura para compostos semelhantes.

Buscando estender estes resultados teóricos para a química em solução, estudos aprofundados de ressonância magnética nuclear uni- e bidimensionais foram realizados para ambos os complexos. Enquanto o complexo **1** apresentou um perfil espectral mais simétrico e bastante parecido com o próprio ligante L^{C5} livre

(salvo alguns deslocamentos de sinais). O complexo **2** apresentou dois sistemas de spin isolados para os hidrogênios piridínicos atribuído as posições geométricas axiais e equatoriais ocupadas por estas. Grande diferenciação dos hidrogênios metilênicos tanto vizinhos às piridinas quanto da cadeia alifática também pode ser observada. Os mapas de espectroscopia de correlação (COSY) e de efeito nuclear de Overhauser (NOESY) confirmam os contatos vicinais e espaciais, respectivamente além de concordar com a proposta estrutural fornecida via DFT.

Cálculo de estrutura eletrônica via TD-DFT foram realizados e apresentaram uma boa correlação com os espectros eletrônicos obtidos experimentalmente. Com base nestes estudos as transições eletrônicas observadas puderam ser atribuídas a partir das representações gráficas das funções de onda obtidas no cálculo e os orbitais de fronteira para os complexos **1** e **2** foram calculados. Ambos os complexos apresentam majoritariamente processos de TCIL e TCLL, sendo que em **1** os processos TCLL envolvem contribuições dos ligantes cloro enquanto em **2** de um ligante L^{C5} para outro. Não foram observadas contribuições dos orbitais atômicos do centro metálico de zinco(2+) para ambos.

Testes de interação de ambos os complexos frente ao DNA via espectroscopia eletrônica indicam um processo intercalativo especificamente no sulco maior desta biomolécula (baixo batocromismo). O valor de K_b para **2** foi 57% maior que em **1**, porém na faixa de $10^4 M^{-1}$, considerado razoável se comparado a outros agentes descritos na literatura.

A partir dos dados obtidos nos testes de fluorescência, constatou-se que ambos os complexos podem ser considerados sondas fluorescentes para detecção de DNA sendo o complexo **2** mais sensível que **1**, porém com resultados ainda modestos frente a sondas já disponíveis comercialmente.

Os testes de competição utilizando agentes ligadores de sulcos como o verde de metila e netropsina corroboram a informação que os complexos sintetizados ligam-se ao DNA via sulco maior. Testes de variação de força iônica (NaCl) indicam que interações eletrostáticas entre complexo/DNA não são significantes uma vez que não alteraram significativamente as emissões de fluorescência das sondas sintetizadas.

REFERÊNCIAS

- ADDISON, A. W.; RAO, N. T. Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Copper(II) Compounds containing Nitrogen-Sulphur Donor Ligands ; the Crystal and Molecular Structure of Aqua[I,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)- 2,6-dithiaheptane]copper(II) Perchlorate. **Dalton Transactions**, v. 0, n. 7, p. 1349-1356, 1984.
- AKERMARK, B. et al. Strain-induced substitutional lability in a Ru(II) complex of a hypodentate polypyridine ligand. **Dalton Transactions**, v. 21, n. 8, p. 1215-1220, 2004.
- ALVARADO, Stephenie et al. The bis(indolyl)imidazole alkaloid nortopsentin a exhibits antiplasmodial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2362-2364, 2013.
- ANDEREGG, G.; WENK, F. Pyridinderivate als Komplexbildner VIII Die Herstellung je eines neuen vier-und sechszahnigen Liganden. **Helvetica Chimica Acta**, v. 50, n. 243, p. 2330-2332, 1967.
- ANEJA, B. et al. N-Substituted 1,2,3-Triazolyl-Appended Indole-Chalcone Hybrids as Potential DNA Intercalators Endowed with Antioxidant and Anticancer Properties. **Chemistry Select**, v. 3, n. 9, p. 2638-2645, 2018.
- ATKINS, P. et al. *Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry*, 5th Ed. Oxford, UK: University Press, p. 497, 2010.
- BALZANI, V.; SCANDOLA, F. Chemistry and light. Partv1: Photochemistry, a New Dimension of Chemistry. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 542-548, 1996.
- BANDGAR, B. P.; SHAIKH, K. A. Molecular iodine-catalyzed efficient and highly rapid synthesis of bis(indolyl)methanes under mild conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 9, p. 1959-1961, 2003.
- BASU, A. Metals in Medicine: an overview. **Scientific Reviews & Chemical Communications**, v. 5, n. 2, p. 77-87, 2015.
- BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A*, v. 38, n. 6, p. 3098–3100, 1988.
- BEINERT, H. Bioinorganic Chemistry: A New Field or Discipline? Words, Meanings, and Reality. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 37967–37972, outubro 2002.
- BLINDAUER, Claudia A. et al. Metal complexes of N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN): Variable coordination numbers and geometries. **Polyhedron**, v. 25, n. 2, p. 513-520, 2006.
- BRODERICK, J. B; COUCOUVANIS, D. Bioinorganic chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 2 p. 157–159, 2003.

BROWN, R. S. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, n. 1, p. 94-98, 2004.

CAMARGO, Tiago P. de. **Desenvolvimento de Complexos Heterobinucleares de Fe IIIZnII a partir de Ligantes Contendo o Grupo Pireno para Estudo de Interação com Ésteres de Fosfato e Ácidos Nucleicos**. 2013. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2013.

CAMPOS, A. H. J. F. M. et al. Preservando para o futuro. **Ciência Hoje**, v. 47, n. 277, p. 118-129, 2010.

CARVALHO, Nakédia M. F. et al. Synthesis and characterization of three mononuclear Fe(III) complexes containing bipodal and tripodal ligands: X-ray molecular structure of the dichloro[N-propanamideN,N-bis-(2-pyridylmethyl)amine]iron(III) perchlorate. **Inorganic Chimica Acta**, v. 359, p. 90-98, 2006.

CHEMCRAFT - software gráfico para visualização de cálculos de química quântica 2004. Disponível em : <<http://www.chemcraftprog.com>>.

CHONG, J. M.; HEUFT, M. A.; RABBAT, P. Solvent Effects on the Monobromination of α,ω -Diols: A convenient Preparation of ω -Bromoalkanols. **The Journal Organic of Chemistry**. v. 65, n. 18, p. 5837-5838, 2000.

CRICHTON, Robert R. **Biological Inorganic Chemistry: A new introduction to molecular structure and function**. 2 ed. Louvain-la-Neuve, Bélgica: Copyright, Elsevier, 2012.

CZAPLINSKA, B.; SPACZYNSKA, E.; MUSIOL, R. Quinoline Fluorescent Probes for Zinc- from Diagnostic to Therapeutic Molecules in Treating Neurodegenerative Diseases. **Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 19-33, 2018.

DENORA, Nunzio et al. Metal complexes targeting the Translocator Protein18 kDa (TSPO). **Coordination Chemistry Reviews**, v. 341, p. 1-18, 2017.

DIXIT, Namrata et al. One pot synthesis of Cu(II) 2,2'-bipyridyl complexes of 5-hydroxy-hydurilic acid and alloxanic acid: Synthesis, crystal structure, chemical nuclease activity and cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 256-267, 2011.

DOVICH, Norman J. et al. Lazer-induced fluorescence of flowing samples as an approach to single-molecule detection in liquids. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 348-354, 1984.

DRAGAN, A. I. et al. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. **Journal of Fluorescence**, v. 22, n. 4, p. 1189-1199, 2012.

EL-HALIM, H. F.; MOHAMED, G. G. Synthesis, spectroscopic studies, thermal analyses, biological activity of tridentate coordinated transition metal complexes of bi(pyridyl-2-ylmethyl)amine] ligand. **Journal of Molecular Structure**, v. 1104, p. 91-95, 2016.

FERNANDES, Christiane et al. Synthesis, characterization, antibacterial and antitumoral activities of mononuclear zinc complexes containing tridentate amine based ligands with N3 or N2O donor groups. **Inorganica Chimica Acta**, v. 416, p. 35, 2014.

FULMER, G. R. et. al. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the organometallic Chemist. **Organometallics**, v. 29, p. 2176, 2010

GARCÍA-RAMOS, J. C. et al. Metal-based drug-DNA interactions. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 57, n. 3, p. 245–259, 2013.

GAVRILOVA, A. L.; BOSNICH, B. Principles of Mononucleating and Binucleating Ligand Design. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 349-384, 2004.

GEARY, w. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 7, p. 81-122, 1971.

GLERUP, Joergen et al. Synthesis and characterization of bis(2-pyridylmethyl)amine complexes of manganese(II), zinc(II), and cadmium(II). **Inorganic Chemistry**, v. 31, n. 22, p. 4611-4616, 1992.

GRIMME, S, et al. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. **The Journal of Chemical Physics**, v. 132, n. 15, p.154104, 2010.

GRIMME, S.; EHRLICH, S.; GOERIGK, L. Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1456-1465, 2011.

GUO, Xingwei et al. One-pot Synthesis of Symmetric and Unsymmetric 1,1-Bis-indolylmethanes via Tandem Iron-Catalyzed C-H Bond Oxidation and C-O Bond Cleavage. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 22, p. 8848-8851, 2009.

HAMMINGA, Gerben M. et al. Real-time in situATR-FTIR analysis of the liquid phase hydrogenation of -butyrolactone over Cu-ZnO catalysts: A mechanistic study by varying lactone ring size. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 5479-5485, 2004.

HENDERSON, W.; MCINDOE, J. S. Mass Spectrometry Of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds. Chichester: John Wiley & Sons. p. 127, 2005.

KAMAL, Ahmed et al. An efficient synthesis of bis(indolyl)methanes and evaluation of their antimicrobial activities. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 559-565, 2009.

KAPUSCINSKI, J. DAPI: A DMA-Specific fluorescent probe. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 70, n. 5, p. 220-233, 1995.

KARTHIK, M., et al. Zeolite catalyzed electrophilic substitution reaction of indole with aldehydes: synthesis of bis(indolyl)methanes. **Catalysis Communications**, v. 5, p. 371, 2004.

KATO, Merii et al. Dinuclear Copper(II) Complexes with [4]⁺ Cores and Their Reactions with Sugar Phosphate Esters: A Substrate Binding Model of Fructose-1,6-bisphosphatase. **Inorganic Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2925- 2941, 2006.

KELLAND, Lloyd. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews cancer**, v. 7, n. 8, p. 573-584, 2007.

KIM, S. K.; NORDÉN, B. Methyl green: A DNA major-groove binding drug. **FEBS Letters**, v. 315, n. 1, p. 61-64, 1993.

KIM, Y et al. Anion effects on construction of Zn^{II} compounds with a chelating ligand bis(2-pyridylmethyl)amine and their catalytic activities. **Inorganica Chimica Acta**, v. 366, p. 337, 2011.

KIM, Y. et al. [Bis(2-pyridylmethyl)amine]dichloridozinc(II) chloroform solvate. **Acta Crystallographica Section E**. E63, m2810–m2811, 2007.

KNOLL, J. D.; TURRO, C. Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 282-283, p. 110-126, 2015.

KOBAYASHI, Hisataka et al. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2620-2640, 2010.

KOÇAN, H. et al. Photophysicochemical, calf thymus DNA binding and in vitro photocytotoxicity properties of tetra-morpholinoethoxy-substituted phthalocyanines and their water-soluble quaternized derivatives. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1251-1266, 2017.

KOSSMANN, S.; NEESE, F. Efficient Structure Optimization with Second-Order Many-Body Perturbation Theory: The RIJCOSX-MP2 Method. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 8, p. 2325-2338, 2010.

KUBISTA, M.; AAKERMAN, B.; NORDEN, B. Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. **Biochemistry**, v. 26, n. 14, p. 4545-4553, 1987.

LAURENT, A. D.; ADAMO, C.; JACQUEMIN, D. Dye chemistry with time-dependent density functional theory. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 28, p. 14334-14356, 2014.

LEE, S.; CRAIG, D. C.; COLBRAN, S. B. Copper(II) complexes of ligands derived from tryptamine. **Polyhedron**, v. 28, p. 1097-1102, 2009.

LENIS-ROJAS, Oscar A. et al. Dinuclear Ru(II)(bipy)₂ Derivatives: Structural, Biological, and in Vivo Zebrafish Toxicity Evaluation. **Inorganic Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 7127-7144, 2017.

LEPECQ, J. B.; PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: Physical—Chemical characterization. **Journal of Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 87-106, 1967.

LIDE, David R. **Handbook of inorganic chemistry and physics**, 81st ed., CRS Press, seção 5-91, 2000.

LIU, J. et al. DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 91, p. 269–276, 2002.

MAHADEVAN, S.; PALANIANDAVAR, M. Spectroscopic and voltammetric studies on copper complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolines bound to calf thymus DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 693-700, 1998.

MANDEGANI, Zeinab et al. Synthesis, characterization, DNA binding, cleavage activity, cytotoxicity and molecular docking of new nano water-soluble [M(5-CH₂PPh₃-3,4- salpyr)](ClO₄)₂ (M = Ni, Zn) complexes. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 15, p. 6592-6611, 2016.

MANIKANDAMATHAVAN, Verasuntharam M. et al. DNA/protein interaction and cytotoxic activity of imidazole terpyridine derived Cu(II)/Zn(II) metal complexes. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 34, p. 13018-13031, 2014.

MEEUSEN, J. W.; NOWAKOWSKI, A.; PETERING, D. H. Reaction of Metal-Binding Ligands with the Zinc Proteome: Zinc Sensors and N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 3625-3632, 2012.

MIKATA, Y.; WAKAMATSU, M.; YANO, S. Tetrakis(2-quinolinylmethyl)ethylenediamine (TQEN) as a new fluorescent sensor for zinc. **Dalton Transaction**, v. 7, n. 3, p. 545-550, 2005.

MIKATA, Yuji. Isoquinoline-Based TQEN Family as TPEN-Derived Fluorescent Zinc Sensors. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 7295-7301, 2008.

MISHRA, Monika et al. Synthesis, structural investigation, DNA and protein binding study of some 3d-metal complexes with N'-(phenyl-pyridil-2-yl-methylene)-thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 452-464, 2014.

MORTEZA, Shiri et al. Bis- and Trisindolylmethanes (BIMs and TIMs). **Chemical Reviews**, v. 110, n. 4, p. 2250–2293, 2010.

NAGARAJ, Karuppiiah et al. Influence of self-assembly on intercalative DNA binding interaction of double-chain surfactant Co(III) complexes containing imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline and dipyrrodo[3,2-d:2'-3'-f]quinoxaline ligands: experimental and theoretical study. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 18074-18086, 2014.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. 3 ed. New York: Wiley-Interscience, 1978.

NEESE, Frank. The ORCA program system. Wiley Interdisciplinary **Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73-78, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010

NEVES, Ademir et al. A new asymmetric N5O2-donor binucleating ligand and its first FeII/FeIII complex as a model for the redox properties of uteroferrin. **Inorganica Chimica Acta**, v. 237, p. 131-135, 1995.

NIKOLIS, N.; METHENITIS, C.; PNEUMATIKAKIS, G. Studies on the interaction of altromycin B and its platinum(II) and palladium(II) metal complexes with calf thymus DNA and nucleotides. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 95, n. 2-3, p. 177-193, 2003.

PATHAK, T. P. et al. Synthesis and preliminary biological study of bisindolylmethanes accessed by an acid-catalyzed hydroarylation of vinyl indoles. **Tetrahedron**, v. 68, p. 5203-5208, 2012.

PAVIA, DONALD L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2013.

PERDEW, John P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. **Physical Review B**, v. 33, p. 8822–8824, 1986.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. **Physical Review Letters**, v.77, p. 3865-3868, 1996.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. **Physical Review Letters**, v. 78, p. 1396, 1997.

PIZARRO, A. M; SADLER, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1198–1211, 2009.

PYLE, A. M.; REHMANN, J. P.; MESHOYRER, R.; KUMAR, C. V.; TURRO, N. J.; BARTON, J. K., Mixed-ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 3051-3058, 1989.

QIAN, J. et al. Efficient double-strand cleavage of DNA mediated by Zn(II)-based artificial nucleases. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 20, p. 5617-5624, 2011.

RAYCROFT, Mark A. et al. Trifunctional Metal Ion-Catalyzed Solvolysis: Cu(II)-Promoted Methanolysis of *N,N*-bis(2-picolyl) Benzamides Involves Unusual Lewis Acid Activation of Substrate, Delivery of Coordinated Nucleophile, Powerful Assistance of the Leaving Group Departure. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 10325-10333, 2012.

RIOU, JEAN F. et al. Intoplicine (RP 60475), and its derivatives, a new class of antitumor agents inhibiting both topoisomerase I and II activities. **Cancer Research**, v. 15, n. 53, p. 5987-5993, 1993.

ROMARY, J. K.; BUNDS, J. E.; BARGER, J. D. Synthesis and Proton Dissociation Constants of 2,2'-Iminodimethylene Dipyridine (2,2'-Dipicolylamine). **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 12, n. 2, 1967.

RUSSEL, A. D. et al. Recent developments with strained metallocenophanes, **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 784, n. 20, p. 24-30, 2015.

SCHÄFER, A.; HORN, H.; AHLRICHS, R.. Fully optimized contracted Gaussian basic sets for atoms Li to Kr. **The Journal of Chemical Physics**, v. 97, p. 2571, 1992

SCHÄFER, A.; HUBER, C.; AHLRICHS, R. Fully optimized contracted Gaussian basic sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. **The Journal of Chemical Physics**, v. 100, n. 8, p. 5829, 1994.

SCARPELLINI, Marciela et al. Phosphate Diester Hydrolysis and DNA Damage Promoted by New cis-Aqua/Hydroxy Copper(II) Complexes Containing Tridentate Imidazole-rich Ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 25, p. 8353-8365, 2003.

SASIDHAR, B. S.; BIRADAR, J. S. Synthesis of some bisindolyl analogs for in vitro cytotoxic and DNA cleavage studies. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 3518-3526, 2013.

SILVEIRA, Claudio C. et al. Ce^{III}-promoted oxidation. Efficient aerobic one-pot eco-friendly synthesis of oxidized bis(indol-3-yl)methanes and cyclic tetra(indolyl)dimethanes. **Green Chemistry**, v. 14, p. 2912-2921, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

SHULTS, M. D.; IMPERIALI, B. Versatile fluorescent probes of protein kinase activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 47, p. 14248-14249, 2003.

Spectral Database for Organic Compounds, SDBS N°: 2231. Disponível em: <http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi>. Acessado em 05 de junho de 2018.

STIVAROU, T.; PATSAVOUDI, E. Extracellular Molecules Involved in Cancer Cell Invasion. **Cancers**, v. 7, n. 1, p. 238-265, 2015.

STROHALM, M. et al. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. **Rapid Communications in mass spectrometry: RCM**, v. 22, n. 6, p. 905-908, 2008.

STROHALM, M. et al. mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 11, p. 4648-4651, 2010.

TERENZI, Alessio et al. Zinc complexes as fluorescent chemosensors for nucleic acids: new perspectives for a “boring” element. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 8, p. 3527-3535, 2015.

TROST, B. M.; LAUTENS, M. Chemoselectivity and Stereocontrol in Molybdenum-Catalyzed Allylic Alkylations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 5, p. 1469-1478, 1987.

TUREL, I.; KLJUN, J. Interactions of metal ions with DNA, its constituents and derivatives, which may be relevant for anticancer research. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 21, p. 2661–2687, 2011.

UENO, T.; NAGANO, T. Fluorescent probes for sensing and imaging. **Nature Methods**, v. 8, n. 8, p. 642-645, 2011.

VAN DYKE, M. W.; HERTZBERG, R. P.; DERVAN, P. B. Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA: DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA.Fe(II). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 5470-5474, 1982.

WARING, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 269-282, 1965.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. **Nature Reviews**, v. 4, n. 4, p. 307-320, 2005.

WEIGEND, F.; AHLRICHS, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. **Physical chemistry chemical physics: PCCP**, v. 7, n. 18, p. 3297-3305, 2005.

WEN, X.; WANG, Q.; FAN, Z. An active fluorescent probe based on aggregation-induced emission for intracellular bioimaging of Zn²⁺ and tracking of interactions with single-stranded DNA. **Analytica Chimica Acta**, v. 1013, p. 79-86, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health statistics and information systems: Cancer**. Genebra, Suíça: WHO, 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/>>. Acesso em: 05 fevereiro 2018.

XAVIER, Fernando R. Desenvolvimento de Complexos Heterobinucleares a partir de Ligantes Binucleantes Contendo Braços Macrocíclicos, Piridínicos e Fenólicos como Modelos de Hidrolases/Nucleases Químicas. 2010. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

XAVIER, F. R.; BORTOLUZZI, A. J.; NEVES, A. A synthetic pathway for an unsymmetrical N(5)O(2) heptadentate ligand and its heterodinuclear iron(III)zinc(II) complex: a biomimetic model for the purple acid phosphatases. **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 9, p. 1794-1805, 2012.

ZELENT B. et all. Mutational analysis of allosteric activation and inhibition of glucokinase. **Biochem J**, v.440, p. 203–215, 2011.

ZHANG, Y.; YANG, Y. Comment on “Generalized Gradient Approximation Made Simple”. **Physical Review Letters**, v. 80, p. 890, 1998.

ZHANG, Feng et al. TPEN, a Specific Zn^{2+} Chelator, Inhibits Sodium Dithionite and Glucose Deprivation (SDGD)-Induced Neuronal Death by Modulating Apoptosis, Glutamate Signaling, and Voltage-Gated K^+ and Na^+ Channels. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 37, n. 2, p. 235-250, 2017.

ZHITOMIRSKY, B.; FARBER, H.; ASSARAF, Y. G. LysoTracker and MitoTracker Red are transport substrates of P-glycoprotein: implications for anticancer drug design evading multidrug resistance. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 4, p. 2131-2141, 2018.

ZUCCO, César. Química para um Mundo Melhor. **Revista Química Nova**, v. 34, n.5, p.733, 2011.

