

9 EXPERIMENTAL

9.1. Materiais e métodos

9.1.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados foram de grau de pureza analítico e usados sem purificação. Abaixo são citados estes reagentes e suas fontes comerciais.

- Ácido Aspártico (DL-aspartic acid) - Sigma, 99%.
 - Cisteína (L-cysteine) - Sigma, 99%
 - Metionina (L-methionine) - Reagen, 98%.
 - Ácido Glutâmico (L-glutamic acid) - Vetec, 98%.
 - Glicina (aminoacetic acid) - Sigma, 99%.
 - Homocisteína (DL-homocysteine) - Sigma, 95%.
 - Serina (L-Serine) - Sigma, 98%.
 - Arginina (L- arginine) - Sigma, 98%.
 - L-carnitina (L-carnitine inner salt) - Sigma, 98%.
 - Acetil-L-carnitina (Acetyl-L-carnitine hydrochloride) - Sigma, 99%.
 - $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (copper(II) dichloride dihydrate) – Merck, p.a.
 - $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (copper(II) perchlorate hexahydrate) – Sigma
 - Etanol – Vetec(*), 95%,.
 - Éter Etílico - PA, Vetec (*)
 - Acetona - Vetec. (*)
 - Ácido Clorídrico 37%, PA, Isofar. (*)
 - Hidróxido de Potássio em pastilhas (potassium hydroxyde) - Merck, 99%.
 - Cloreto de Cálcio (para dessecador) - Quimibrás Industrias Químicas.
 - Solução tampão pH 4,00 e pH 7,00, Merck.
- (*) – Reagentes segundo especificações ACS
- Água destilada e deionizada.

9.1.2. Equipamentos

Abaixo estão relacionados os equipamentos utilizados nos estudos descritos neste trabalho.

- Balança analítica - Mettler A E 200.
- Placa de aquecimento/agitação – Corning, 752A
- Rotavapor BUCHI, R-210.
- Estufa - W.C. Heraeus Hanau, RT 360.
- Ponto de fusão: Aparelho digital de ponto de fusão - MQAPF-302.
- pHmetro Metrohm Herisau, calibrado com solução tampão pH=7,00 (Merck), para o ajuste do aparelho e com solução tampão pH=4,00 (Merck) para ajuste de declividade do eletrodo.
- Elemental Analyzer CHNS/O Sinc EA 1110, CE Instruments.
- Atomic Absorption Spectrometry Varian AA5.
- Thermogravimetric Analyzers - TGA 7 Perkin-Elmer.
- Espectrômetro FT-IR Spectrum 2000 Perkin Elmer.
- Espectrômetro FT-IR Spectrum 100 Perkin Elmer.
- Espectrofotômetro UV-Visível Perkin-Elmer Lambda 35.
- Espectrômetro Bruker ESP300E, com frequência modulada de 100 kHz operando a 9,5 GHz.
- Orion 3 Star, Conductivity Benchtop – Thermo Electron Corpor.

Analizador eletroquímico Bioanalytical Systems Inc. (BAS), modelo 100BW. Eletrodos de platina (Pt) como eletrodos de trabalho e auxiliar, e eletrodo de referência Ag/AgCl.

9.2. Síntese dos complexos 1-16

De acordo com que foram sendo sintetizados, os complexos estudados foram agrupados para preparação de artigos científicos. Foram separados em quatro grupos de quatro complexos cada, como mostra a Tabela 1. As sínteses serão descritas e discutidas segundo esta separação.

Tabela 1 Complexos sintetizados 1-16

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
[Cu(Asp)(Cis)]·H ₂ O (1)	[Cu(hCis) ₂]·H ₂ O (5)	[Cu(Asp)(Ser)]·H ₂ O (9)	[Cu(Lcar)(Cl)(H ₂ O)] (13)
[Cu(Asp)(Met)] (2)	[Cu(Asp)(hCis)]·H ₂ O (6)	[Cu(Asp)(Gli)]·H ₂ O (10)	[Cu(Lcar) ₂](ClO ₄) ₂ ·3H ₂ O (14)
[Cu(Glu)(Cis)] (3)	[Cu(Glu)(hCis)]·H ₂ O (7)	[Cu(Asp)(Glu)]·H ₂ O (11)	[Cu(a-Lcar)(H ₂ O) ₃](ClO ₄) ₂ ·H ₂ O (15)
[Cu(Glu)(Met)]·H ₂ O (4)	[Cu(Met)(hCis)] (8)	[Cu(Asp)(Arg)] (12)	[Cu(a-Lcar) ₂ (Cl) ₂]·H ₂ O (16)