APÊNDICE A – Dados de IV, RMN de ^1H e ^{13}C para 6-bromohexan-1-ol (I)

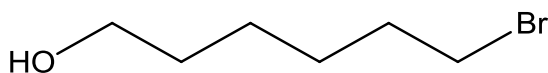
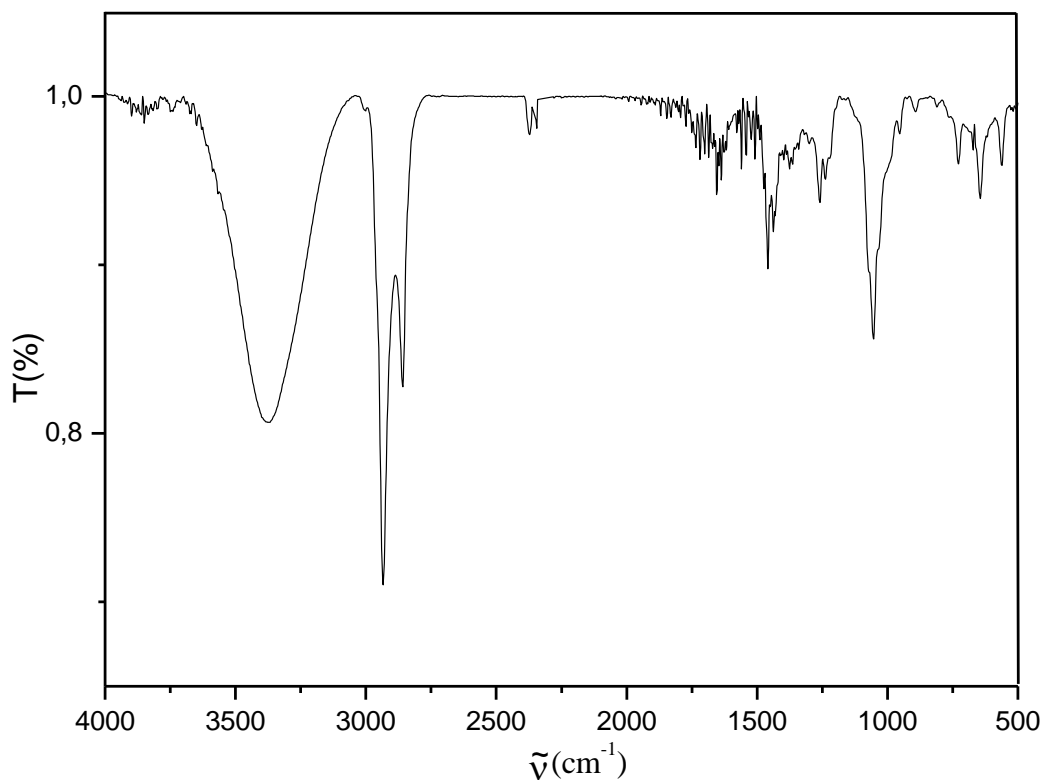
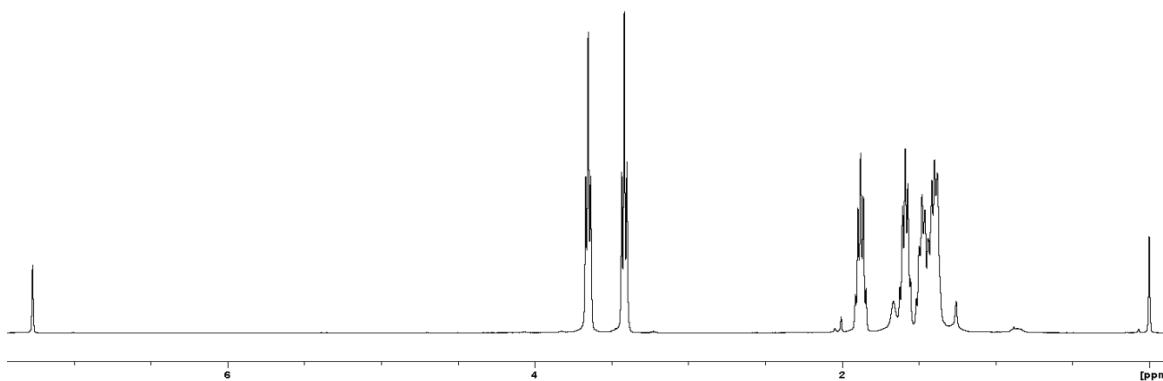


Figura A1 - Espectro de infravermelho do ligante L^{C5} em pastilha de KBr. **I.V. ν (cm^{-1} , KBr): 3378, 2933, 1456, 1261, 1224, 1049, 643.**



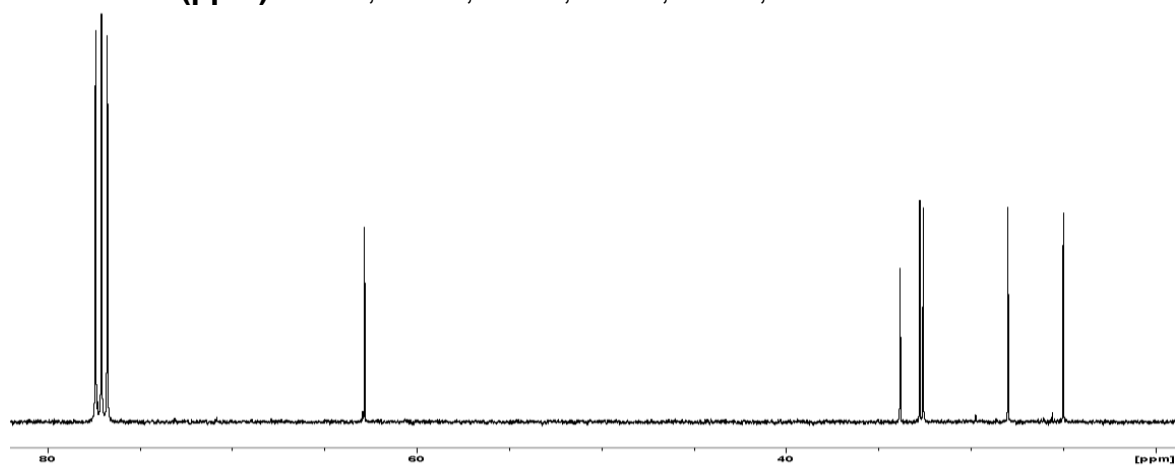
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura A2 - Espectro de RMN de ^1H para I. **RMN ^1H (400MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm): 1.53-1.35 (m, 4H); 1.59 (qn, 2H, $J = 7.085$ Hz); 1.59 (m, 4H); 1.88 (qn, 2H, $J = 7.08$ Hz); 3.42 (t, 2H, $J = 6.86$ Hz); 3.65 (t, 2H, $J = 6.41$ Hz);**



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura A3 - Espectro de RMN de ^{13}C para I. RMN ^{13}C (100 MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm): 24.95; 27.95; 32.53; 32.73; 33.79; 62.78.



APÊNDICE B – Dados de IV, RMN de ^1H e ^{13}C para 6-bromohexanal (II).

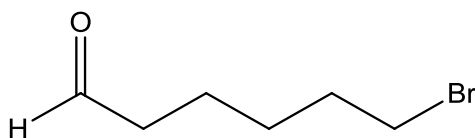
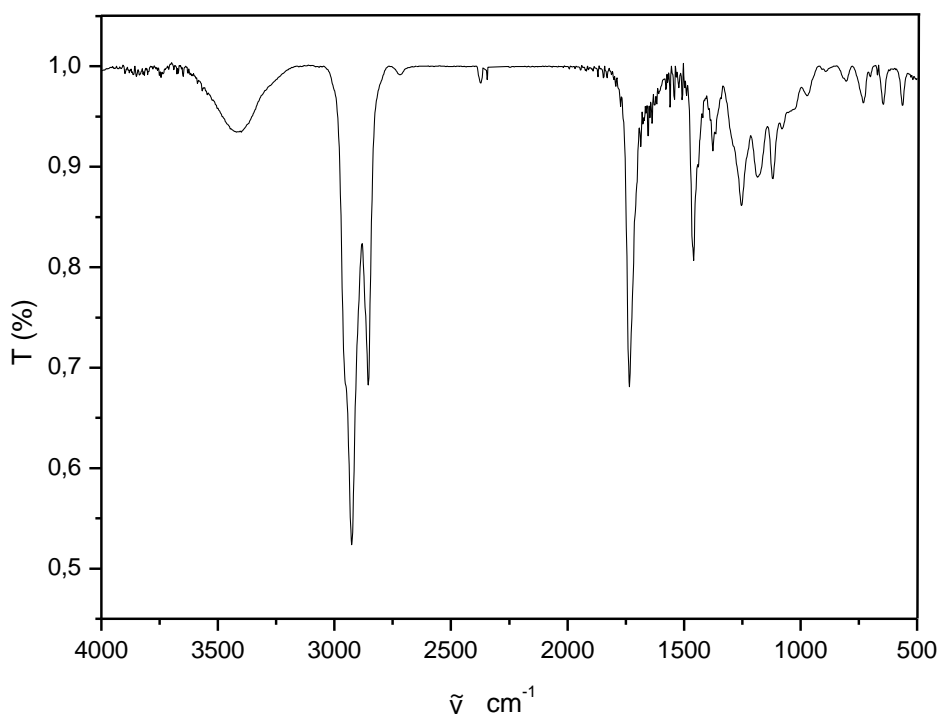
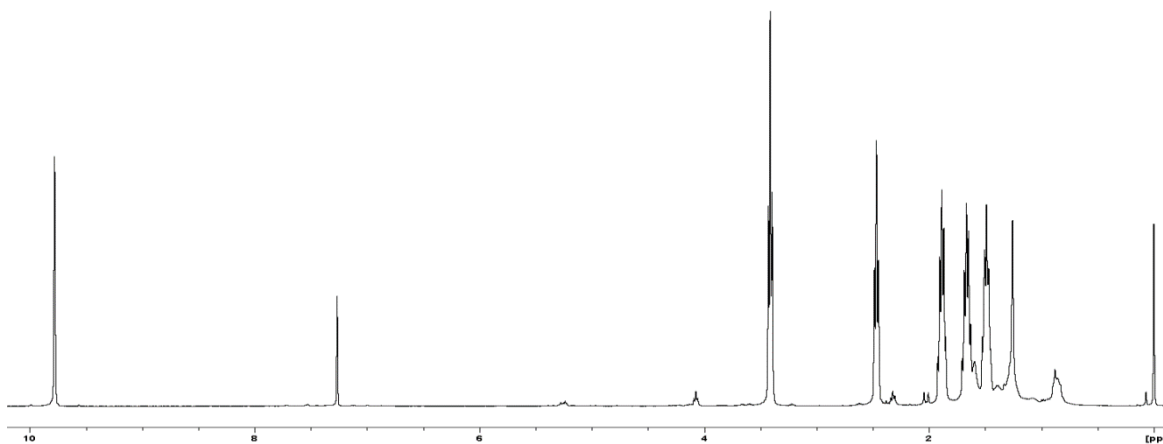


Figura B1 - Espectro de IV para II em pastilha de KBr. I.V. ν (cm^{-1} , KBr): 3410, 2929, 2854, 1732, 1454, 1254, 1073, 642.



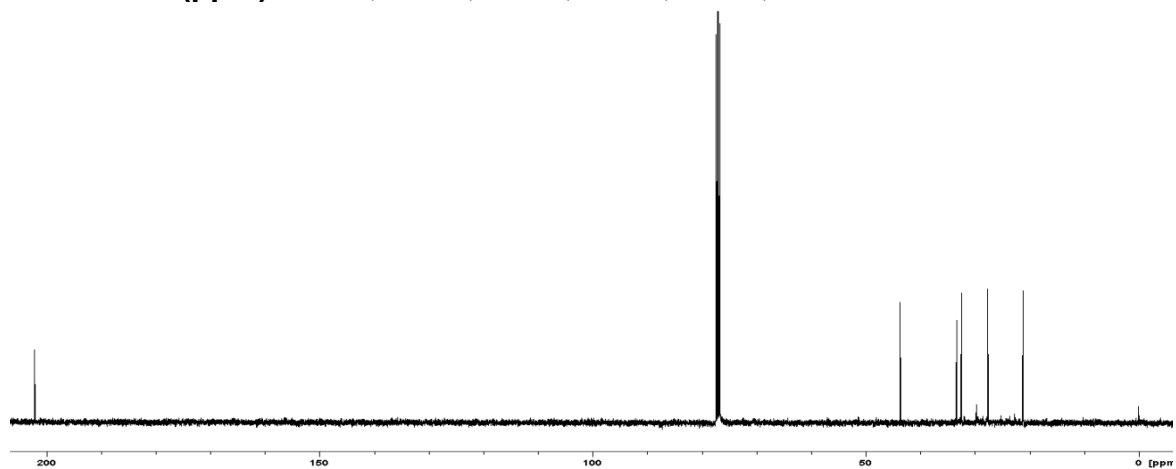
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura B2 - Espectro de RMN de ^1H para II. RMN ^1H (400MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm): 1.49 (m, 2H); 1.67 (qn, 2H, $J = 7.84$ Hz); 1.88 (qn, 2H, $J = 6.82$ Hz); 2.47 (t, 2H, $J = 7.16$ Hz); 3.41 (t, 2H, $J = 6.48$ Hz); 9.78 (s, 1H).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura B3 - Espectro de RMN de ^{13}C para II. RMN ^{13}C (100 MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm): 21.22; 27.70; 32.48; 33.38; 43.69; 202.15.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

APÊNDICE C – Dados de IV, RMN de ^1H e ^{13}C para 3,3'-(6-bromohexano-1,1-diil)bis(1-*H*-indol) (**III**)

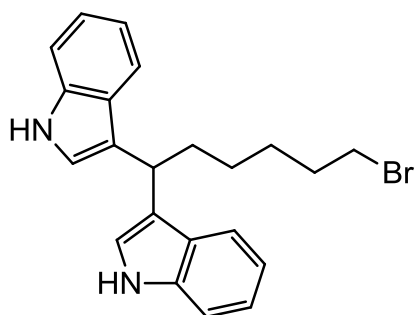
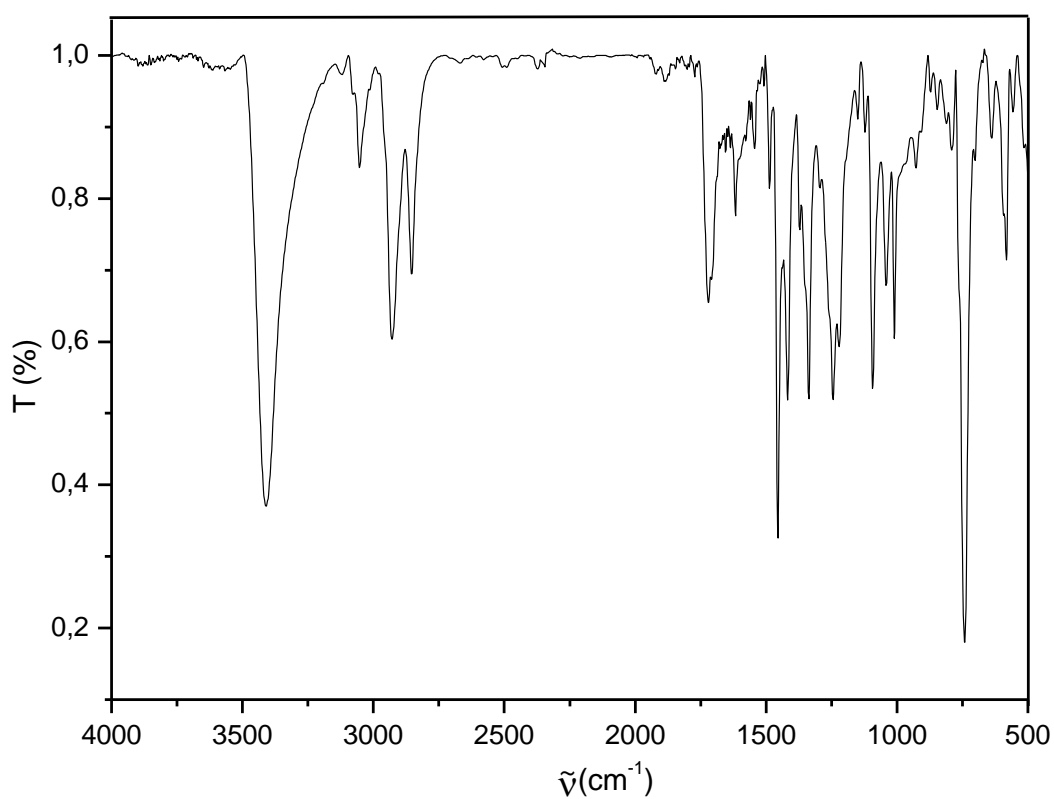
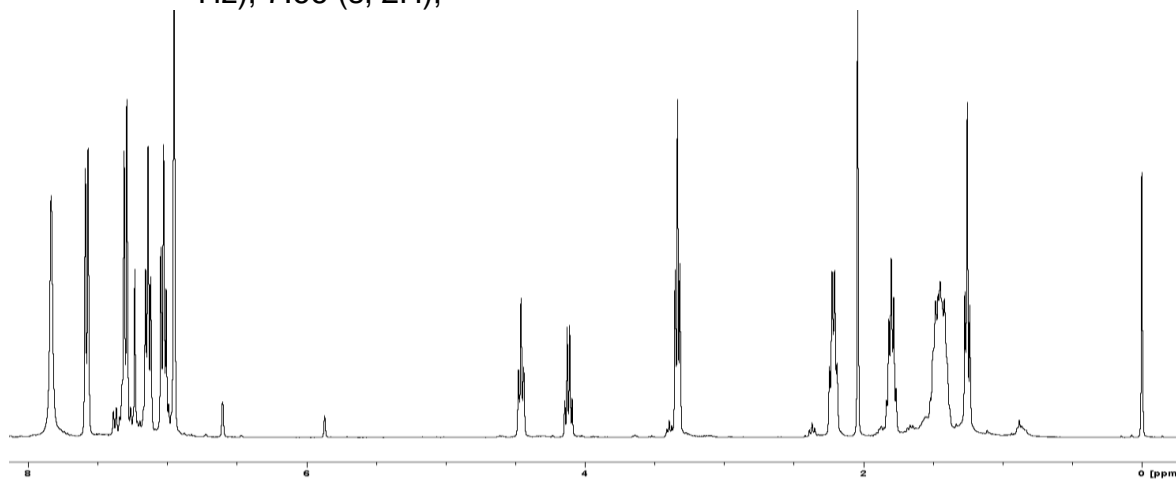


Figura C1 - Espectro de IV para **III** em pastilha de KBr. **I.V. ν (cm^{-1} , KBr)**: 3413, 3053, 2923, 2855, 1615, 1454, 1414, 1237, 1089, 1035, 743, 584.



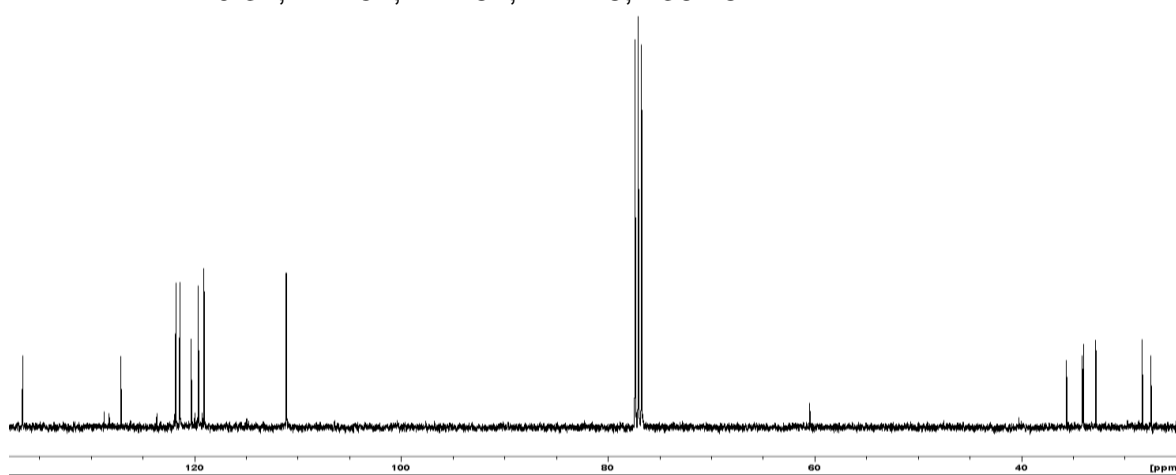
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura C2 - Espectro de RMN de ^1H para III. **RMN ^1H (400MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm):** 1.27-1.21 (m, 2H); 1.48-1.33 (m, 4H); 1.75 (quint, 2H, $J= 6.83$ Hz); 2.17 (q, 2H, $J= 7.31$ Hz); 3.29 (t, 2H, $J= 6.88$ Hz); 4.42 (t, 1H, $J= 7.19$ Hz); 6.84 (d, 2H, $J= 7,60$ Hz); 7.01 (t, 2H, $J= 7.60$ Hz); 7.11 (t, 2H, $J= 7,82$ Hz); 7.17 (s, 2H); 7.22 (d, 2H, $J= 8.02$ Hz); 7.56 (d, 2H, $J= 8,74$ Hz); 7.66 (s, 2H);



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura C3 - Espectro de RMN de ^{13}C para III. **RMN ^{13}C (100 MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm):** 27.48; 28.35; 32.83; 34.03; 34.13; 35.74; 111.22; 119.12; 119.67; 120.32; 121.52; 121.82; 127.18; 136.48.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

APÊNDICE D – Dados de IV, RMN de ^1H e ^{13}C para 6,6-di(1*H*-indol-3-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)hexan-1-amina (L^{C5})

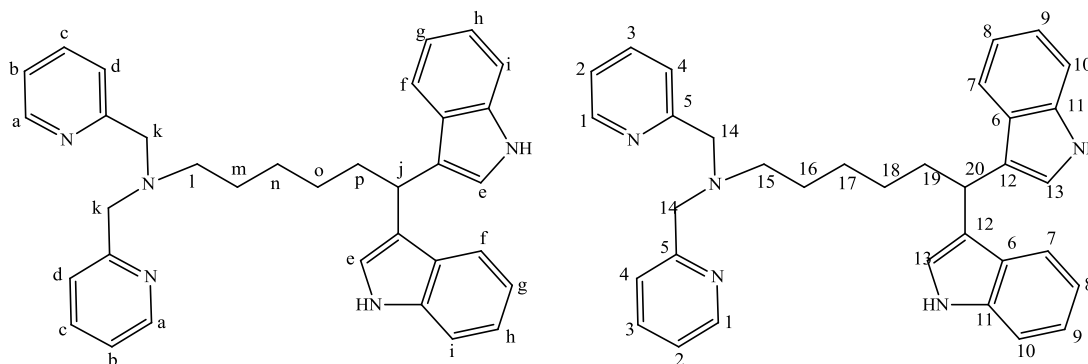
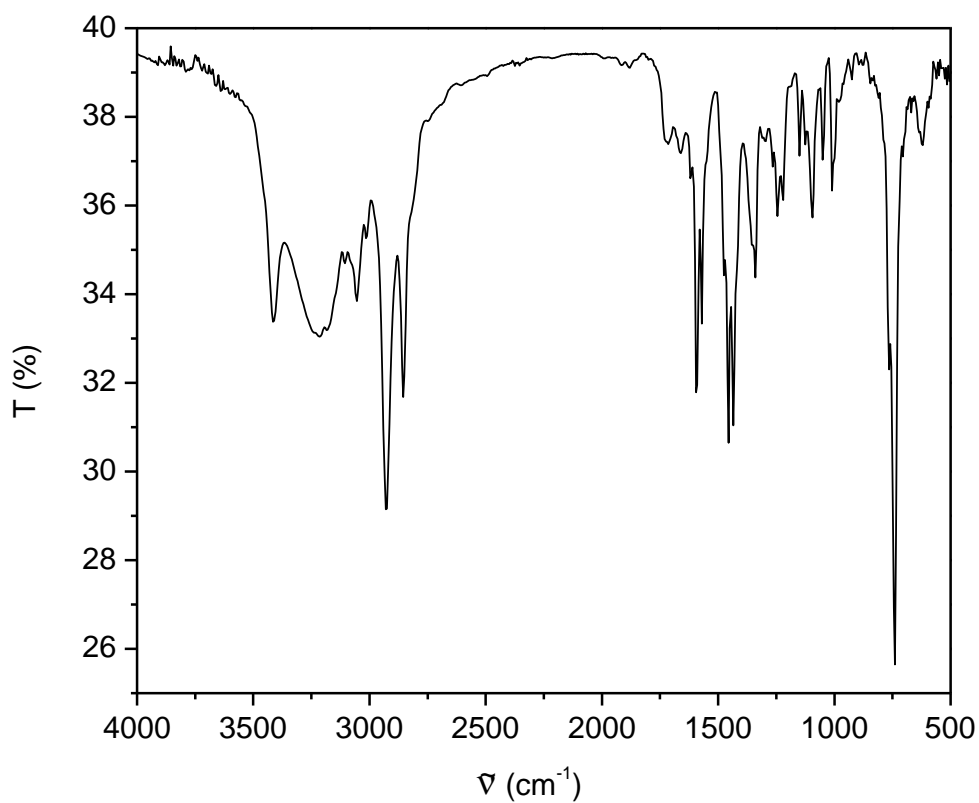
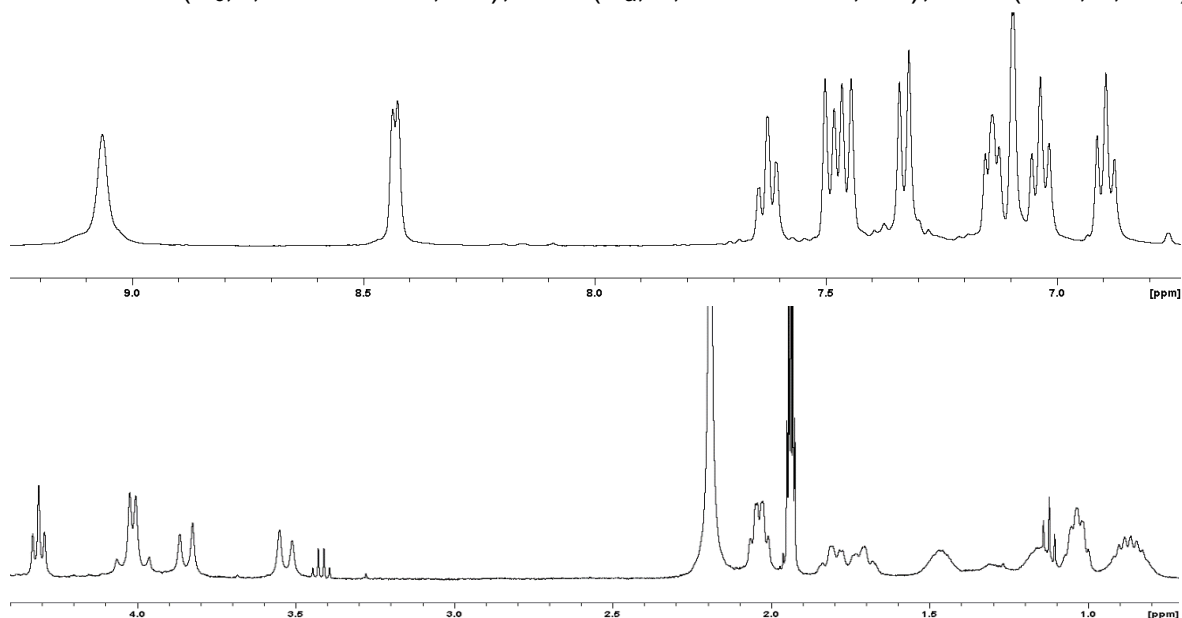


Figura D1 - Espectro de IV para L^{C5} em pastilha de KBr. **I.V. ν (cm^{-1} , KBr):** 3415, 3366-3096, 2928, 2853, 1620, 1585, 1459, 1095, 738, 619.



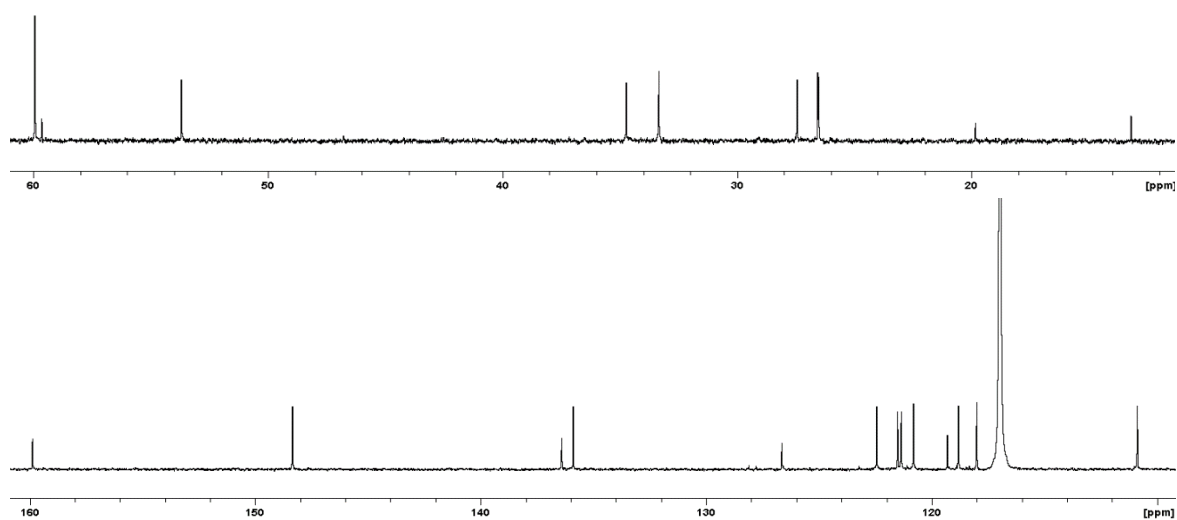
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura D2 - Espectro de RMN de ^1H para L^{C5} . **RMN ^1H (400MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm):** 1.37-1.20 (H_n e H_o , m, 4H); 1.44 (H_m , qn, $J = 6.88$ Hz; 2H); 2.14 (H_p , q, $J = 7.61$ Hz; 2H); 2.42 (H_l , t, $J = 7.17$ Hz; 2H); 3.69 (H_k , s, 4H); 4.36 (H_j , t, $J = 7.61$ Hz; 1H); 6.89 (H_g , t, $J = 7.61$ Hz; 2H); 7.03 (H_h , t, $J = 7.61$ Hz; 2H); 7.09 (H_e , s, 2H); 7.17-7.11 (H_b , m, 2H); 7.33 (H_i , d, $J = 7.61$ Hz; 2H); 7.45 (H_f , d, $J = 7.61$ Hz; 2H); 7.49 (H_d , d, $J = 7.61$ Hz; 2H); 7.63 (H_c , t, $J = 7.61$ Hz; 2H); 8.43 (H_a , d, $J = 4.03$ Hz; 2H); 9.06 (N-H, s, 2 H);



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

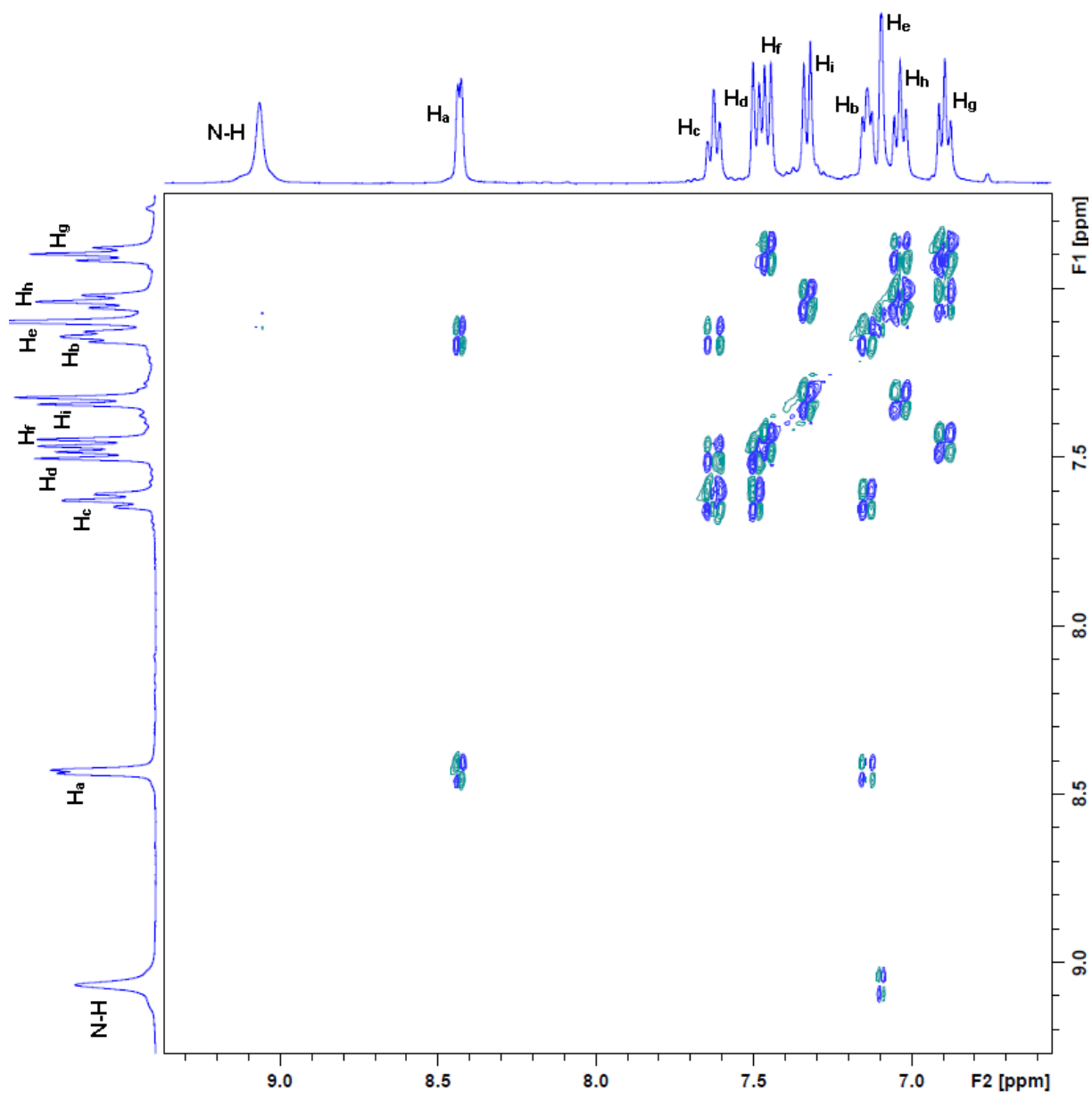
Figura D3 - Espectro de RMN de ^{13}C para L^{C5} . **RMN ^{13}C (100 MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm):** 26,51 (C_{16} e C_{17}); 27,45 (C_{18}); 33,42 (C_{20}); 34,77 (C_{19}); 53,72 (C_{15}); 60,04 (C_{14}); 110,96 (C_{10}); 118,02 (C_8); 118,86 (C_7); 119,40 (C_{12}); 120,81 (C_9); 121,30 (C_{13}); 121,55 (C_2); 122,48 (C_4); 126,66 (C_{11}); 135,93 (C_3); 136,41 (C_6); 148,37 (C_1); 160,00 (C_5).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

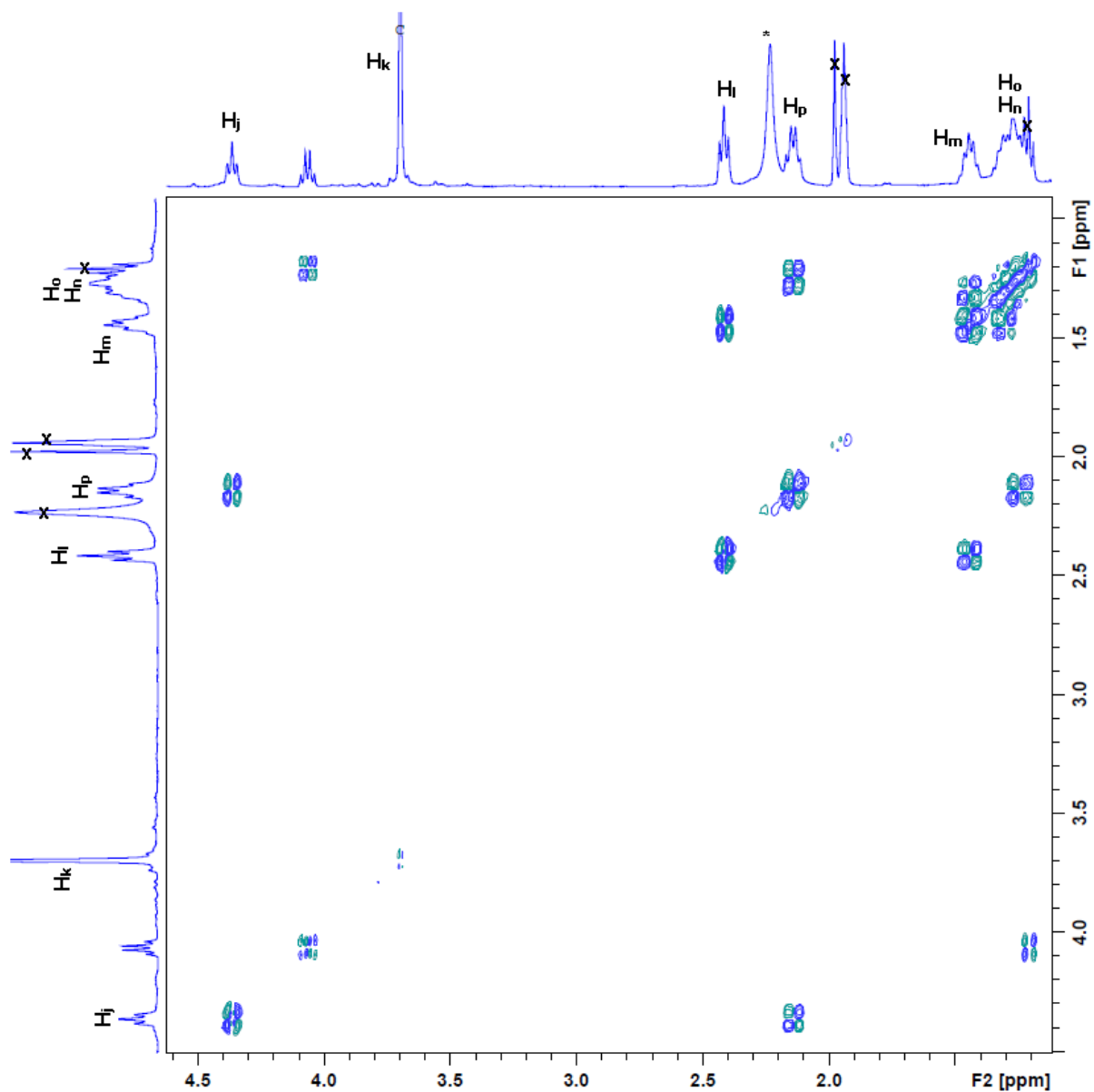
APÊNDICE E – Espectro de ^1H - ^1H COSY do L^{C5}

Figura E1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região aromática do RMN de ^1H (vertical) com aromática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

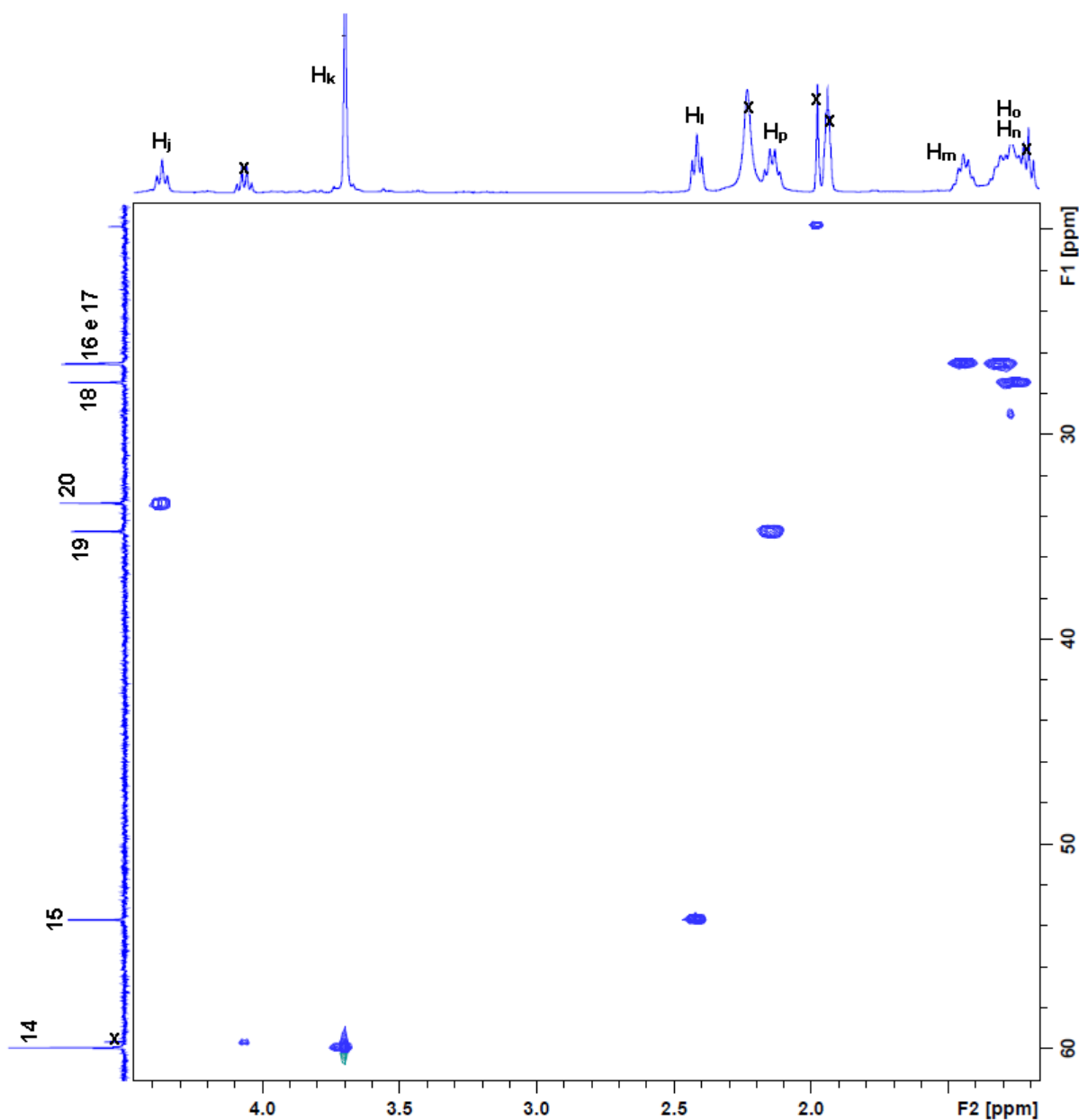
Figura E2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^1H (vertical) com alifática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

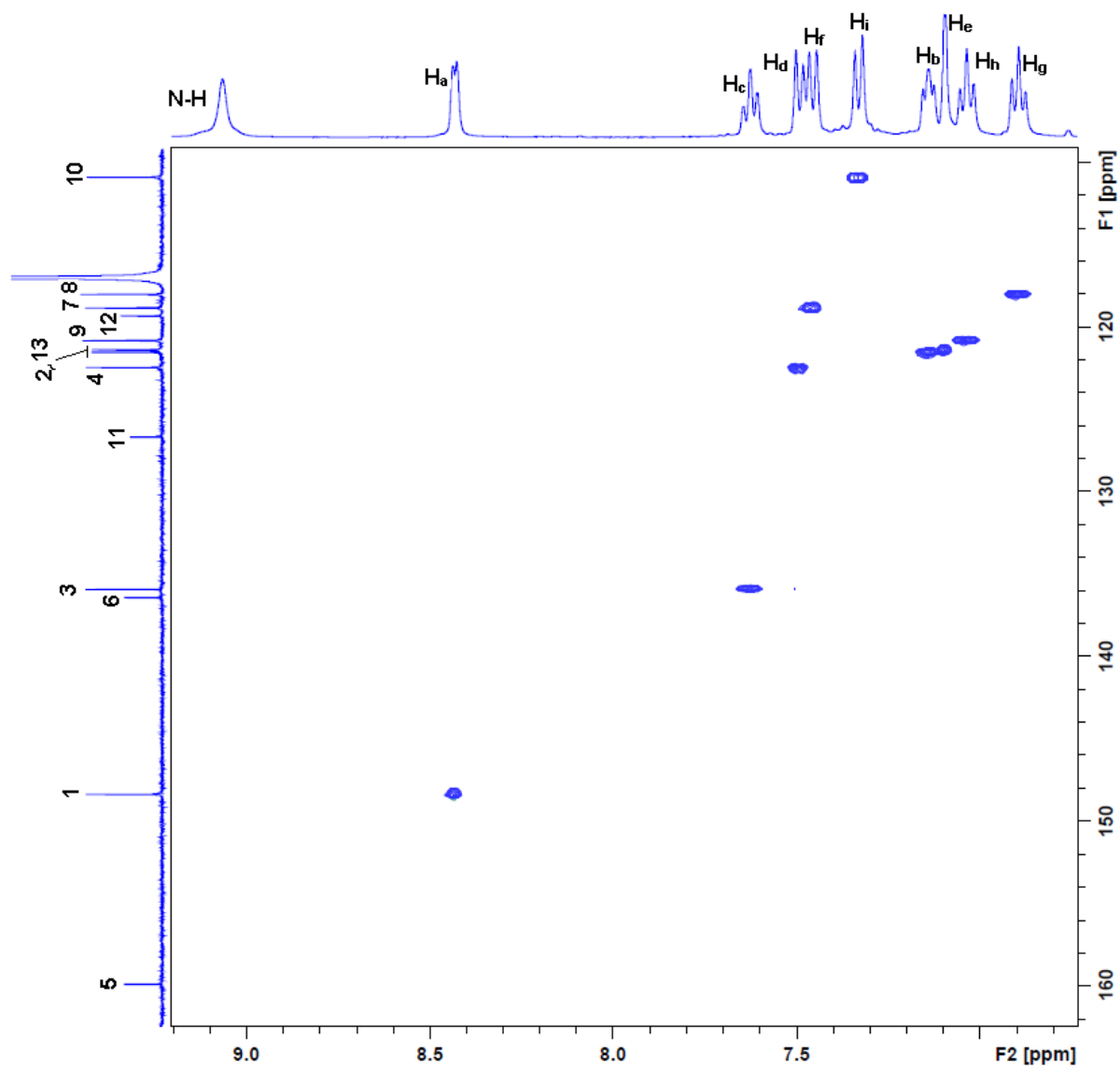
APÊNDICE F – Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do L^{C5}

Figura F1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^{13}C (vertical) com alifática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

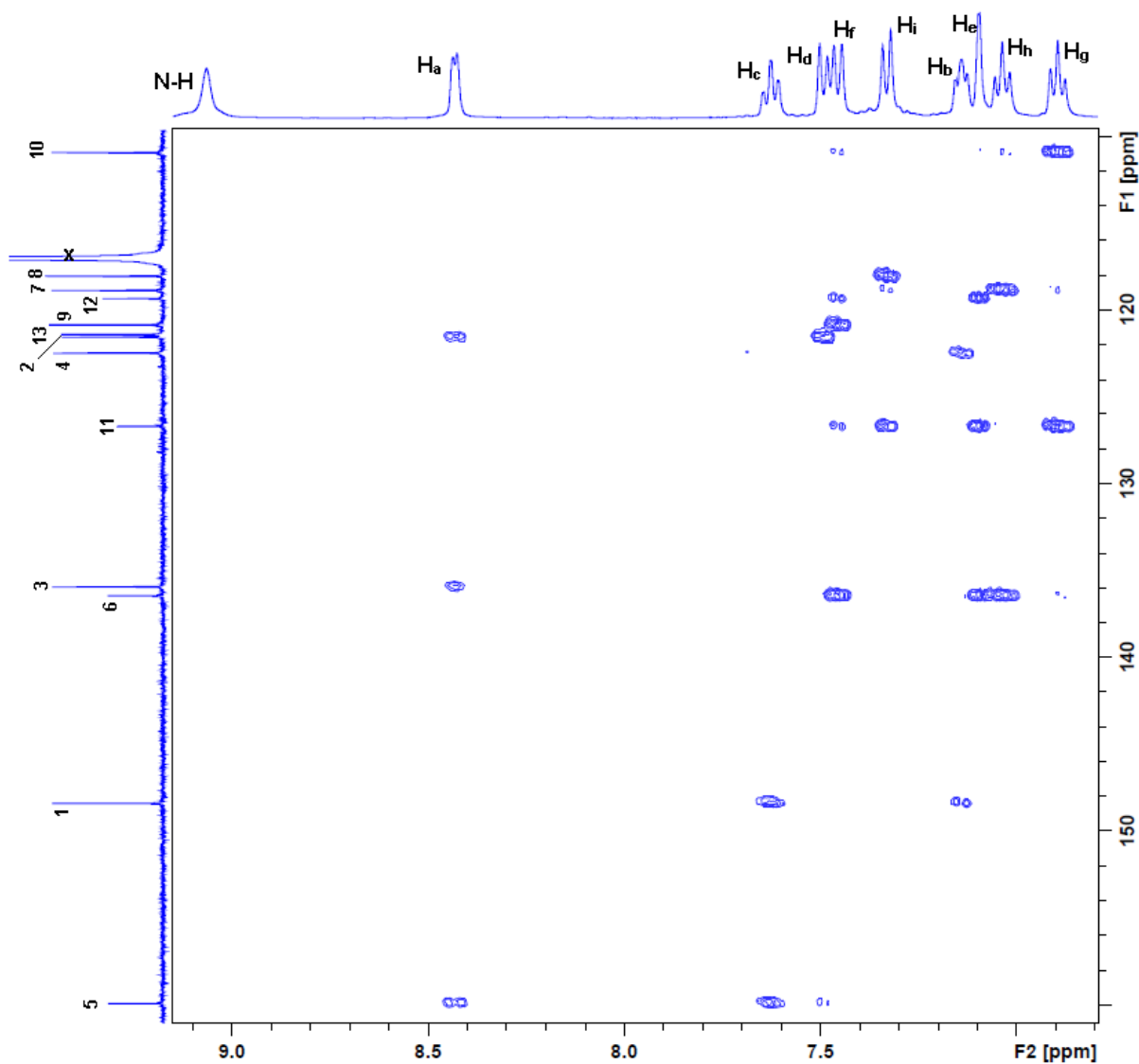
Figura F2- Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região aromática do RMN de ^{13}C (vertical) com aromática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

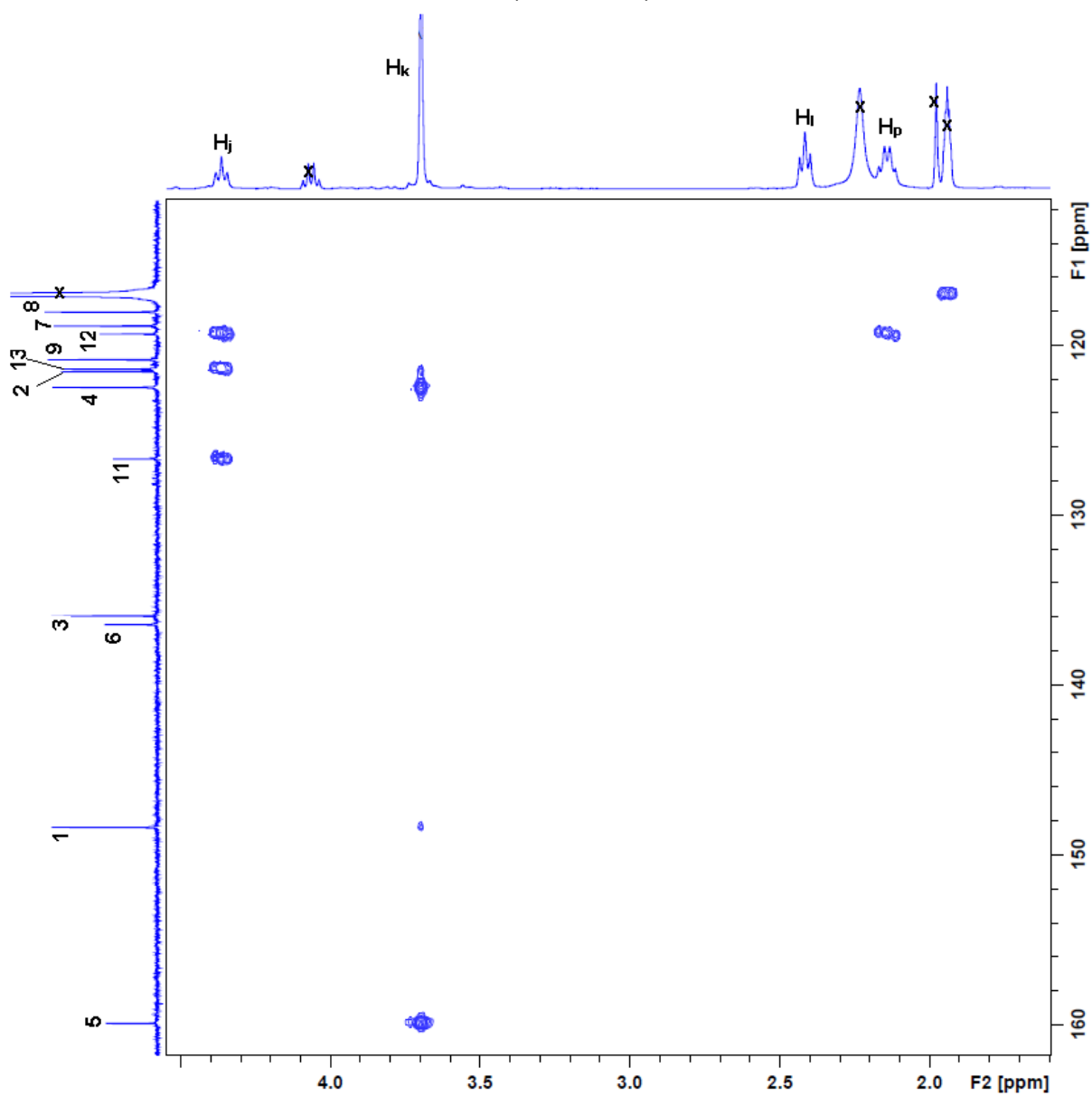
APÊNDICE G – Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do L^{C5}

Figura G1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região aromática do RMN de ^{13}C (vertical) com aromática do RMN de ^1H (horizontal).