9.2.1. Complexos do Grupo 1: [Cu(Asp)(Cis)]·H₂O (1); [Cu(Asp)(Met)] (2); [Cu(Glu)(Cis)] (3) e [Cu(Glu)(Met)]·H₂O (4)

9.2.1.1. Síntese do complexo [Cu(Asp)(Cis)]·H₂O (1)

Em um bécher com aproximadamente 100 mL de água deionizada e destilada, foram dissolvidos 3 mmol de ácido aspártico (0,399 g) sob agitação a 25 °C. Paralelamente, em outro bécher com o mesmo volume de água e mesma temperatura, foram solubilizados 3 mmol de cisteína a (0,363 g) com algumas gotas de HCl 10⁻³ M para total solubilização da cisteína, até pH no mínimo entre 3,8-4,0. Após dissolução completa, as duas soluções foram armazenadas à temperatura ambiente por 24 horas, para a certeza de total solubilização, e só então foram misturadas. Foram então concentradas até metade do volume inicial sob agitação a 40 °C e, após a solução esfriar totalmente sem haver nenhuma precipitação de ligante e verificar que o pH não se encontrava abaixo de 2,0, foram adicionados 3 mmol de CuCl₂·2 H₂O (0,511g) em 50 mL de água lentamente durante 3 horas sob agitação à temperatura ambiente. Manteve-se a agitação, ainda sem aquecimento, por mais duas horas e, em seguida, gotas de uma solução de KOH 1M foram adicionadas lentamente até pH 7,0^{9.0-9.2}. A solução resultante foi mantida sob agitação por 8 horas a 60 °C e mais 48 horas a 25 °C e, em

seguida, concentrada até metade de seu volume e então resfriada em banho de gelo. O precipitado verde formado foi filtrado e lavado com etanol, acetona e éter e levado à estufa para secar a 50 °C. O rendimento foi de aproximadamente 63%.

9.2.1.2.

Síntese dos complexos [Cu(Asp)(Met)] (2), [Cu(Glu)(Cis)] (3) e [Cu(Glu)(Met)]·H₂O (4)

O complexo **3** foi sintetizado de maneira análoga ao complexo **1**, mantendo-se as mesmas proporções metal/ligante.

Para os complexos **2** e **4** o sal do metal foi adicionado sob a forma de pó, bem lentamente à solução contendo os ligantes. O restante do procedimento foi semelhante ao utilizado para as sínteses de **1** e **3**.

A metionina foi solubilizada a 40⁰C e o ácido glutâmico a 25⁰C, ambos sem necessidade de acidificação.

As soluções foram basificadas^{9,0-9,2} lentamente, para os complexos **2** e **4** até pH 8,0 e para o complexo **3** até pH 6,0.

Todos foram obtidos na forma de pó sendo os complexos **2** e **4** azuis e o complexo **3** verde. Os rendimentos dos complexos **2**, **3** e **4** foram de aproximadamente 48%, 51% e 59%, respectivamente.

9.2.2.

Complexos do grupo 2: [Cu(hCis)₂]·H₂O (5); [Cu(Asp)(hCis)]·H₂O (6); [Cu(Glu)(hCis)]·H₂O (7) e [Cu(Met)(hCis)] (8)

9.2.2.1.

Síntese do complexo [Cu(hCis)₂]·H₂O (5)

Foram solubilizados 6 mmol de homocisteína (0,810g) em 80 mL de água deionizada e destilada à temperatura ambiente durante 1 hora. Foram adicionadas algumas gotas de HCl 10⁻³ M para total solubilização do aminoácido, até pH no mínimo entre 3,8-4,0. Após 24 horas em repouso à temperatura ambiente, foi feita a verificação de que o pH não se encontrava abaixo de 2,0 e foi adicionada lentamente, durante 2 horas, uma solução de CuCl₂·2 H₂O (3 mmol, 0,511 g) em 40 mL de água. Manteve-se a agitação por 4 horas à temperatura ambiente e, em seguida, gotas de uma solução de KOH 1M foram adicionadas lentamente até pH 6,0^{9,0-9,2}, sem aquecimento. A solução

resultante foi mantida sob agitação por 6 horas a 50 °C. Um pouco de precipitado acinzentado foi formado, ele foi filtrado e descartado. A solução translúcida verde-azulada obtida após a filtração foi armazenada durante 24 horas e, em seguida, o solvente foi evaporado em rota evaporador e o precipitado verde formado foi lavado com etanol e acetona gelados e levado à estufa para secar a 50 °C. O rendimento foi de aproximadamente 49%.

9.2.2.2.

Sínteses dos complexos [Cu(Asp)(hCis)]·H₂O (6), [Cu(Glu)(hCis)]·H₂O (7) e [Cu(Met)(hCis)] (8)

Para a obtenção dos complexos ternários **6**, **7** e **8** o procedimento inicial de síntese foi semelhante ao realizado para a complexação dos ternários **1-4**, mantendo-se as mesmas proporções. A adição do sal do metal e o restante do procedimento de síntese foi semelhantemente a síntese do binário complexo **5**.

As soluções foram basificadas^{9,0-9,2} lentamente, para o complexo **6** até pH 6,5 e para os complexos **7** e **8** até pH 6,0. Todos foram obtidos na forma de pó verde. Os rendimentos dos complexos **6**, **7** e **8** foram de aproximadamente 45%, 41% e 43%, respectivamente.

9.2.3.

Complexos do grupo 3: [Cu(Asp)(Ser)]·H₂O (9); [Cu(Asp)(Gli)]·H₂O (10); [Cu(Asp)(Glu)]·H₂O (11) e [Cu(Asp)(Arg)] (12)

9.2.3.1.

Síntese do complexo [Cu(Asp)(Ser)]·H₂O (9)

OBSERVAÇÃO: A vidraria utilizada para a síntese com serina foi previamente tratada com solução de iodo 5 % em etanol, e aquecida a 150 °C antes do uso para se evitar a formação de fungos, comuns em reações com este aminoácido^{9,3}.

Em um bécher com aproximadamente 50 mL de água deionizada e destilada, foram dissolvidos 3 mmol de ácido aspártico (0,399 g) sob agitação a 25 °C. Paralelamente, em outro bécher com o mesmo volume de água, foram solubilizados 3 mmol de serina (0,315 g), sob agitação, a 60 °C e em seguida uma solução de ácido nítrico a 10 % v/v foi adicionada até $\text{pH}_3\text{O}^+ < 1^{9,3}$. Após 24 horas em repouso, a solução de serina foi adicionada lentamente (durante 1 hora, sob agitação, a 70 °C) a um bécher contendo 40 mL de $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (3 mmol, 0,511g), formando uma solução azul

clara. Em seguida, o ácido aspártico solubilizado foi adicionado lentamente à solução anterior que adquiriu uma coloração azul escuro. Posteriormente, gotas de uma solução de KOH 1M foram adicionadas até pH 7,0. A solução foi mantida sob agitação a 50 °C por 6 horas. Posteriormente, a solução foi concentrada lentamente à metade do volume em banho de glicerina a 60 °C. Um precipitado azul obtido foi lavado com uma solução de éter etílico gelado contendo ácido nítrico (5 mL de ácido nítrico 10 % v/v para cada 100 mL de éter etílico)^{9,3} e seco em estufa a 50 °C. Como a água mãe ainda apresentava forte coloração azul, foram a ela acrescentados 5 mL de solução metanol/éter 1:1, obtendo-se mais precipitado com as mesmas características do anterior. O rendimento foi de aproximadamente 52 %.

9.2.3.2.

Síntese dos complexos [Cu(Asp)(Gli)]·H₂O (10); [Cu(Asp)(Glu)]·H₂O (11) e [Cu(Asp)(Arg)] (12)

Para a obtenção dos complexos ternários **10**, **11** e **12** o procedimento foi semelhante à síntese do complexo **9**, mantendo-se as mesmas proporções. Glicina e ácido glutâmico foram solubilizados a 25⁰C e arginina a 45⁰C. A vidaria trarada para a síntese de **9** também foi utilizada para estes três complexos. As soluções dos três complexos foram basificadas lentamente, até pH 7,0. Todos foram obtidos na forma de pó azul. Os rendimentos dos complexos **10**, **11** e **12** foram de aproximadamente 73%, 78% e 73%, respectivamente.

9.2.4.

Complexos do grupo 4: [Cu(Lcar)(Cl)(H₂O)] (13), [Cu(Lcar)₂(ClO₄)₂·3H₂O (14), [Cu(a-Lcar)₂(Cl)₂]·H₂O (15) e [Cu(a-Lcar)(H₂O)₃](ClO₄)₂·H₂O (16)

9.2.4.1.