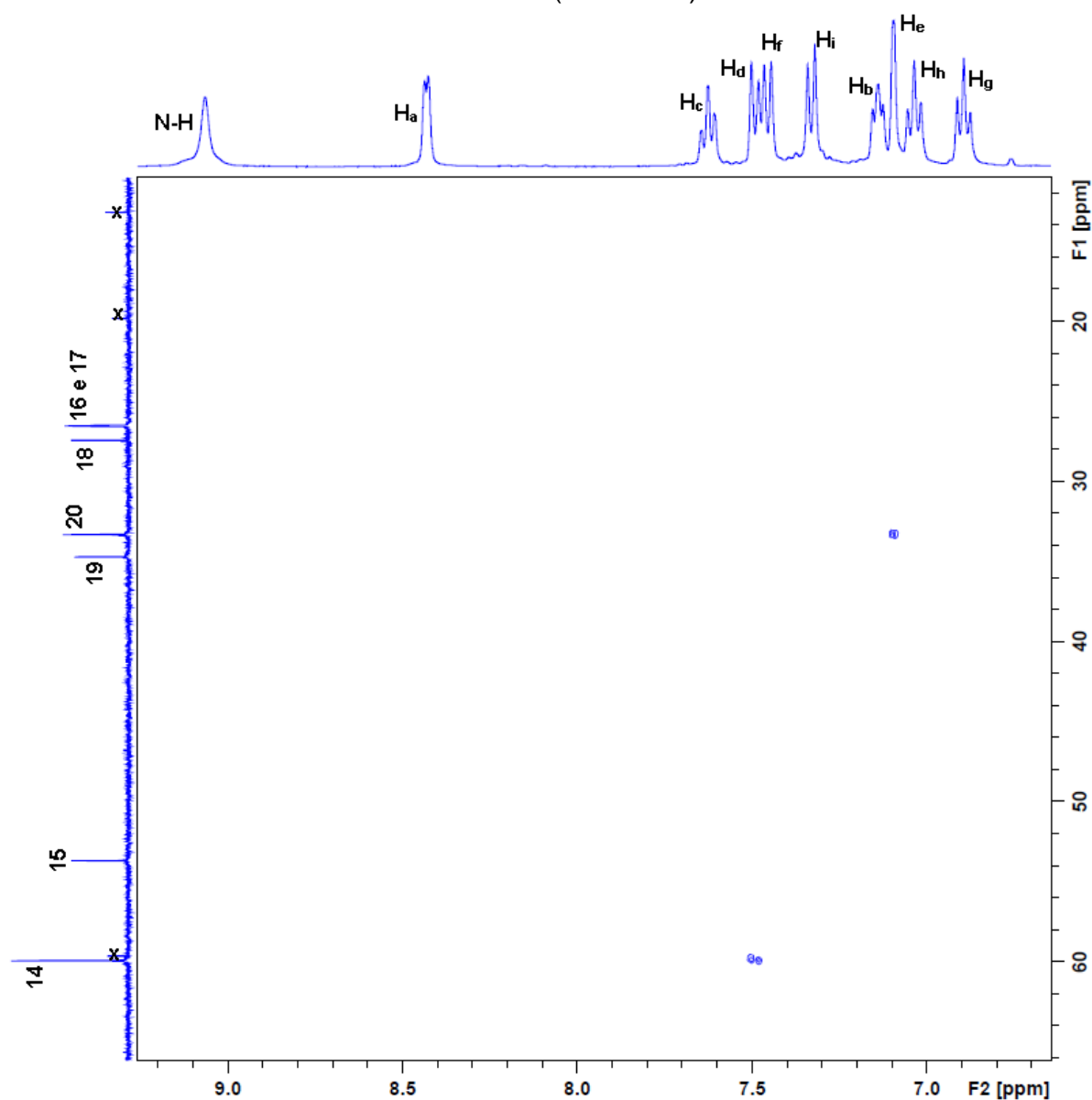
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura G2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região aromática do RMN de ^{13}C (vertical) com alifática do RMN de ^1H (horizontal).



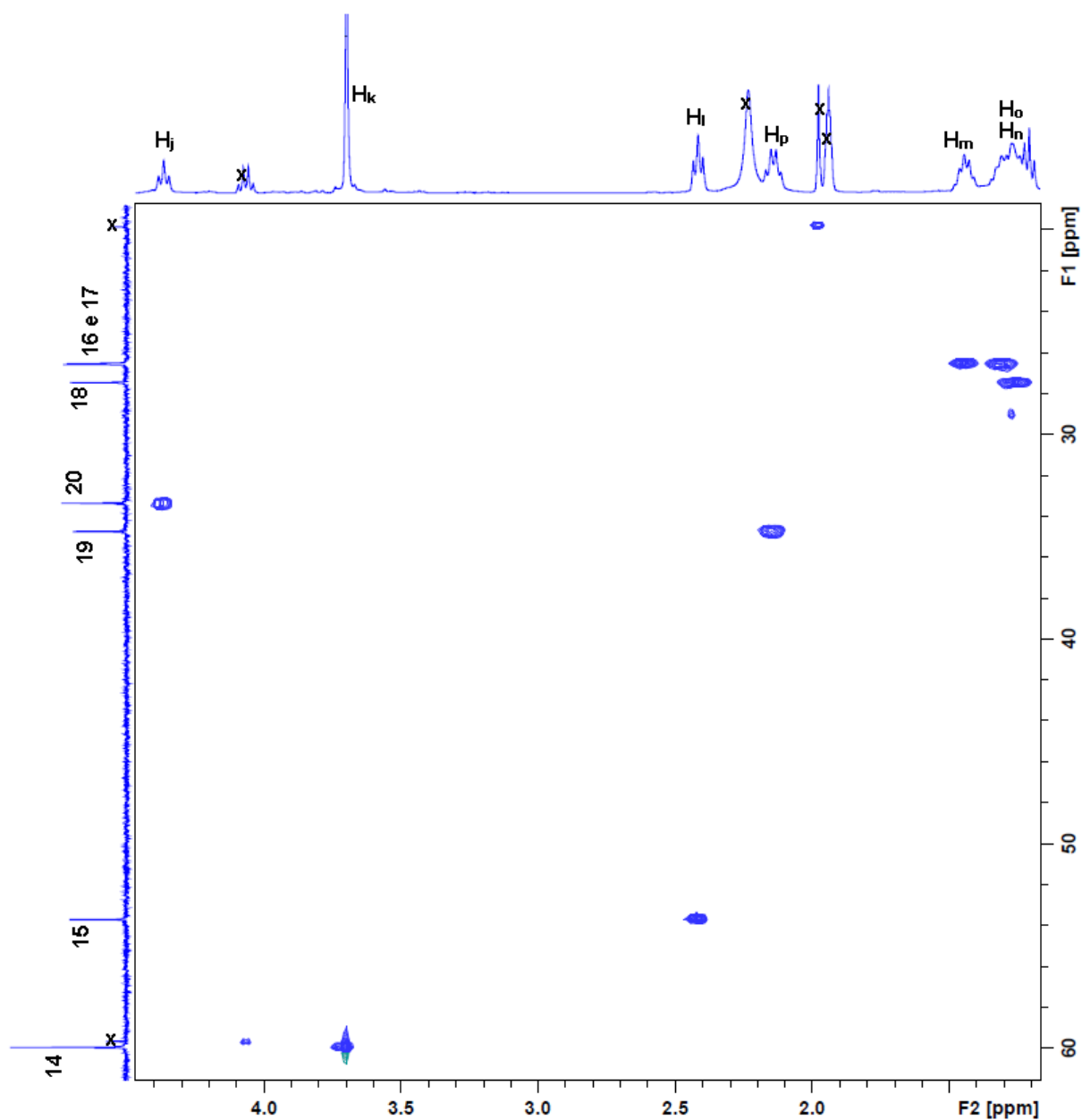
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura G3 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^1H (vertical) com aromática do RMN de ^{13}C (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

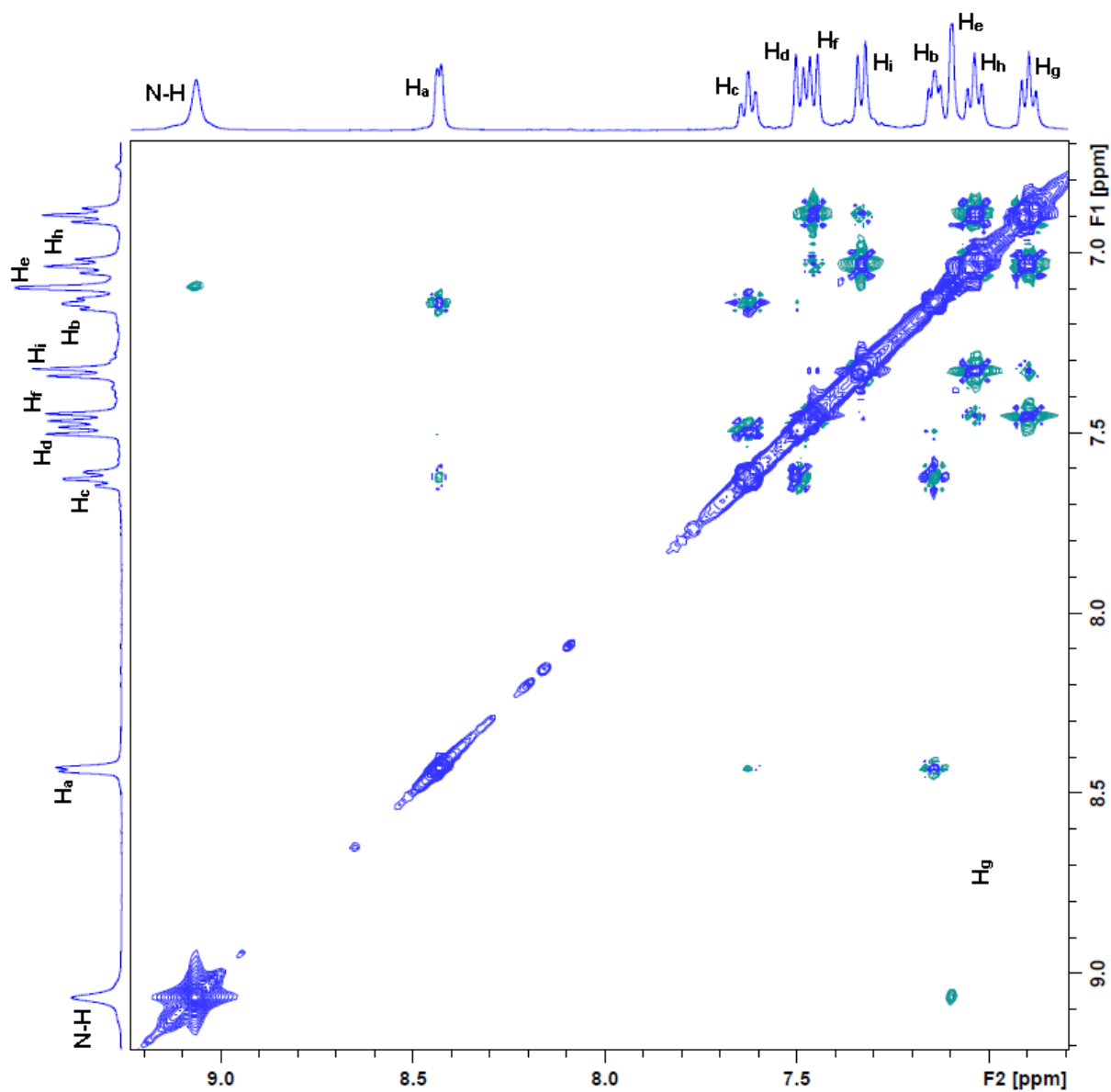
Figura G4 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^1H (vertical) com alifática do RMN de ^{13}C (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

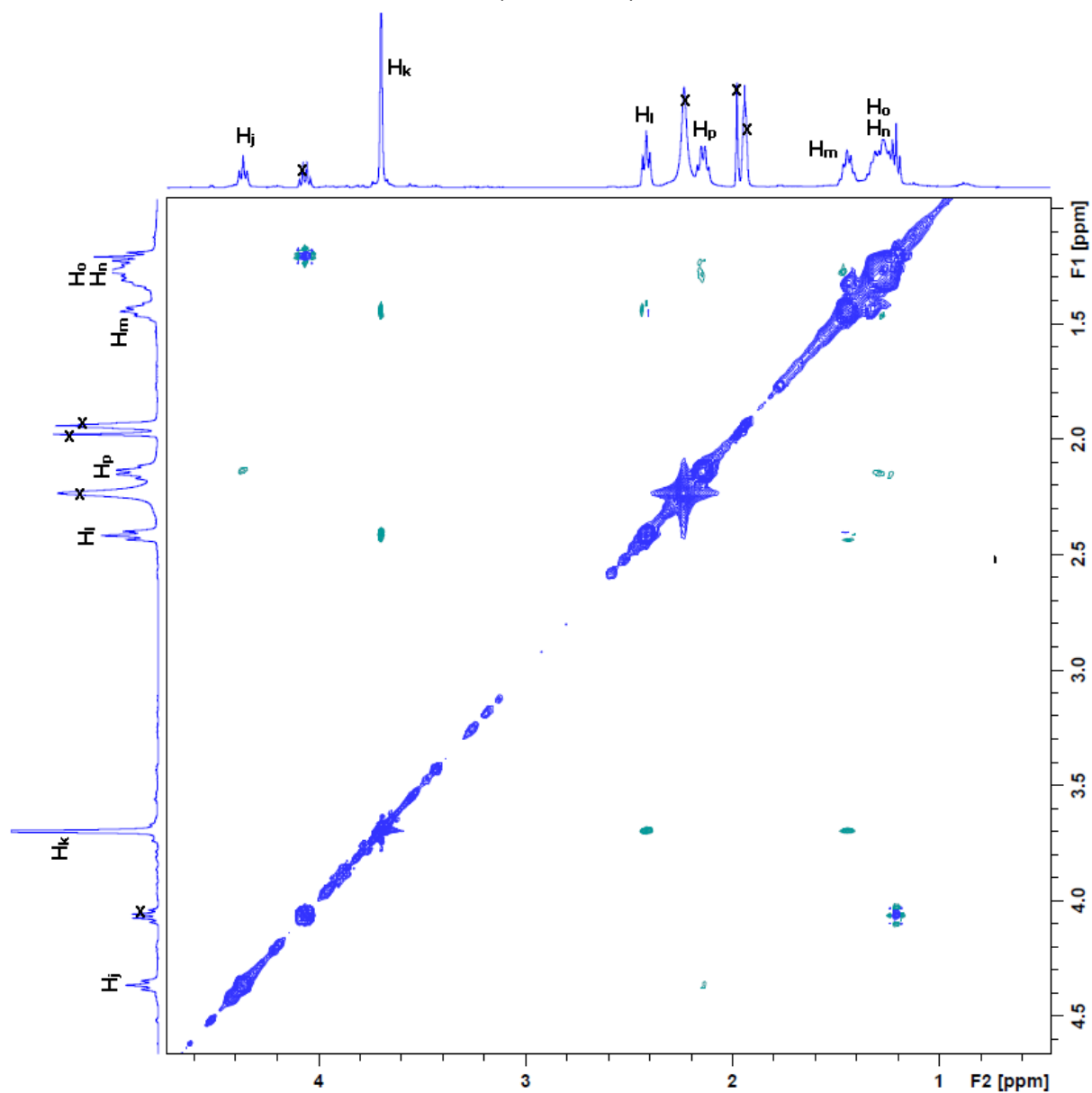
APÊNDICE H – Espectro de ^1H - ^1H NOESY do L^{C5}

Figura H1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região aromática do espectro de RMN de ^1H (vertical) com aromática do RMN de ^1H (horizontal).



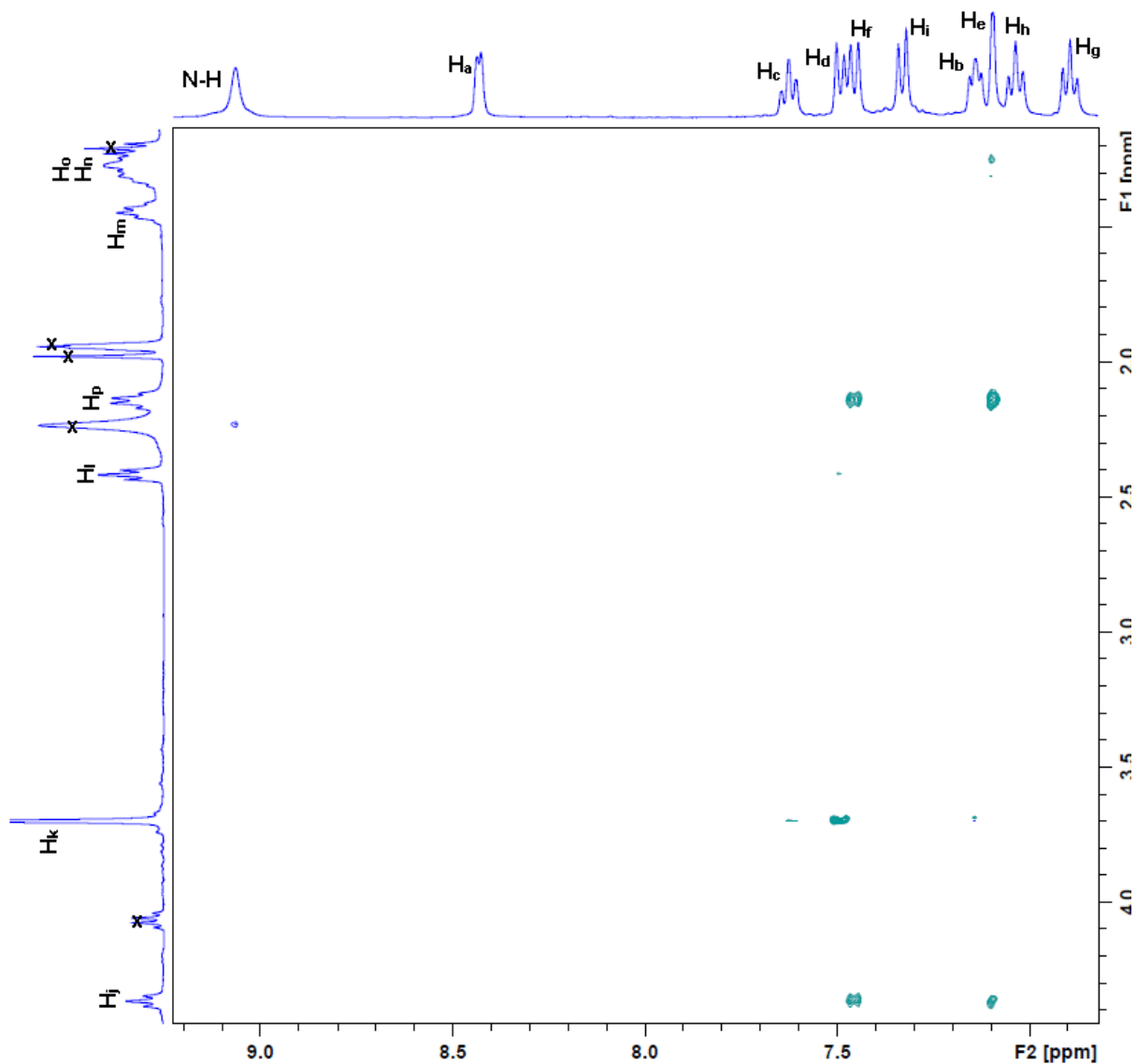
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura H2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^1H (vertical) com alifática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura H3 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do L^{C5} em CD_3CN correlacionando a região alifática do espectro de RMN de ^1H (vertical) com aromática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

APÊNDICE I – Dados de IV, RMN de ^1H e ^{13}C para 6,6-di(1*H*-indol-3-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)hexan-1-aminodiclorozinco(2+) (**1**)