Síntese do complexo [Cu(Lcar)(Cl)(H₂O)] (13)

Em um bécher com aproximadamente 80 mL de água deionizada e destilada, foram dissolvidos 2 mmol de L-carnitina (0,322 g) a 25 °C com adição de algumas gotas de HCl 10⁻³ M, para facilitar a solubilização. Posteriormente, foram adicionados lentamente CuCl₂·2 H₂O (2 mmol, 0,341g) em 20 mL de água, lentamente, durante 1 hora. Manteve-se a agitação por 4 horas à temperatura ambiente e gotas de KOH 1 M foram adicionadas lentamente até pH 6,5, sem aquecimento. A solução resultante foi mantida sob agitação por 8 horas a 50 °C. O precipitado verde-azulado formado foi

lavado com metanol e éter gelados e levado à estufa para secar a 50 °C. Posteriormente, foi armazenado em dessecador contendo cloreto de cálcio, por ser um pouco higroscópico. O rendimento foi de aproximadamente 41 %.

9.2.4.2.

Síntese do complexo $[\text{Cu}(\text{Lcar})_2(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**14**)

Em um bécher com aproximadamente 80 mL de água deionizada e destilada, foram dissolvidos 4 mmol de L-carnitina (0,644 g) a 25 °C com adição de algumas gotas de HCl 10^{-3} M, para facilitar a solubilização. Posteriormente, foram adicionados $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (2 mmol, 0,525g) em 20 mL de água, lentamente, durante 1 hora. Manteve-se a agitação por 4 horas à temperatura ambiente e gotas de KOH 1 M foram adicionadas lentamente até pH 7,0, sem aquecimento. A solução resultante foi mantida sob agitação por 8 horas a 50 °C. O precipitado verde-azulado formado foi lavado com metanol e éter gelados e levado à estufa para secar a 50 °C. Posteriormente, foi guardado em dessecador contendo cloreto de cálcio, por ser um pouco higroscópico. O rendimento foi de aproximadamente 45 %.

9.2.4.3.

Síntese dos complexos $[\text{Cu}(\text{a-Lcar})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**15**) e $[\text{Cu}(\text{a-Lcar})_2(\text{Cl})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**16**)

Para as sínteses dos complexos **15** e **16** o ligante utilizado foi o cloridrato de acetil-L-carnitina e o sal de metal foi o $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. O ligante foi facilmente solubilizado a 25 °C e as sínteses foram feitas como as descritas para os complexos com L-carnitina. Para o complexo **15** a síntese foi realizada na proporção 1:1 metal/ligante de maneira semelhante à síntese do complexo **13**. O pH foi ajustado para 6,0 e um precipitado verde azulado foi isolado com rendimento de aproximadamente 47 %.

Para o complexo **16** a síntese foi realizada na proporção 1:2 metal/ligante de maneira semelhante à síntese do complexo **14**. O pH foi ajustado para 7,0. Após a evaporação total do solvente em rotaevaporador inicialmente um óleo foi obtido. O óleo formado foi lavado com metanol, dissolvido em 10 mL de água e, em seguida, foram adicionados 5 mL de éter até a solução turvar. Após duas horas, o precipitado verde escuro formado foi lavado com metanol e éter gelados e levado à estufa para secar a 50

°C. O complexo foi guardado em dessecador contendo cloreto de cálcio, por ser um pouco higroscópico. O rendimento foi de aproximadamente 53%.

9.3. Caracterizações

Os complexos sintetizados foram caracterizados utilizando as seguintes técnicas:

- Análise Elementar:
 - (CHN)
 - Espectrometria de absorção atômica (AAS)
- Análise condutimétrica
- Análise termogravimétrica (TGA)
- Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV/Vis)
- Espectroscopia na região do infravermelho (IV)
- Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)
- Eletroquímica: Voltametria cíclica

Os procedimentos de utilização de cada uma das técnicas de caracterização estão descritos a seguir. Com os resultados obtidos através destas análises, foi possível propor as fórmulas moleculares e possíveis estruturas para cada um dos complexos formados.

9.3.1. Análise Elementar: (CHN) e absorção atômica

As análises de CHNS foram feitas utilizando-se um Elemental Analyzer CHNS/O Sinc EA 1110, CE Instruments.

Os elementos C, H, N e S foram analisados simultaneamente mediante curva de calibração obtida com padrões secos e de alta pureza, em condições iguais às das análises, com tempo de queima de 600 segundos, sob fluxo de hélio e temperatura de 20-900 °C.

As amostras foram pesadas em balança analítica com precisão de 10^{-4} g entre (2 a 3 mg) de cada amostra, acondicionadas em cápsulas de estanho.

Todas as análises foram feitas em duplicata e forneceram o percentual de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre. Oxigênio foi calculado por diferença.

Para a absorção atômica (AAS) foram preparadas soluções dos complexos na concentração de 10^{-3} M em HNO_3 10% (v/v) e, posteriormente, o cobre foi quantificado utilizando-se um Espectrômetro de Absorção Atômica, modelo A5 - Varian com comprimento de onda de 327 nm e banda espectral de passagem de 0,1 nm.