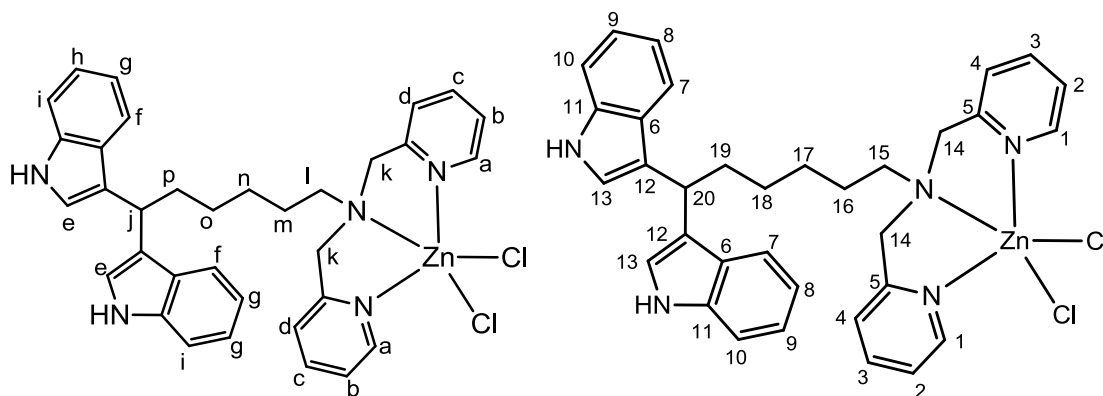
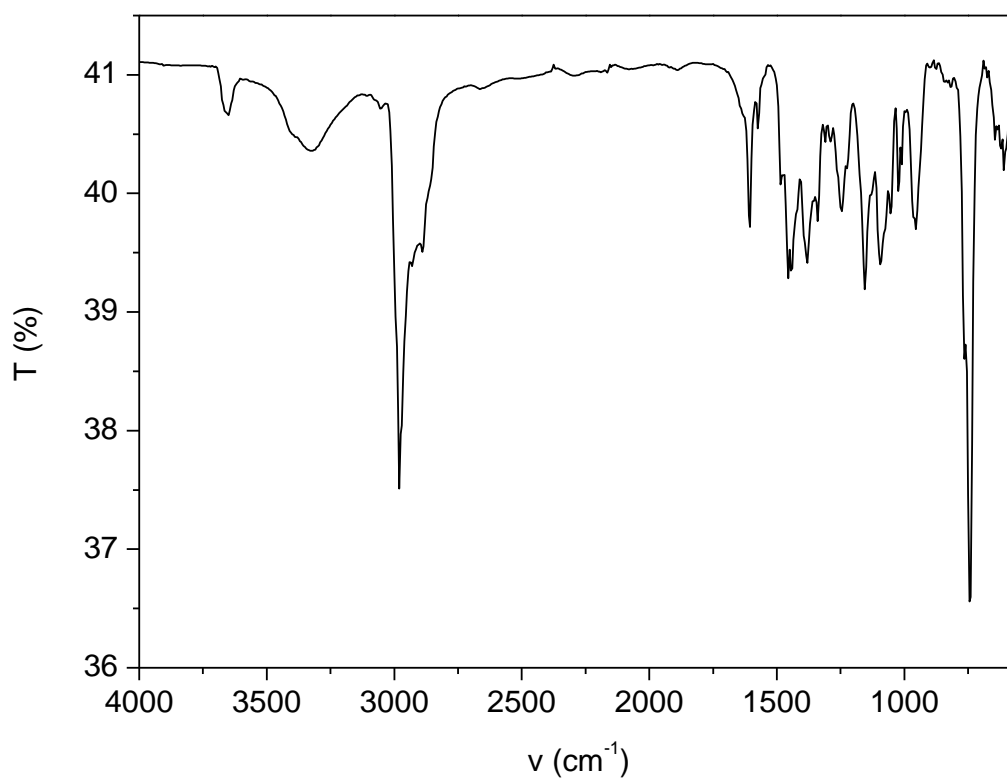
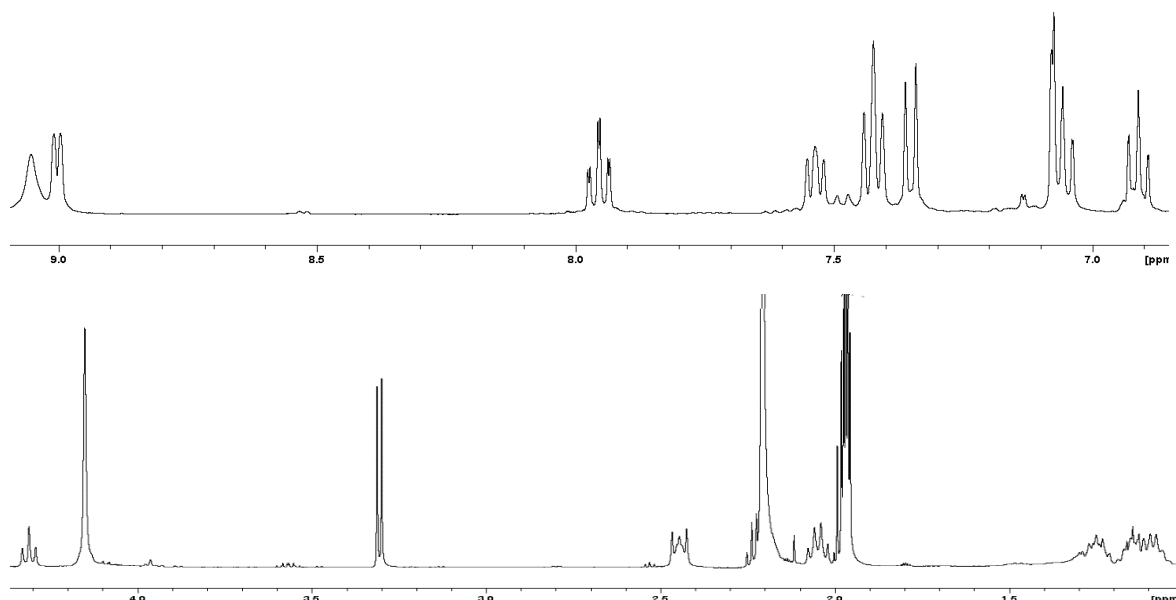


Figura I1 - Espectro de IV para **1** em pastilha de KBr. **I.V. ν (cm^{-1} , KBr):** 3653, 3496-3146, 3056, 2981, 2886, 1613, 1568, 1454, 1379, 1100, 737, 608.



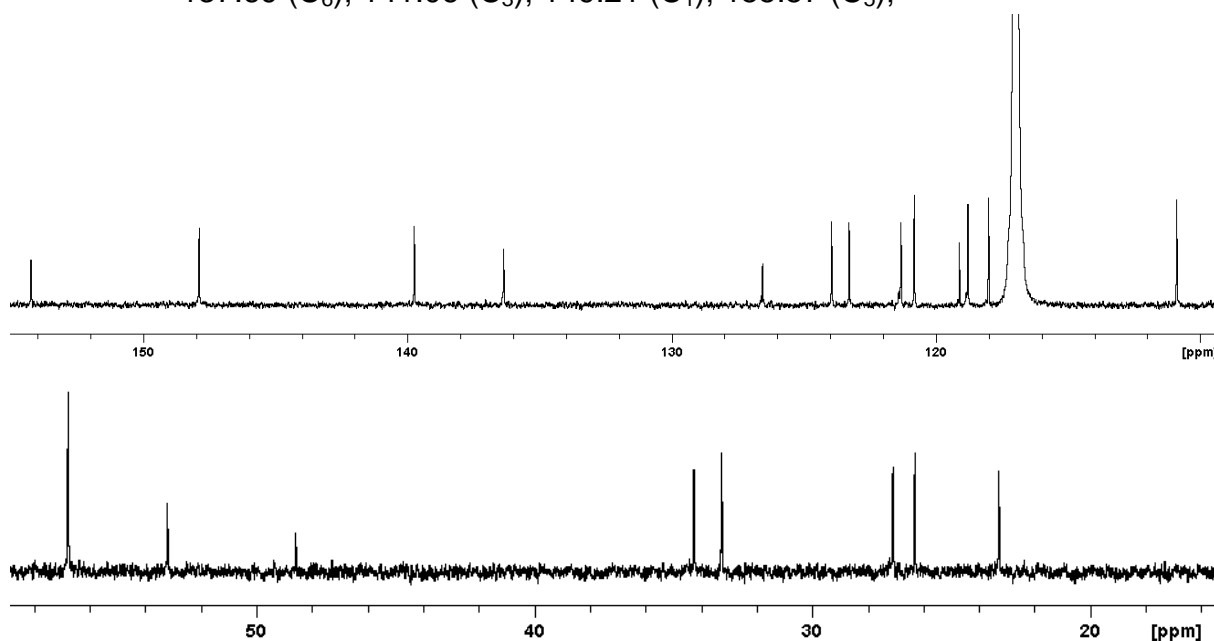
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura I2 - Espectro de RMN de ^1H para **1**. **RMN ^1H (400MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm):** 1.19-1.03 (H_n e H_o , m, 4H); 1.33-1.20 (H_m , m, 2H); 2.05 (H_p , q, $J = 7.39$ Hz, 2H); 2.48-2.41 (H_l , m, 2H); 4.15 (H_k , s, 4H); 4.31 (H_j , t, $J = 7.34$, 1H); 6.91 (H_g , t, $J = 7.34$ Hz, 2H); 7.09-7.03 (H_e e H_h , m, 4H); 7.35 (H_i , d, $J = 8.17$ Hz, 2H); 7.42 (H_b e H_f , t, $J = 7.24$ Hz, 4H); 7.56-7.51 (H_d , m, 2H); 7.98-7.93 (H_c , m, 2H); 9.00 (H_a , d, $J = 4.93$ Hz, 2H); 9.05 (s, N-H, 2H);



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

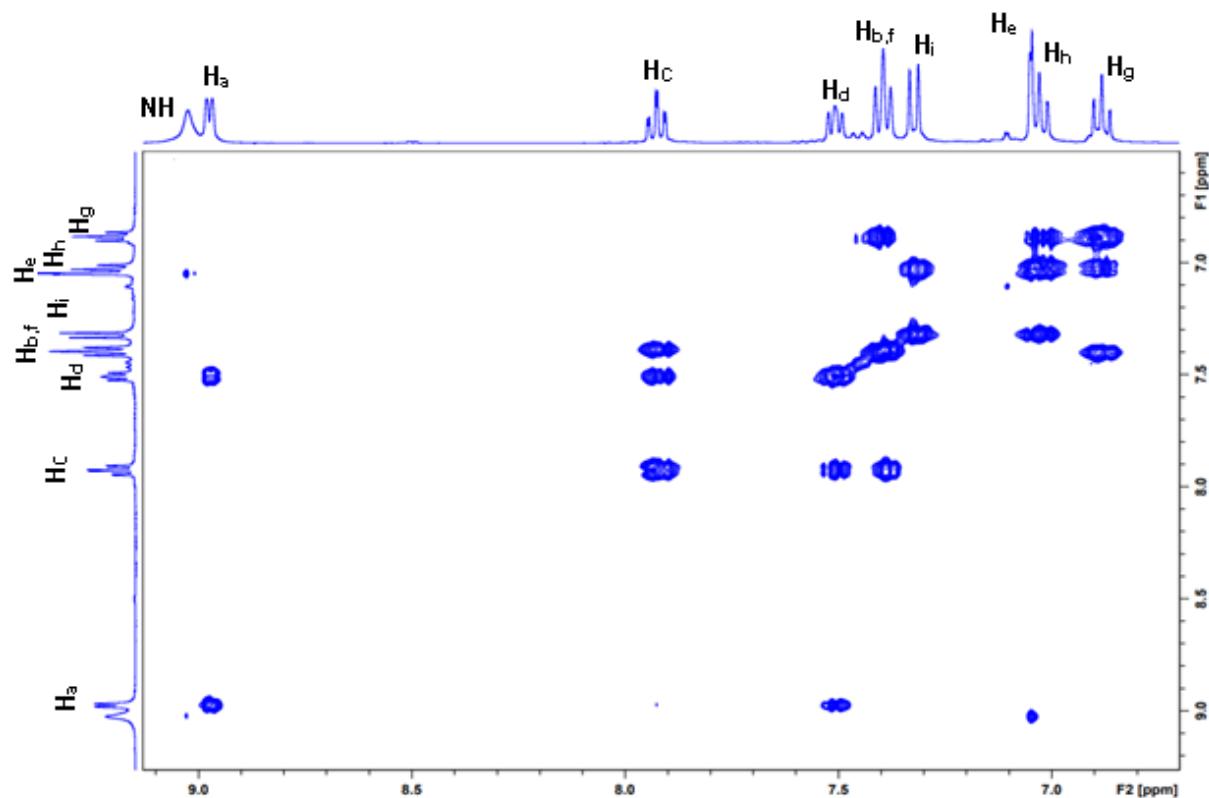
Figura I3 - Espectro de RMN de ^{13}C para **1**. **RMN ^{13}C (100 MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm):** 24.59 (C_{16}); 27.61 (C_{17}); 28.40 (C_{18}); 34.56 (C_{20}); 35.56 (C_{19}); 54.51 (C_{15}); 58.07 (C_{14}); 112.21 (C_{10}); 119.33 (C_8); 120.11 (C_7); 120.44 (C_{12}); 122.14 (C_9); 122.65 (C_{13}); 124.61 (C_2); 125.27 (C_4); 127.88 (C_{11}); 137.69 (C_6); 141.06 (C_3); 149.21 (C_1); 155.57 (C_5);



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

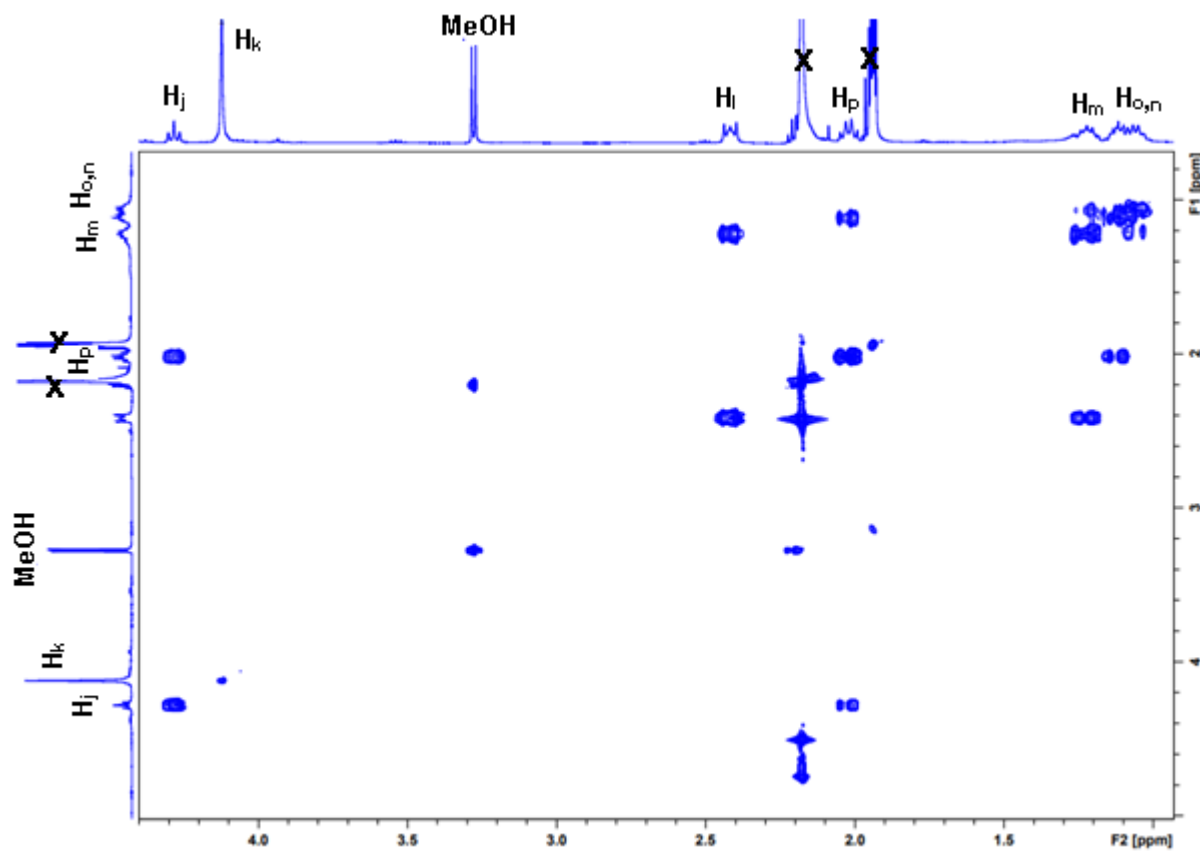
APÊNDICE J – Espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo 1

Figura J1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo 1 em CD_3CN correlacionando a região aromática do espectro de RMN de ^1H (vertical) com aromática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

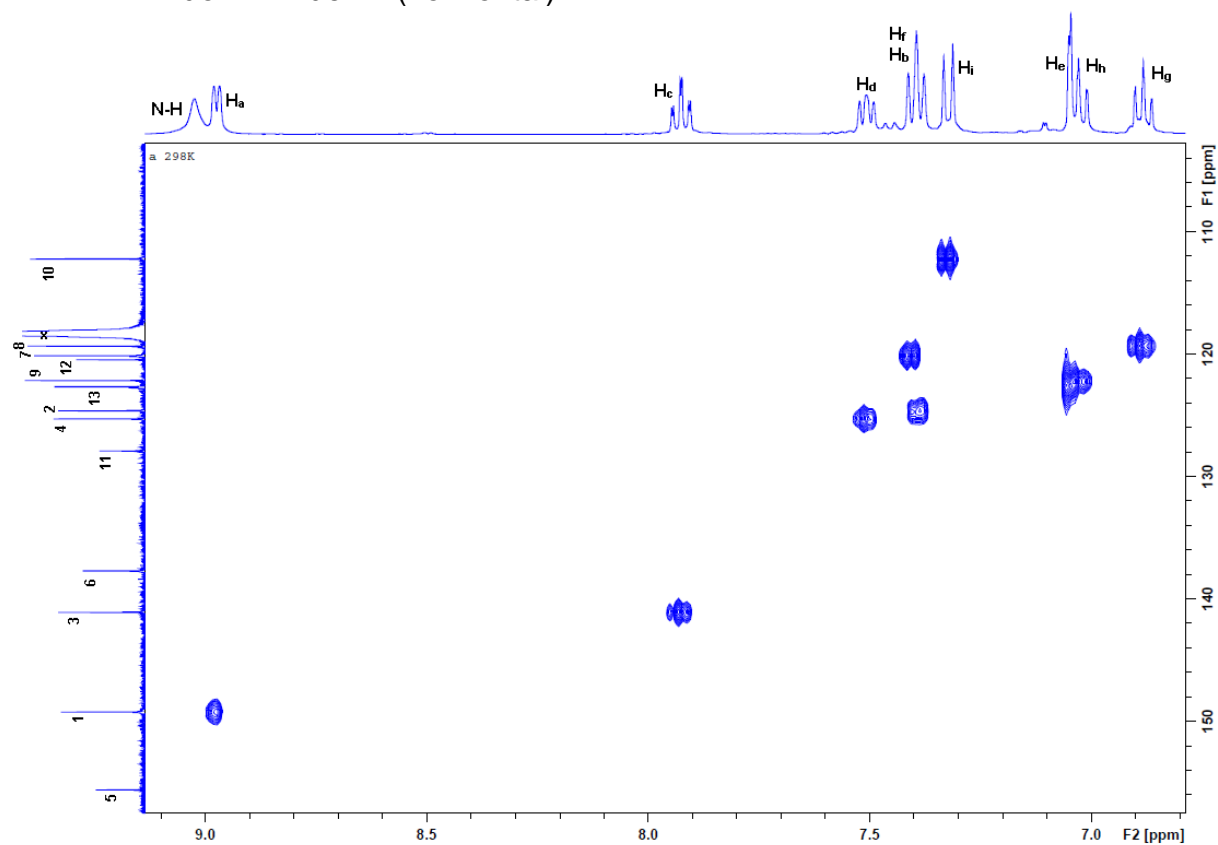
Figura J2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo 1 em CD_3CN correlacionando a região alifática (vertical) e alifática (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

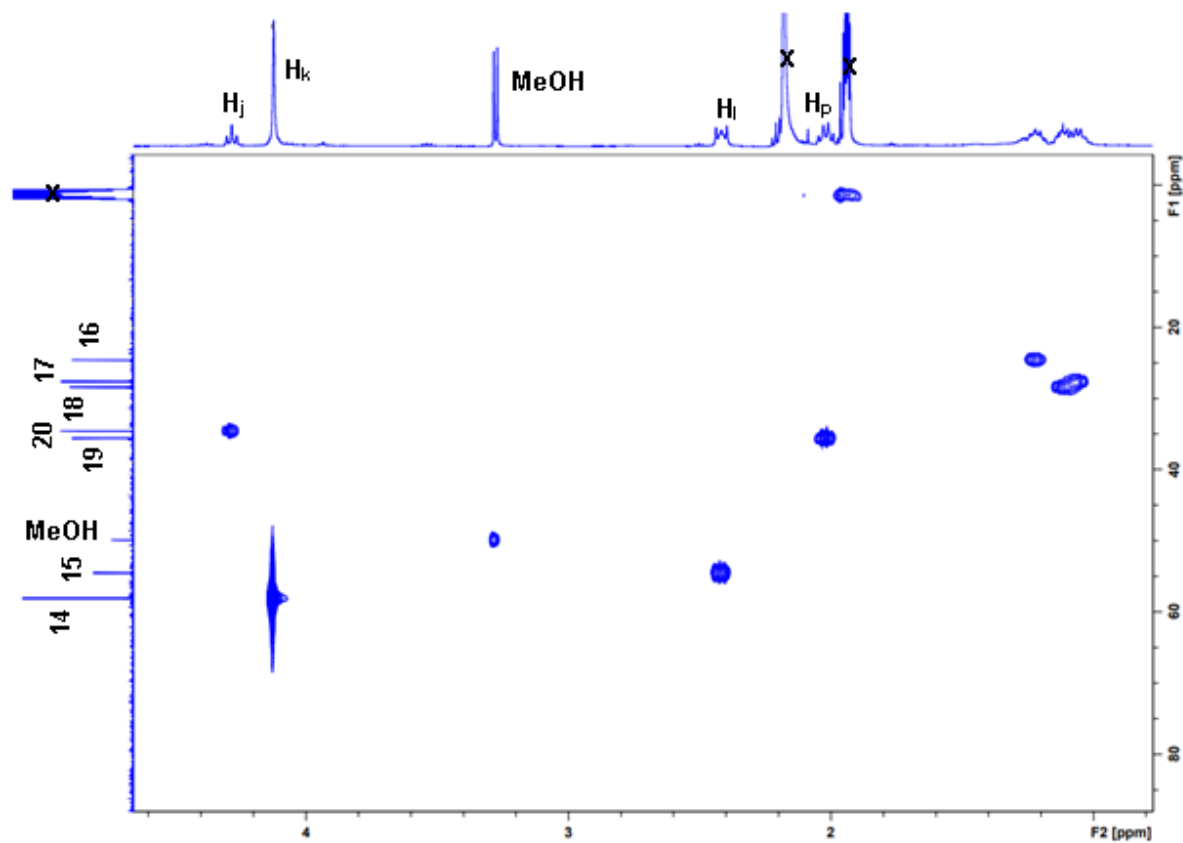
APÊNDICE K – Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do complexo 1

Figura K1- Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do complexo 1 em CD_3CN correlacionando a região aromática do RMN de ^{13}C (vertical) e aromática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

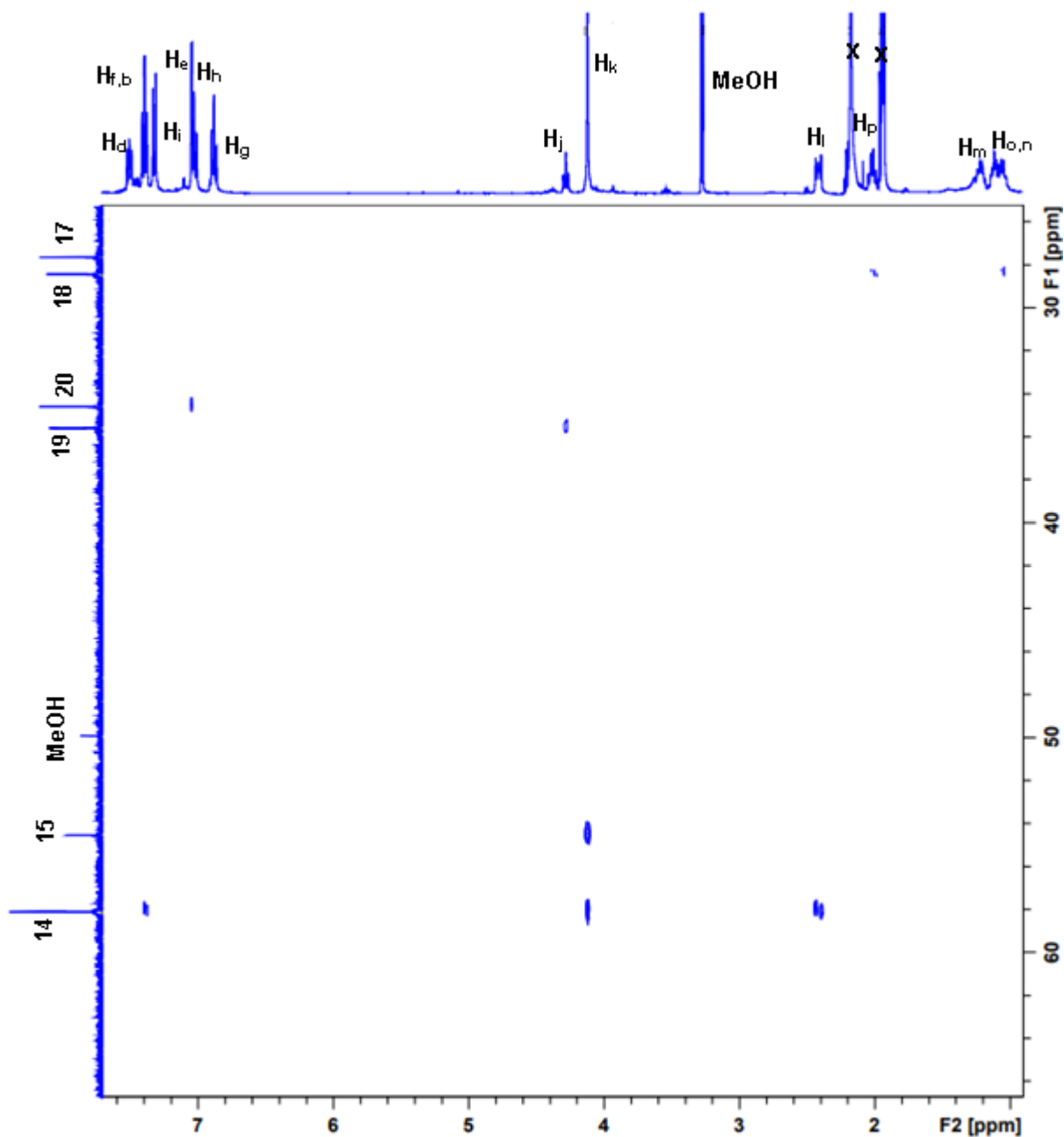
Figura K2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do complexo 1 em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^{13}C (vertical) e alifática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