Os resultados obtidos foram comparados com uma curva analítica do íon Cu(II) , construída a partir da análise de soluções deste íon, preparadas em concentrações de 0, 10, 20, 40 e 60 ppm, respectivamente. A partir dos resultados obtidos foi possível determinar a porcentagem de cobre em cada um dos complexos.

9.3.2. Análise condutimétrica

Foram preparadas soluções aquosas na concentração 10^{-3} M dos sais NaCl (eletrólito 1:1), Na_2SO_4 (eletrólito 2:1) e Na_3PO_4 (eletrólito 3:1), que foram utilizadas como referência.

Foram também preparadas soluções aquosas com concentração 10^{-3} M de todos os complexos, a partir da suposta fórmula mínima que já havia sido proposta com o resultado da análise elementar.

As medidas de condutividade elétrica das referências e, posteriormente, dos complexos, foram efetuadas a 25 °C, utilizando-se um Condutivímetro Orion 3 Star, Conductivity Benchtop – Thermo Electron Corpor.

Os resultados obtidos foram comparados com os encontrados na literatura^{9,4} e forneceram informações que permitiram verificar se os complexos sintetizados eram neutros, ou se tratava de espécies eletricamente carregadas.

9.3.3. Análise termogravimétrica (TGA)

Para as análises termogravimétricas, cada complexo foi cuidadosamente pesado, acondicionado em cadinho de platina, em balança Termogravimétrica Perkin-Elmer TGA 7. As curvas de decomposição térmica foram então obtidas utilizando-se o equipamento SDT – 2960 - TA Instruments.

As análises foram feitas sob fluxo de nitrogênio, com vazão de 100 mL/min, e temperatura de aquecimento na faixa de 20 a 900 °C (taxa de 5 °C /min).

A análise termogravimétrica gera como resultado uma curva de decomposição térmica que fornece os percentuais dos fragmentos de massa perdidos em função da temperatura, auxiliando na proposta de coordenação para cada complexo, assim como na identificação de moléculas de solvente coordenadas ou presas na rede cristalina dos compostos.

9.3.4. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção molecular na região do ultravioleta-visível foram obtidos com um espectrofotômetro UV-Visível Perkin-Elmer Lambda 35, operando na faixa de 190-1000 nm. Como referênica, foram utilizadas água bidestilada e deionizada. Todos os complexos foram medidos na concentração de 10^{-3} mol/L. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente, utilizando células de quartzo com capacidade de 4 mL e caminho ótico de 1cm.

9.3.5. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Utilizou-se um espectrômetro de infravermelho Perkin-Elmer, modelo 2000 FT-IR, coletando-se os dados com intervalos de $0,5\text{ cm}^{-1}$, com resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$, velocidade de varredura de $0,2\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ e número de varreduras igual a 120.

Para todos os complexos, foram obtidos espectros nas regiões do infravermelho médio ($4000 - 370\text{ cm}^{-1}$) e afastado ($710 - 30\text{ cm}^{-1}$). Para o infravermelho médio preparou-se pastilhas dos complexos em KBr e, para a o infravermelho afastado pastilhas dos complexos em polietileno.

9.3.6. Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foram obtidos no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), em colaboração com os professores Eliane Wajnberg e Odivaldo Cambraia.

Foi utilizado um espectrômetro Bruker ESP300E, com frequência modulada de 100 kHz operando a 9,5 GHz. As amostras foram analisadas utilizando-se tubos de quartzo de diâmetro interno 3 mm, no estado sólido à temperatura ambiente (300K) e em solução congelada (10% de DMF), 77 K, com nitrogênio líquido. Os valores dos parâmetros de EPR foram obtidos por tratamento e simulação dos espectros experimentais utilizando-se os programas Windows software Win-EPR e SimFonia.

9.3.7. Eletroquímica – Voltametria Cíclica

As análises eletroquímicas foram realizadas usando-se a técnica de voltametria cíclica, em colaboração com o Prof. Ricardo Aucélio e a doutoranda Eliane - PUC-Rio. Utilizou-se um analisador eletroquímico Bioanalytical Systems Inc. (BAS), modelo 100BW. Um eletrodo Ag/AgCl foi utilizado como referência, um eletrodo de platina foi utilizado como eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo foi um fio de platina.

As medidas foram realizadas na concentração de 10^{-3} mol/L, em água deionizada contendo 10^{-1} mol/L de cloreto de potássio (KCl) como eletrólito suporte, a 25 °C, sob uma atmosfera de nitrogênio.