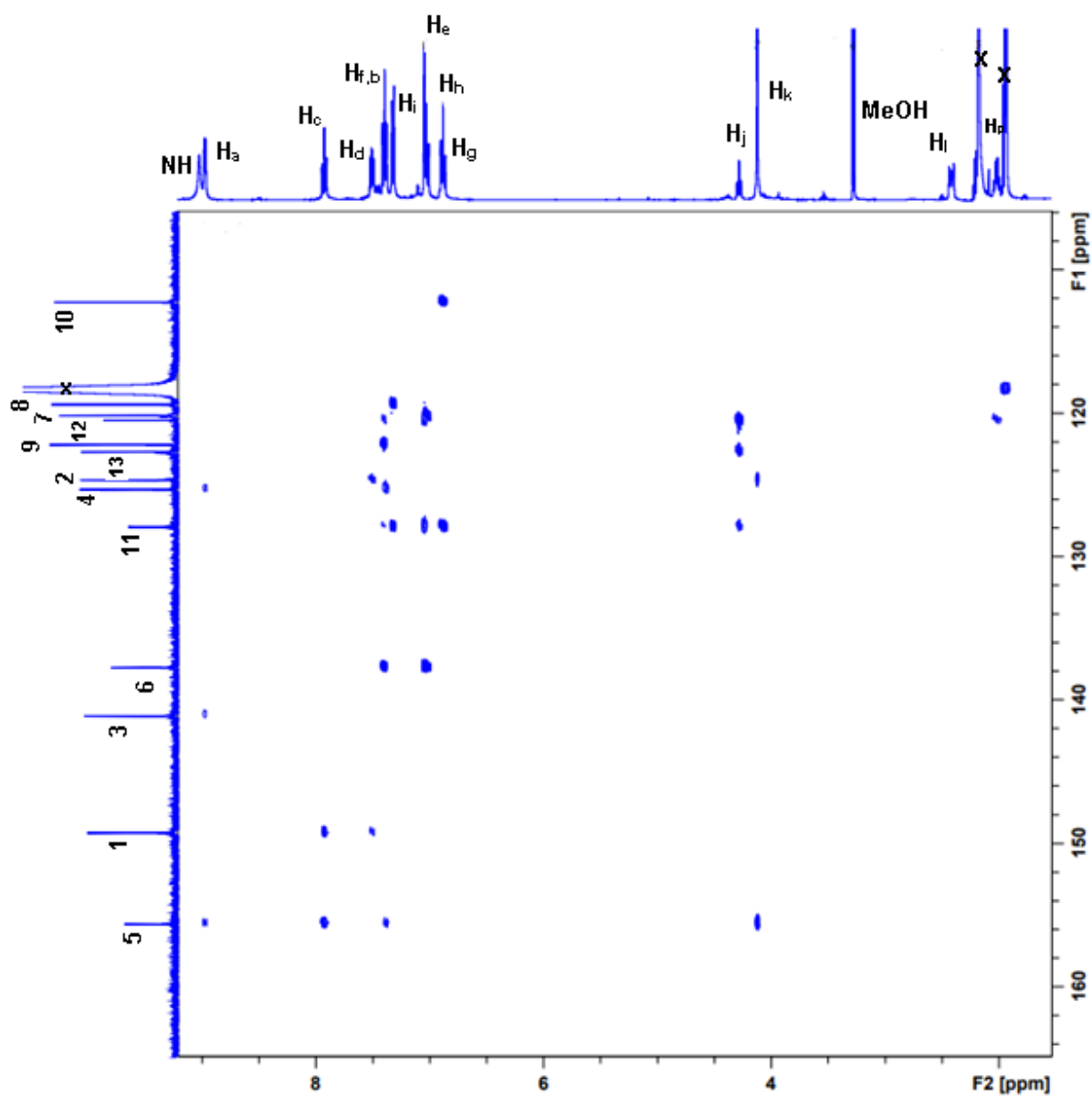
APÊNDICE L – Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do complexo 1

Figura L1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do complexo 1 em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^{13}C (vertical) com o RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

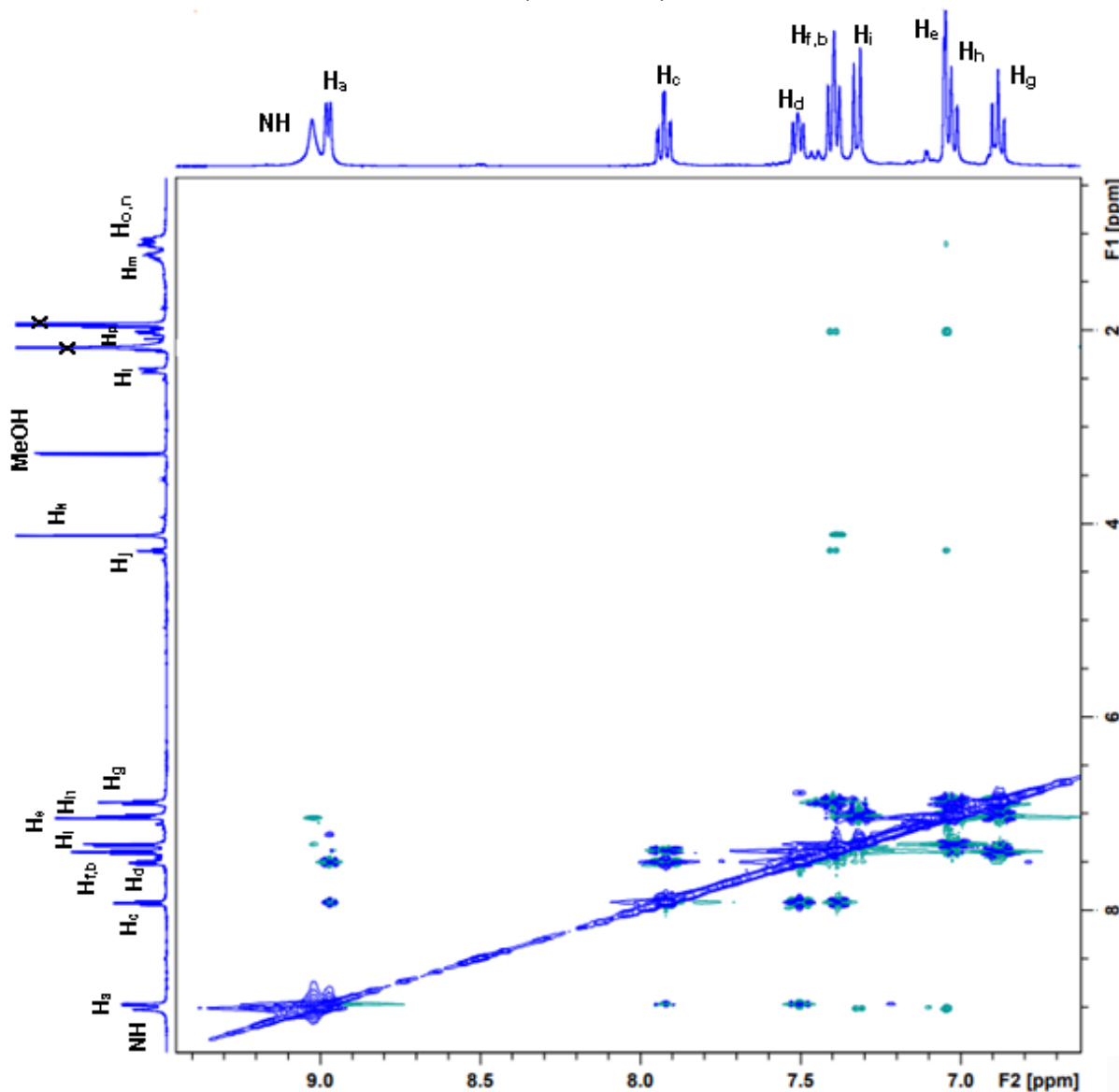
Figura L2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do complexo 1 em CD_3CN correlacionando a região aromática do RMN de ^{13}C (vertical) com o espectro de RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

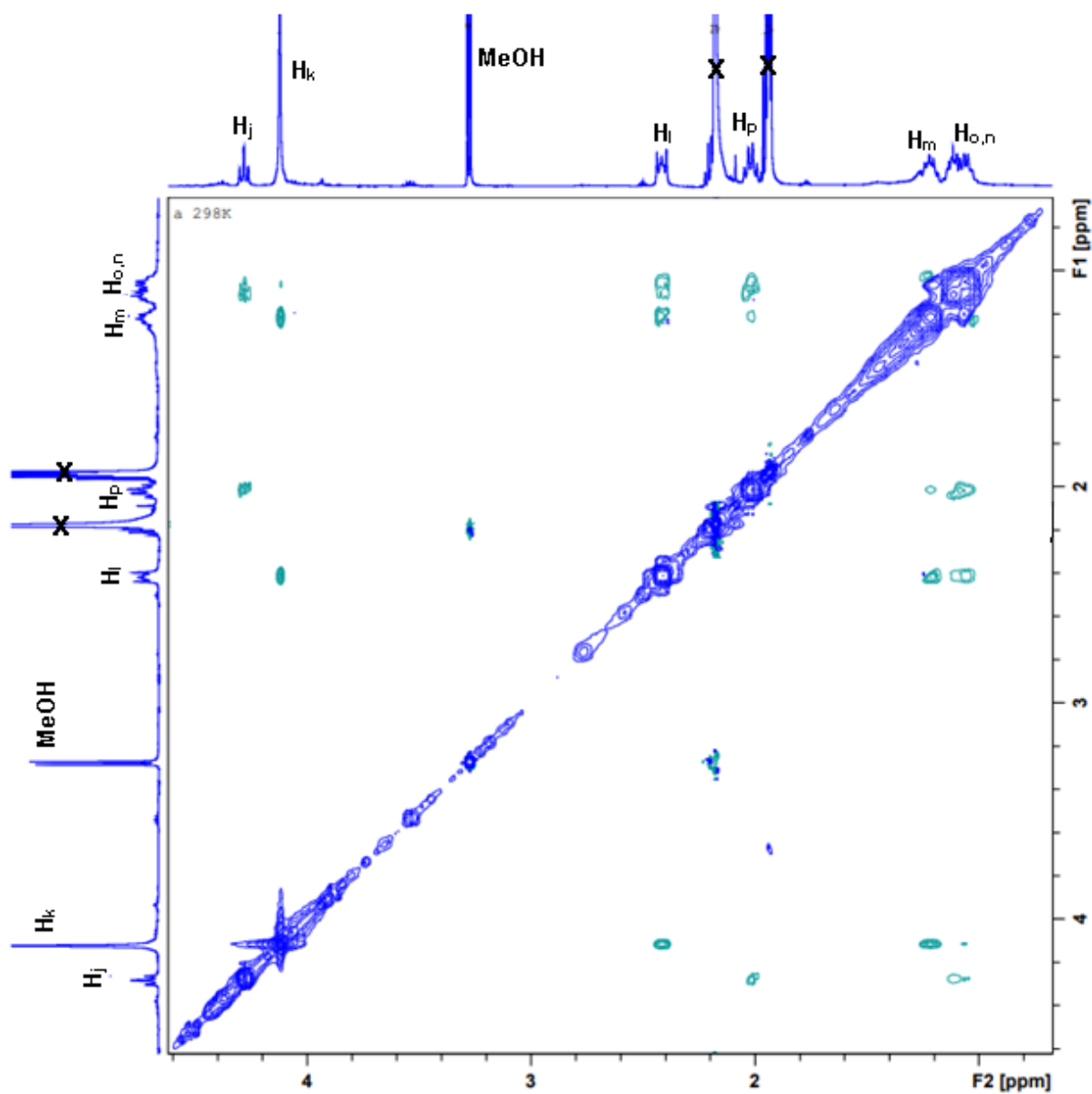
APÊNDICE M – Espectro de ^1H - ^1H NOESY do complexo 1

Figura M1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do complexo 1 em CD_3CN correlacionando o espectro do RMN de ^1H (vertical) com a região aromática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura M2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do complexo 1 em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^1H (vertical) com alifática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

APÊNDICE N – Dados de IV, RMN de ^1H e ^{13}C para perclorato de *bis*{6,6-di(1*H*-indol-3-il)-*N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)hexan-1-amino}zinco(2+) – $[\text{Zn}(\text{L}^{\text{C5}})_2](\text{ClO}_4)_2$ (2)

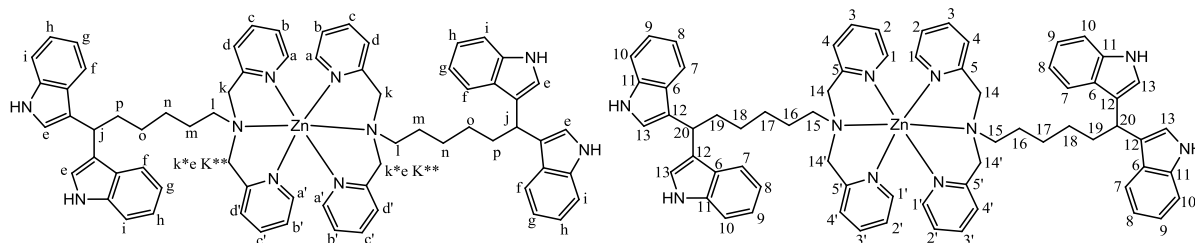
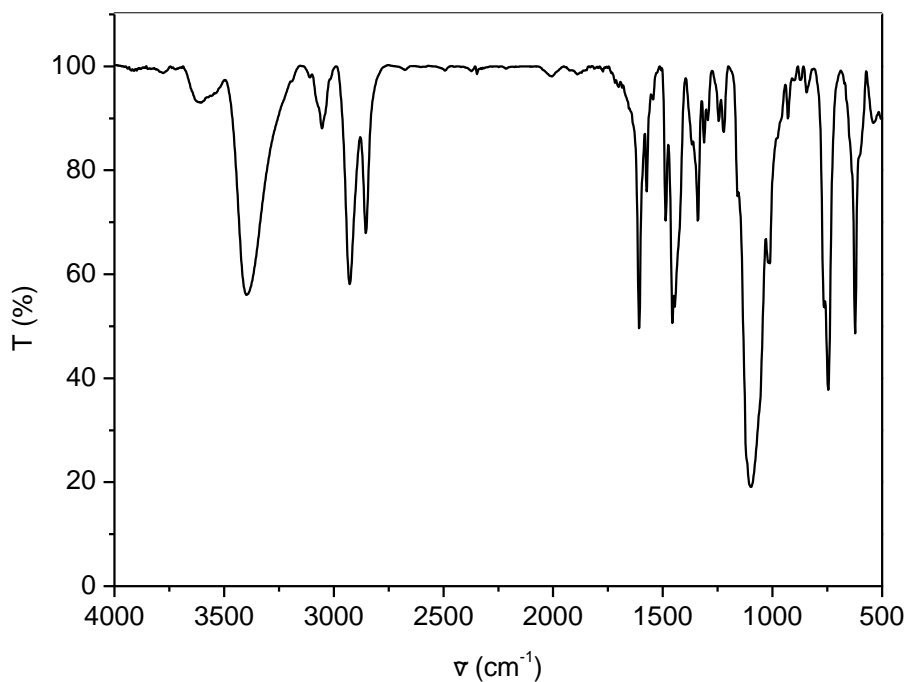
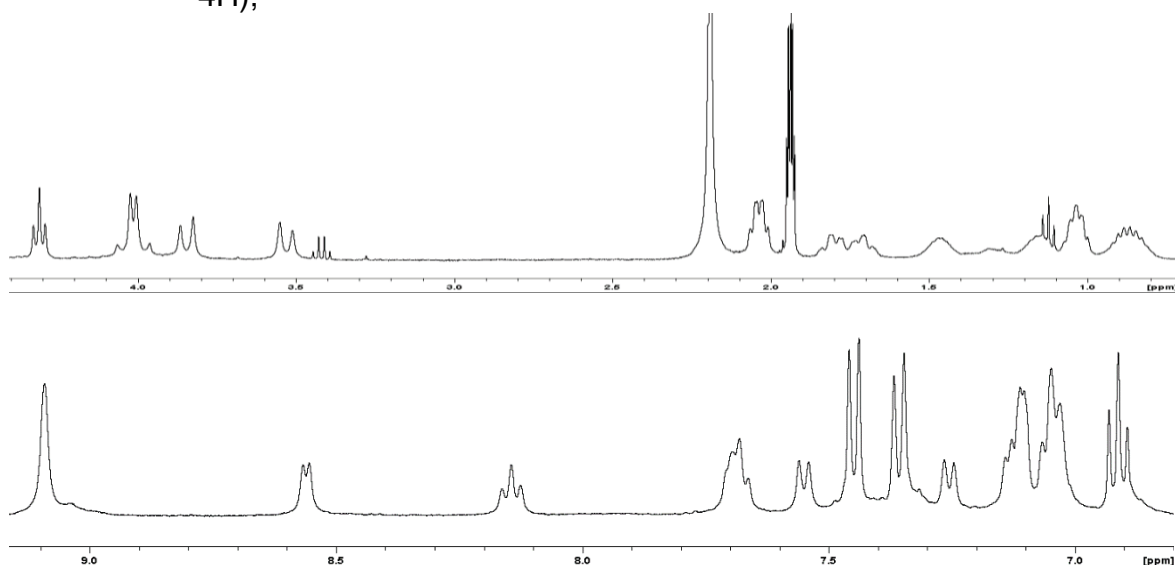


Figura N1 - Espectro de IV para **2** em pastilha de KBr. I.V. ν (cm^{-1} , KBr): 3399, 3054, 2927, 2851, 1609, 1566, 1481, 1452, 1095, 1019, 746, 624.



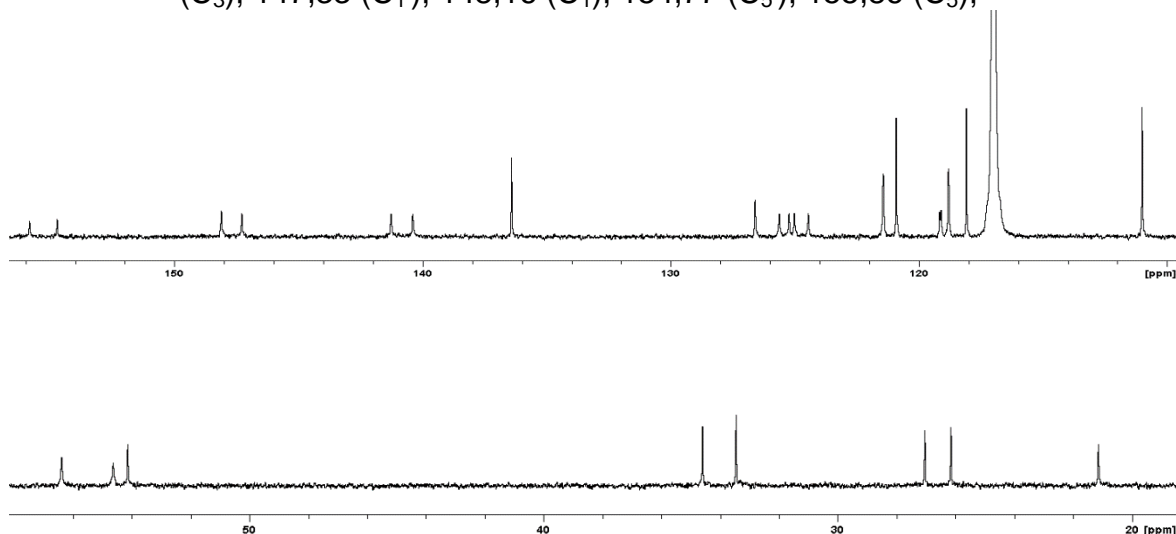
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura N2 - Espectro de RMN de ^1H para 2. **RMN ^1H (400MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm):** 0,97-0,77 (H_n , m, 4H); 1,04 (H_o , quint, $J = 7.38$ Hz, 4H); 1.23-1.10 (H_m^* , m, 2H); 1.56-1.40 (H_m^* , m, 2H); 1,90-1,69 (H_l , m, 4H); 2.04 (H_p , q, $J = 7.50$ Hz, 4H); 3,85 (H_k^* , d, $J = 16,09$ Hz, 2H), 3,53 (H_k^{**} , d, $J = 16,09$ Hz, 2H); 4.09-3.95 (H_k , m, 4H); 4.31 (H_j , t, $J = 7.41$ Hz, 2H); 6.91 (H_g , t, $J = 7.41$, 4H); 7.09-7.00 (H_h , m, 4H); 7.09-7.00 (H_b' , m, 2H); 7.16-7.08 (H_e , m, 4H); 7,16-7.08 (H_a' , m, 2H); 7.25 (H_d' , d, $J = 7.85$ Hz, 2H); 7.36 (H_i , d, $J = 8.03$ Hz, 4H); 7.45 (H_f , d, $J = 7.85$ Hz, 4H); 7.55 (H_d , d, $J = 7.85$ Hz, 2H); 7.74-7.64 (H_c' , m, 2H); 7.74-7.64 (H_b , m, 2H); 8.14 (H_c , t, $J = 7.59$ Hz, 2H); 8.56 (H_a , d, $J = 4.89$ Hz, 2H); 9.09 (s, N-H, 4H);



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

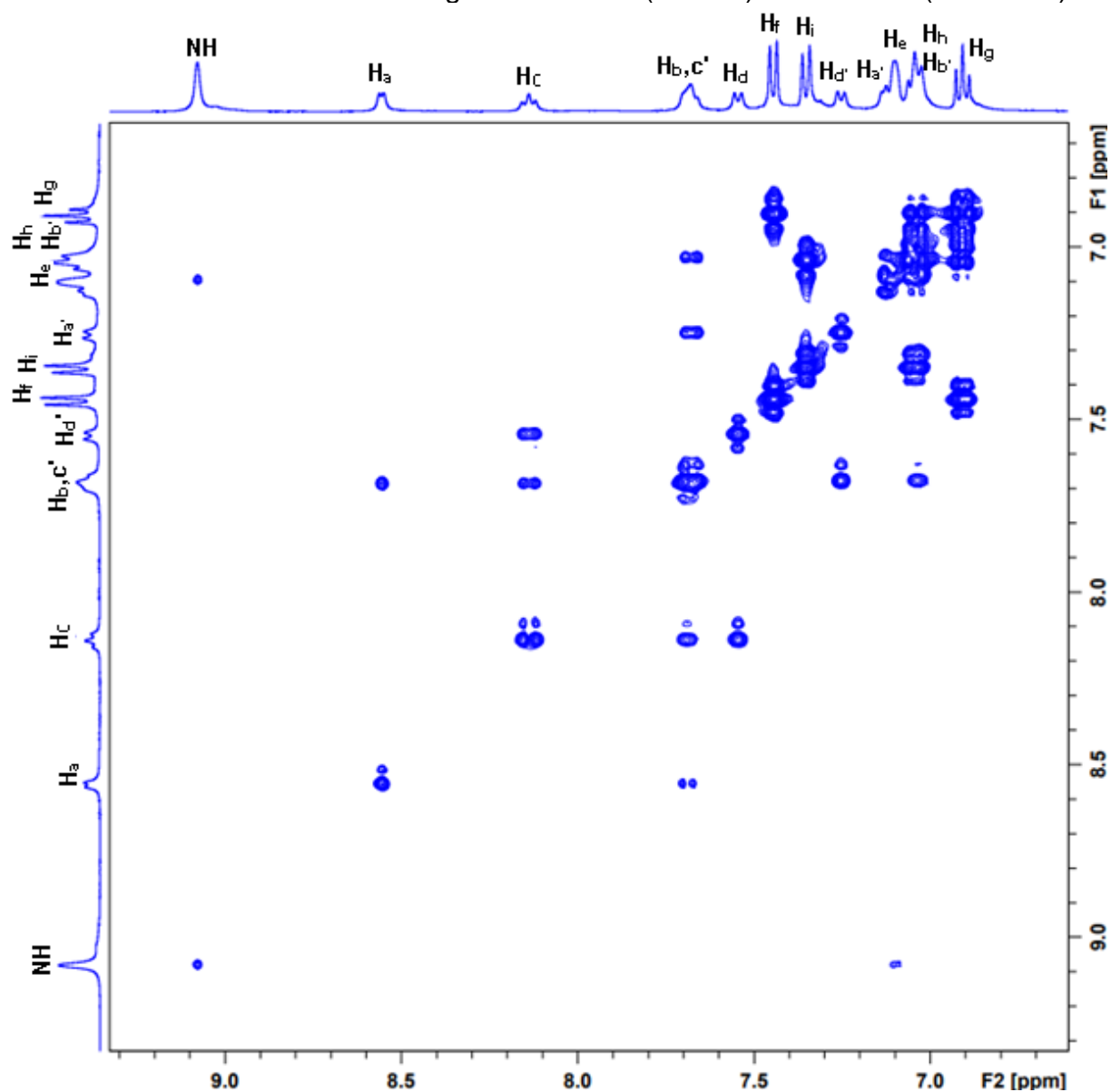
Figura N3 - Espectro de RMN de ^{13}C para 2. **RMN ^{13}C (100 MHz / CDCl_3 / TMS) δ (ppm):** 21,31 (C_{16}); 26,30 (C_{17}); 27,01 (C_{18}); 33,46 (C_{20}); 34,63 (C_{19}); 54,12 (C_{15}); 54,63 (C_{14}'); 56,39 (C_{14}); 111,05 (C_{10}); 118,11 (C_8); 118,84 (C_7); 119,16 (C_{12}); 121,0 (C_9); 121,46 (C_{13}); 124,49 (C_2); 125,04 (C_2); 125,27 (C_{4}'); 125,71 (C_4); 126,63 (C_{11}); 136,48 (C_6); 140,40 (C_3'); 141,32 (C_3); 147,33 (C_1'); 148,16 (C_1); 154,77 (C_5); 155,86 (C_5);



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

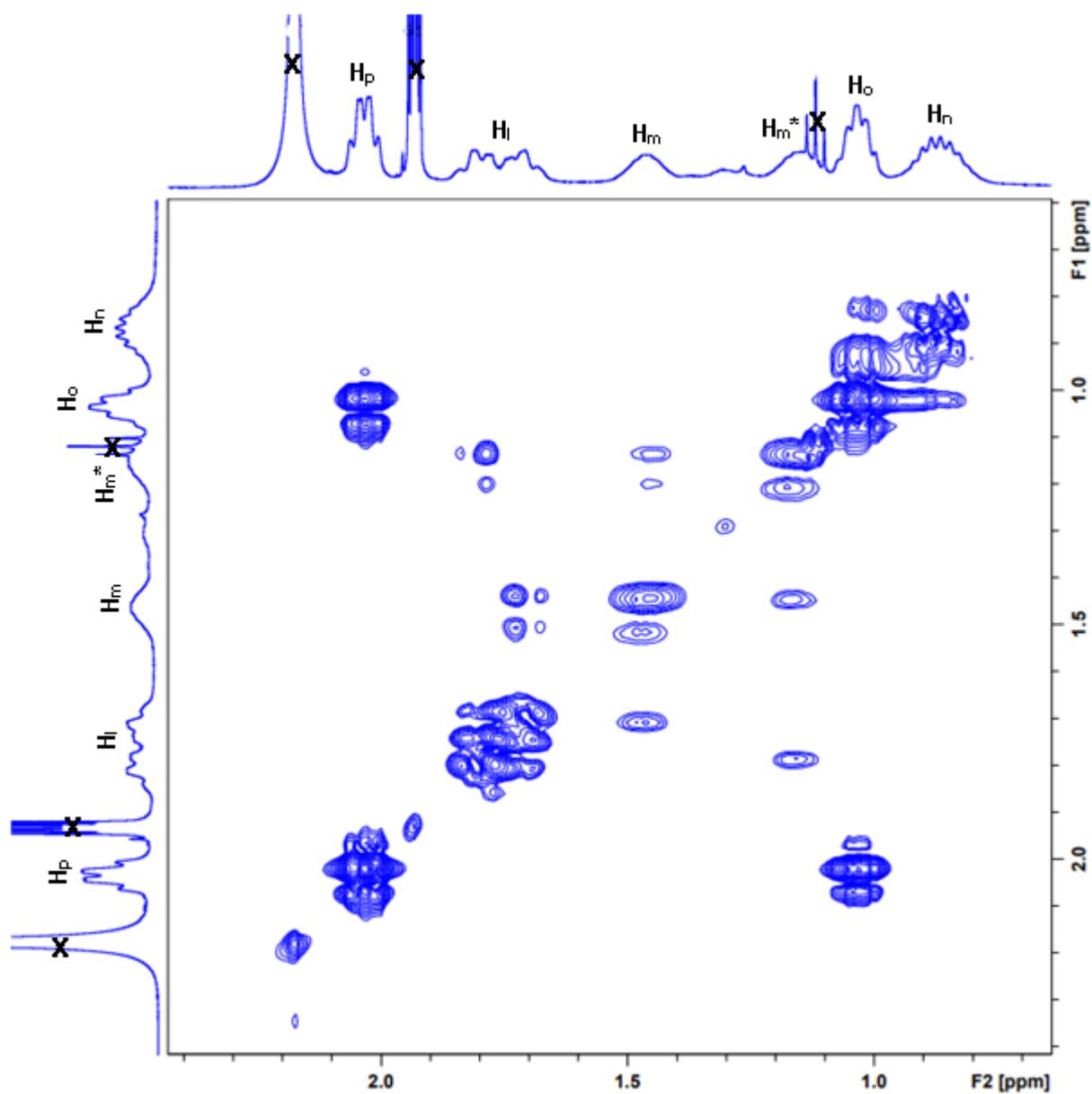
APÊNDICE O – Espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo 2

Figura O1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo 2 em CD_3CN correlacionando a região aromática (vertical) e aromática (horizontal).



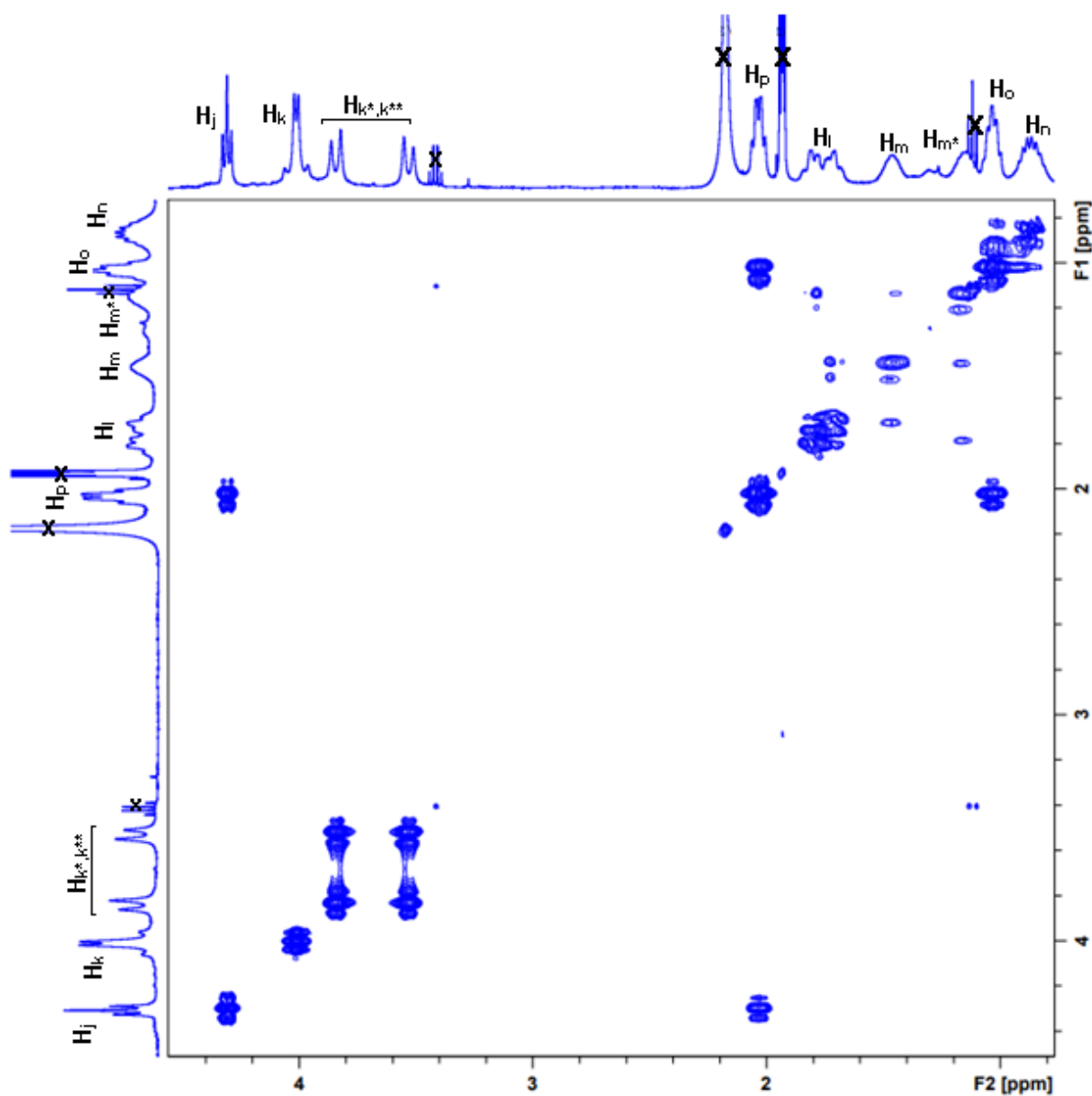
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura O2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo **2** em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^1H (vertical) e alifática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

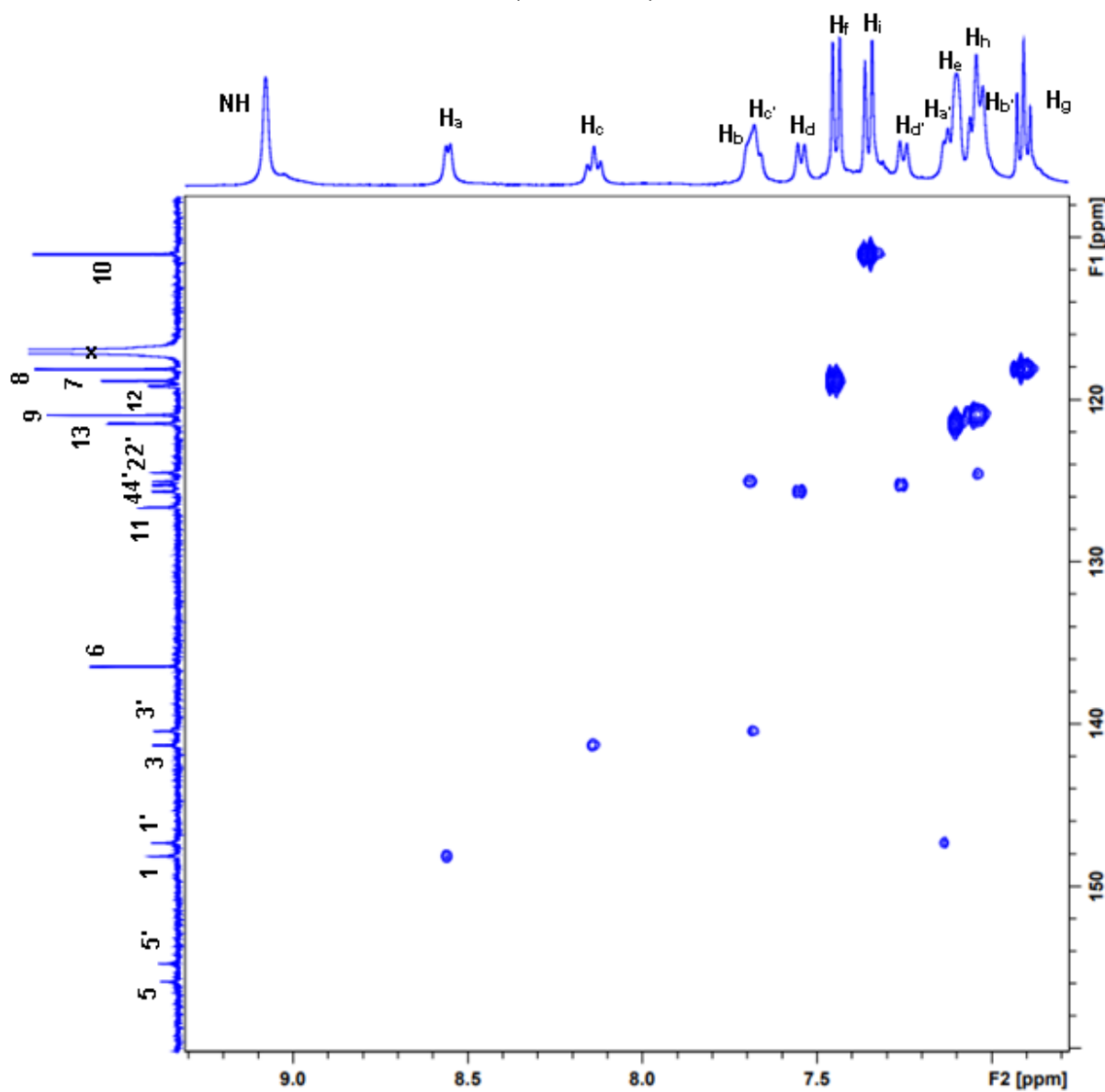
Figura O3 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo **2** em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^1H (vertical) e alifática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

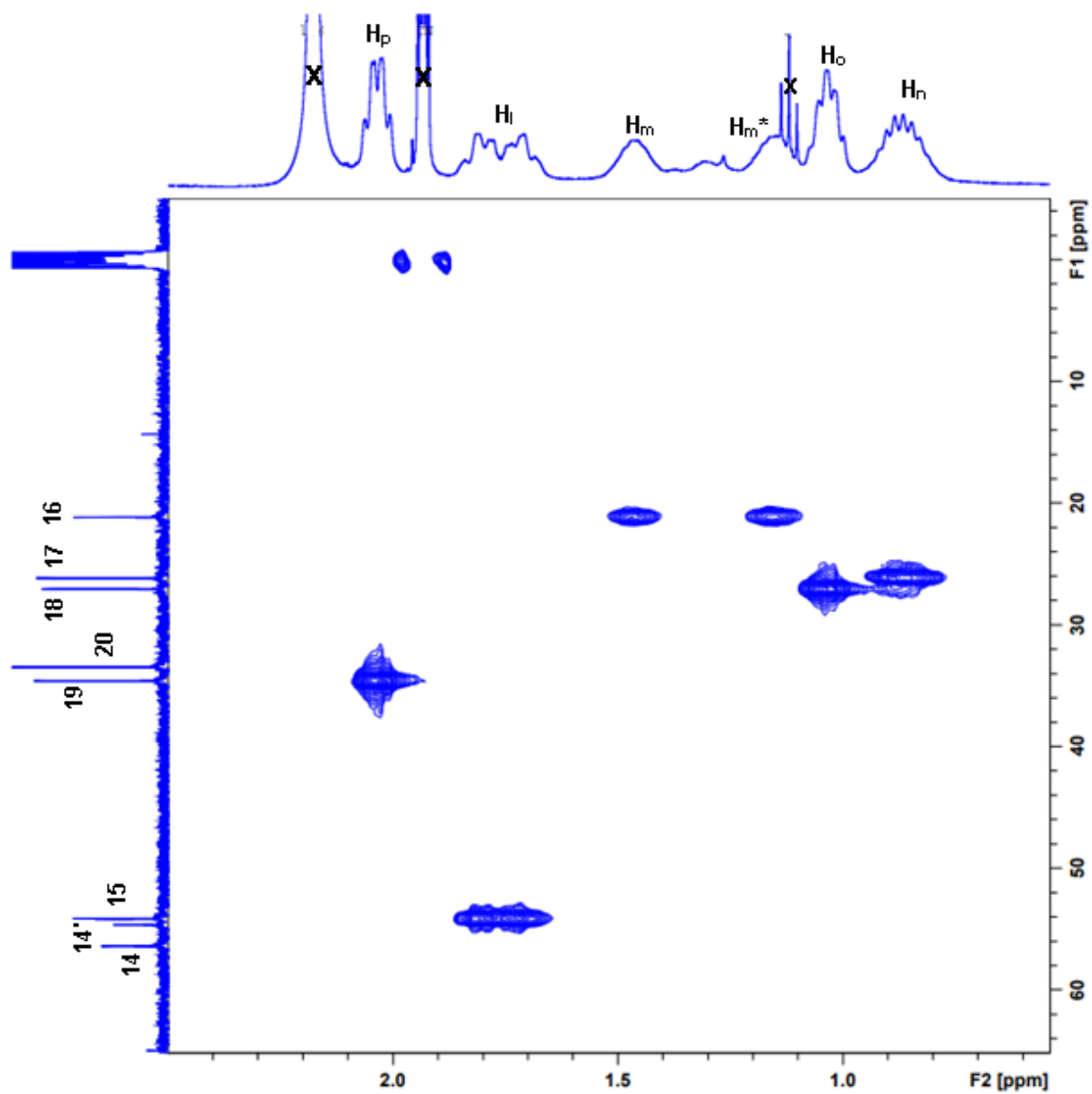
APÊNDICE P – Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do complexo 2

Figura P1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do complexo 2 em CD_3CN correlacionando a região aromática do RMN de ^{13}C (vertical) e aromática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

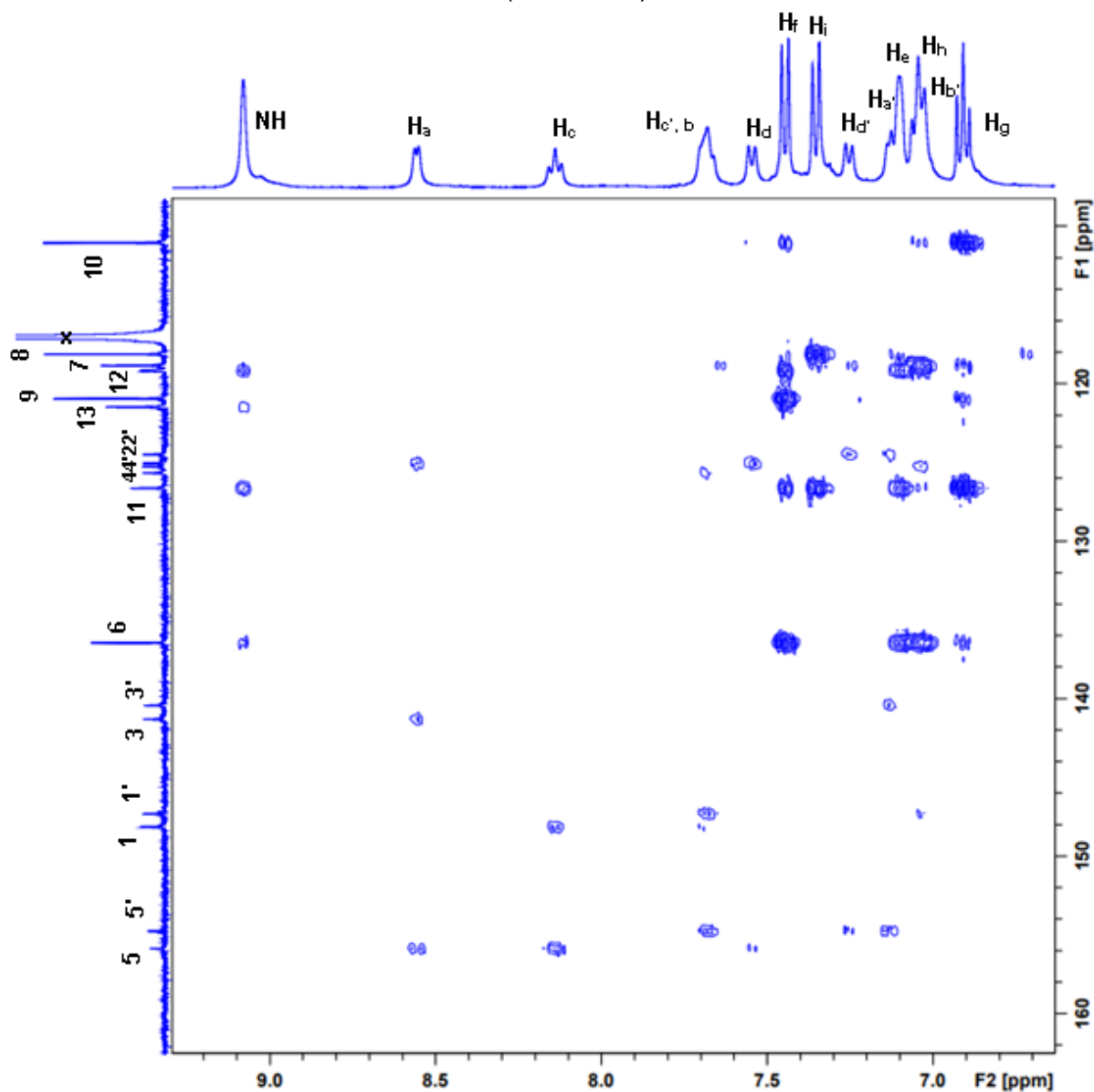
Figura P2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do complexo 2 em CD_3CN correlacionando a região alifática do RMN de ^{13}C (vertical) e alifática do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

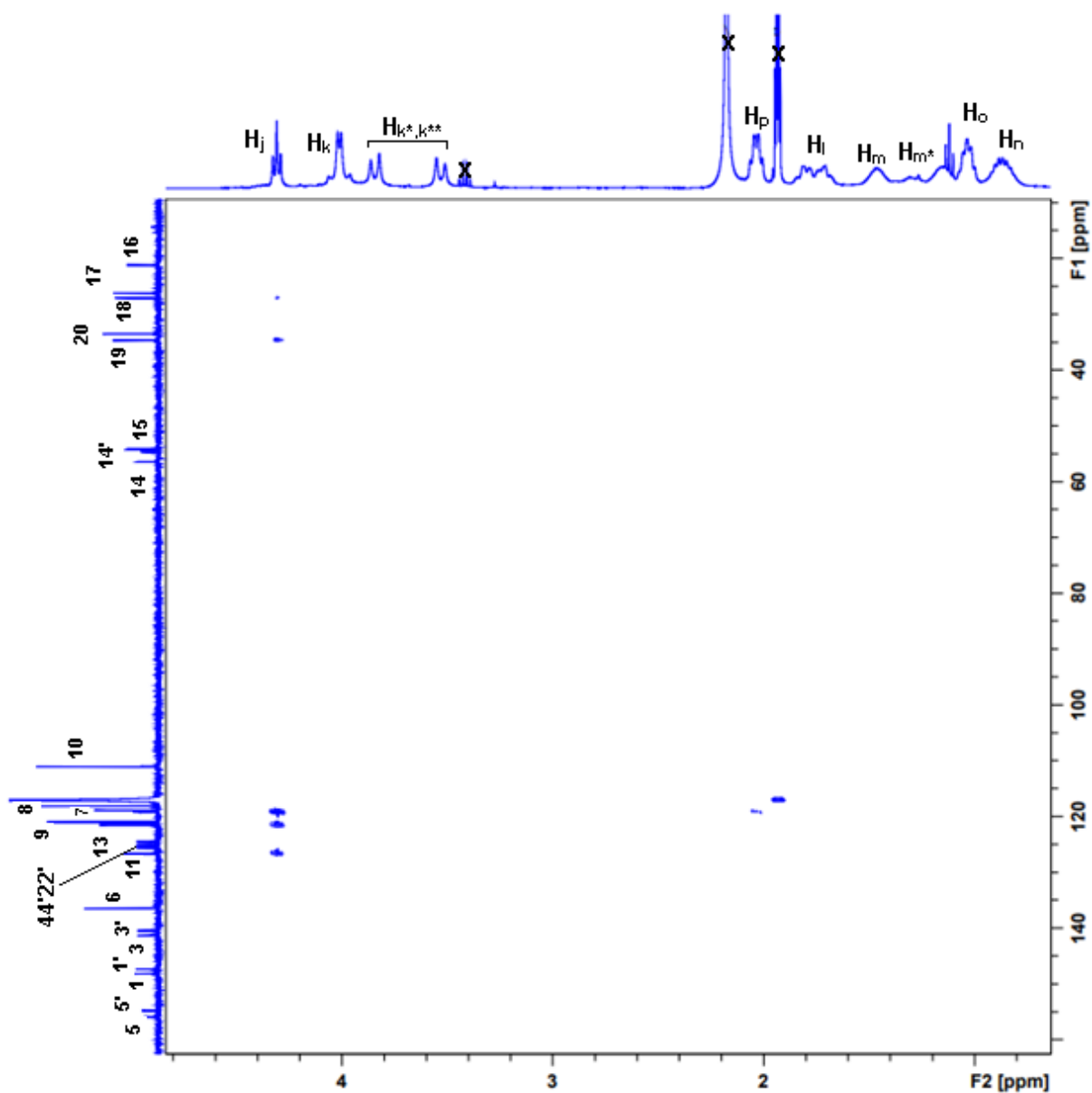
APÊNDICE Q – Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do complexo 2

Figura Q1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do complexo 2 em CD_3CN correlacionando a região aromática do RMN de ^{13}C (vertical) com aromático do RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

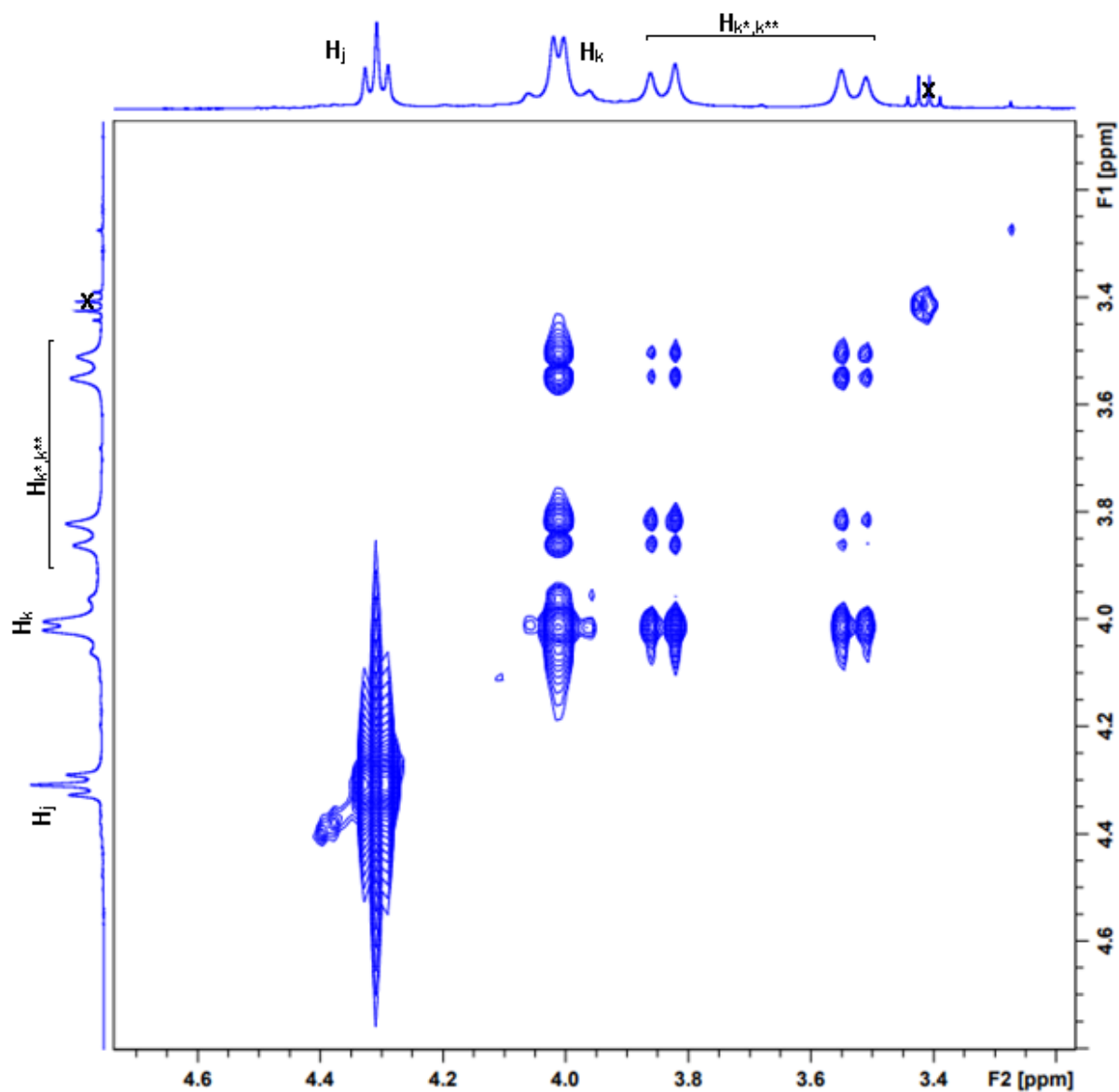
Figura Q2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do complexo 2 em CD_3CN correlacionando o espectro de ^{13}C (vertical) com o espectro de RMN de ^1H (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

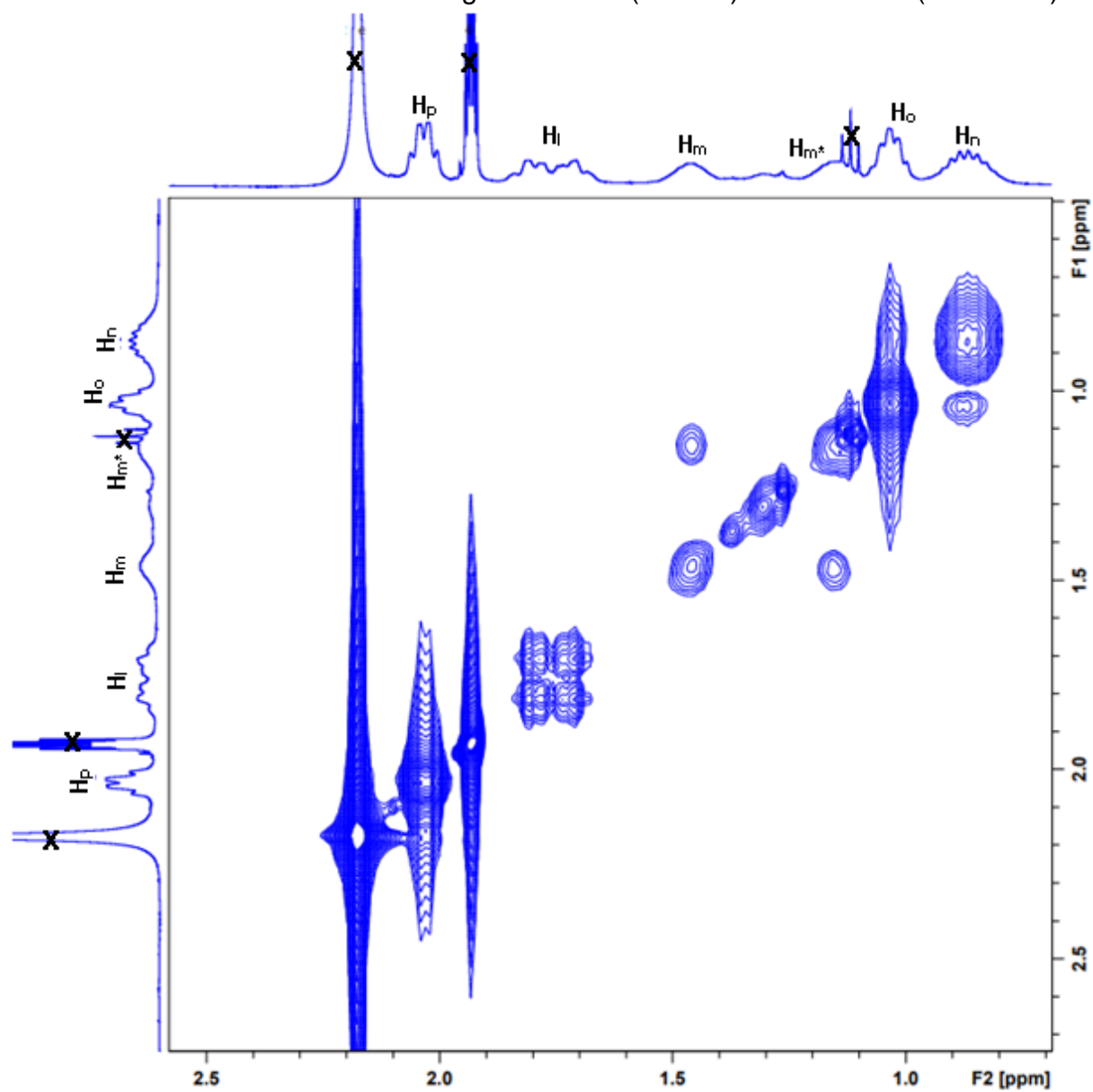
APÊNDICE R – Espectro de ^1H - ^1H NOESY do complexo **2**

Figura R1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do complexo **2** em CD_3CN correlacionando o a região média (vertical) com a região média (horizontal) do espectro.



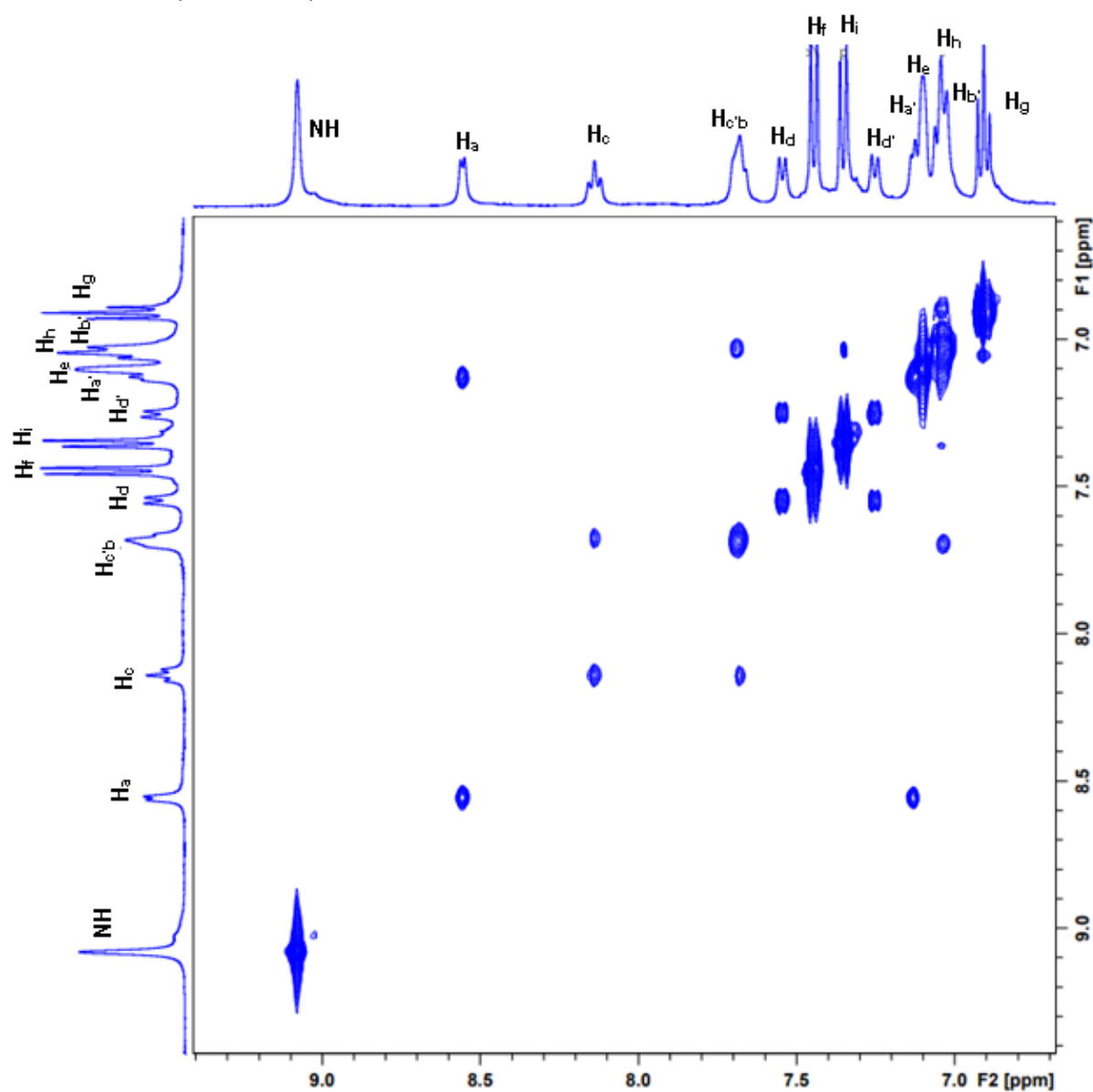
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura R2 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do complexo 2 em CD_3CN correlacionando o a região alifática (vertical) com alifática (horizontal).



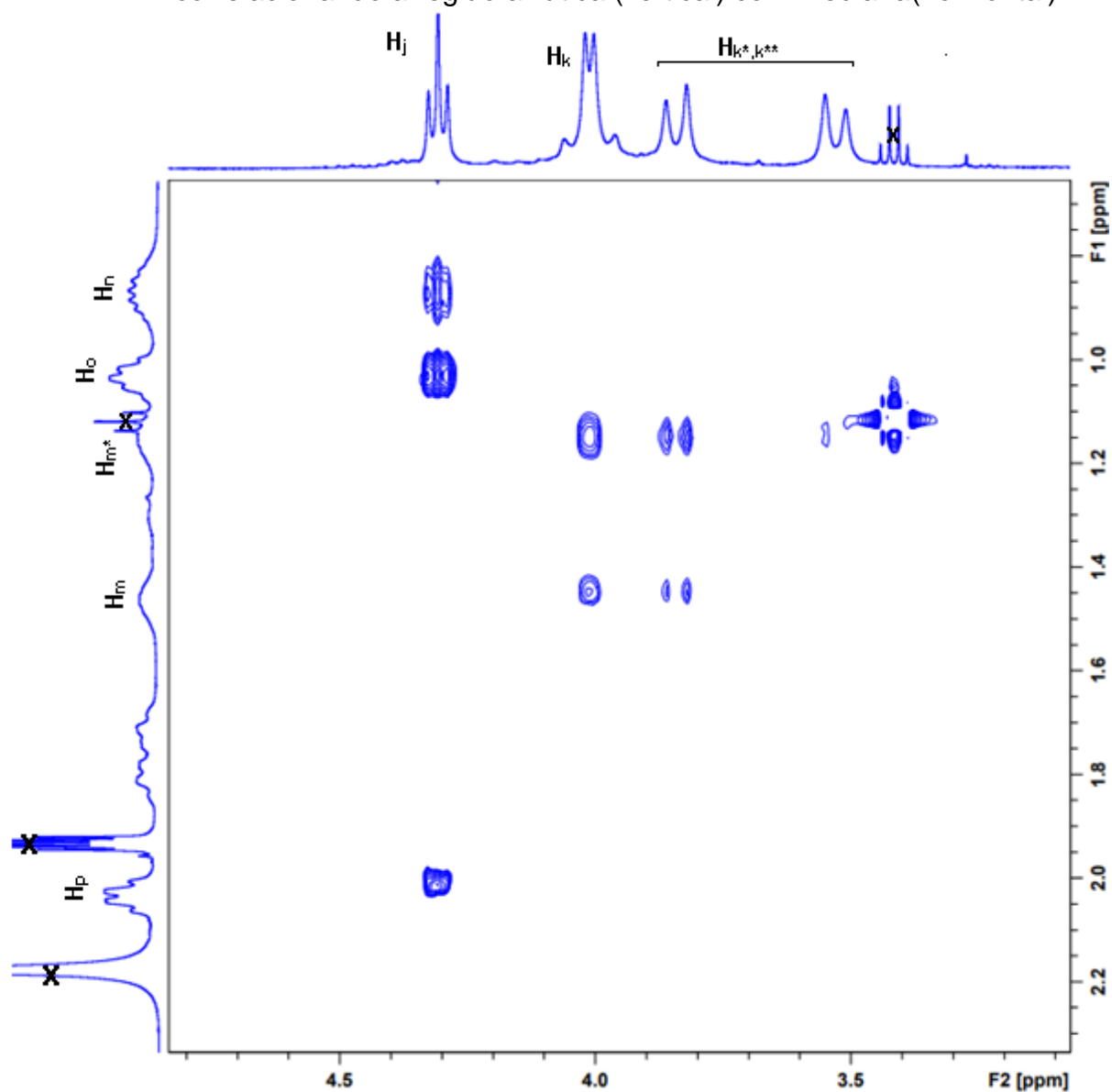
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura R3 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do complexo 2 em CD_3CN correlacionando a região aromática (vertical) com aromática (horizontal).



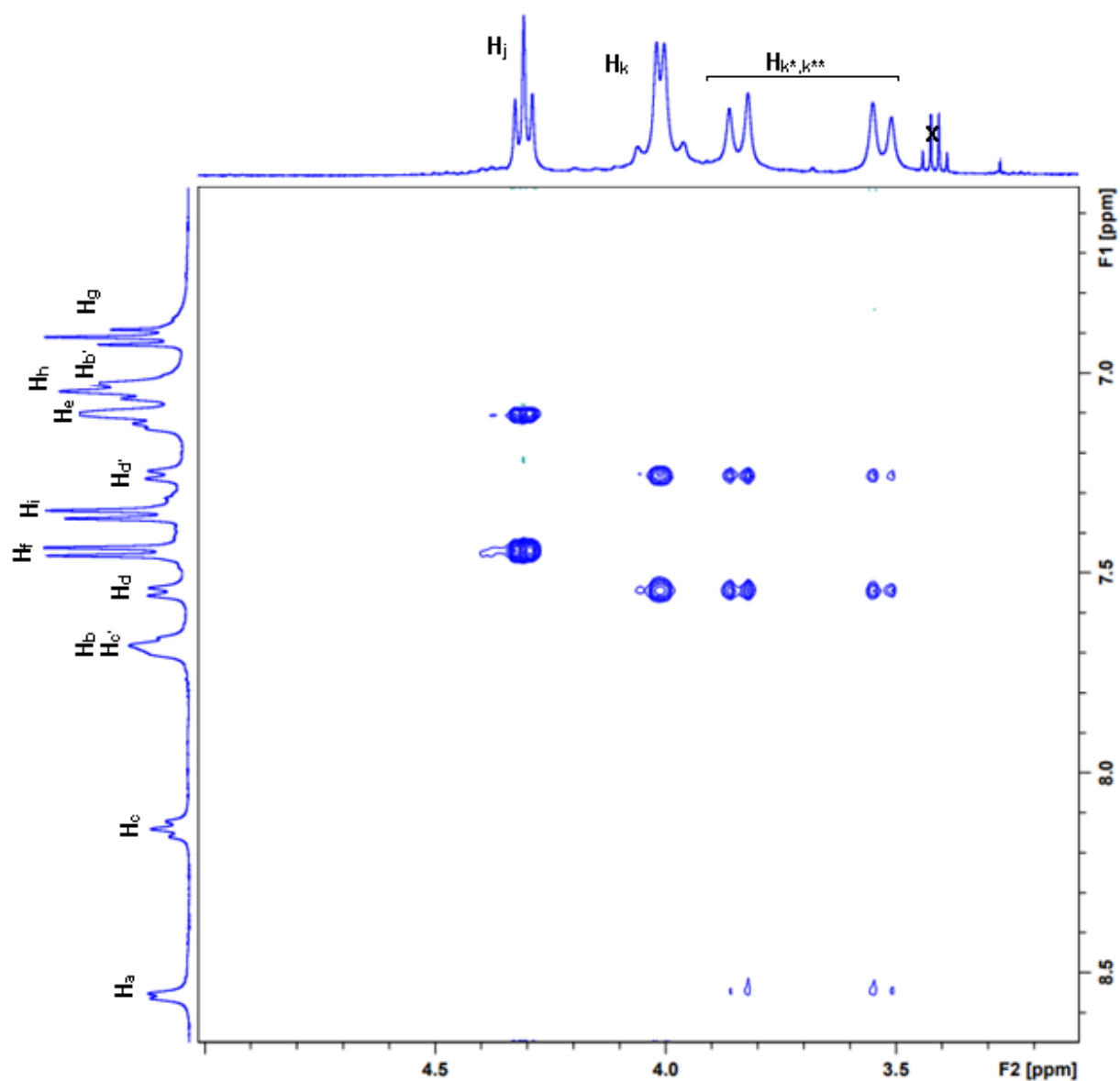
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura R4 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do complexo 2 em CD_3CN correlacionando a região alifática (vertical) com mediana(horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

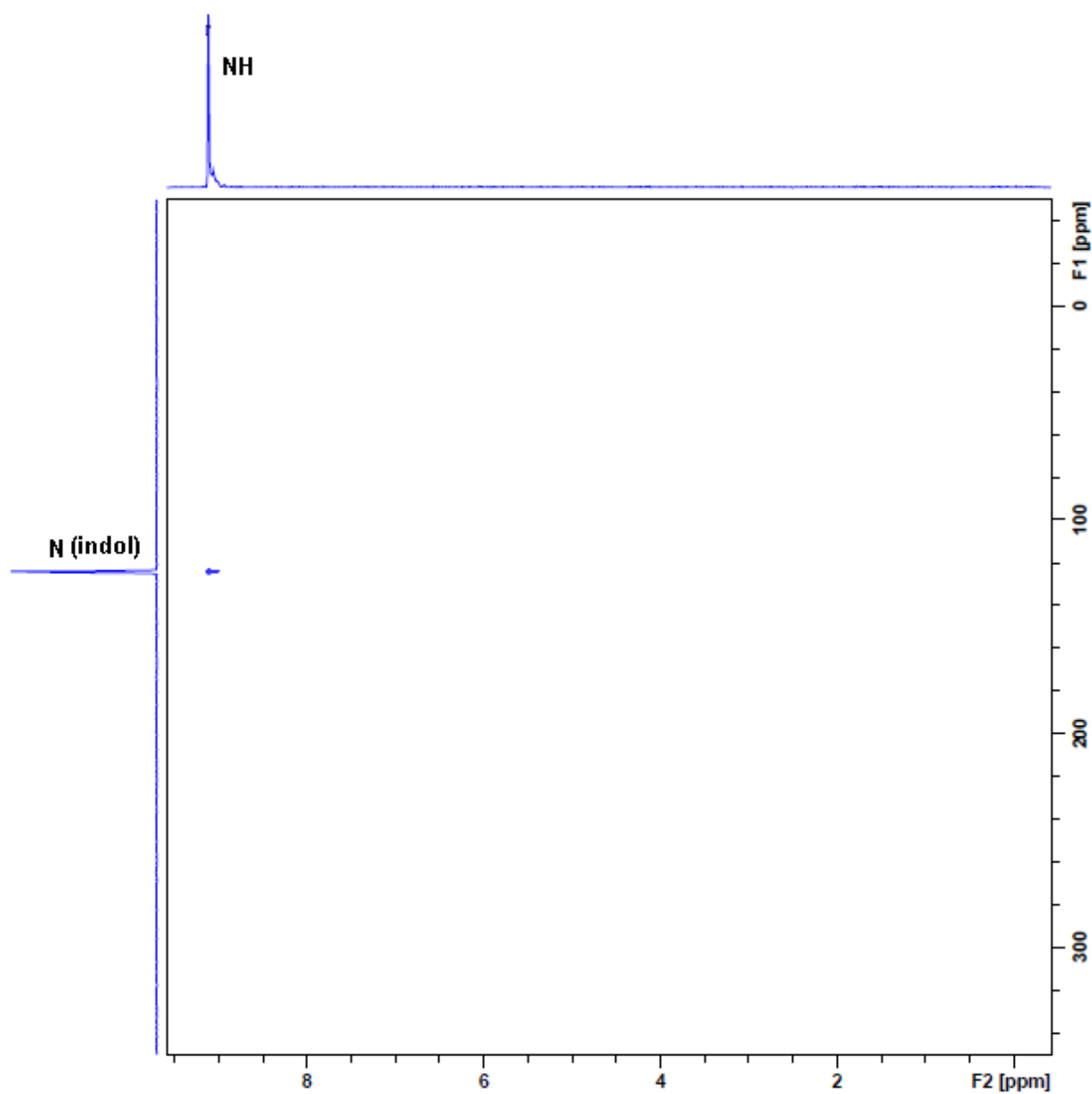
Figura R5 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do complexo 2 em CD_3CN correlacionando a região aromática (vertical) com aromática mediana (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

APÊNDICE S – Espectro de ^1H - ^{15}N HSQC

Figura S1 - Ampliação do espectro de ^1H - ^1H NOESY do complexo 2 em CD_3CN correlacionando a região aromática (vertical) com aromática mediana (horizontal).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.