

2 Experimental

2.1. Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados nos processos de síntese e titulações potenciométricas foram obtidos a partir de fontes comerciais, com grau de pureza P.A., e para a utilização deles não foi realizada nenhuma purificação prévia.

1. Solventes e Solventes Deuterados

Acetonitrila (Vetec); *N,N*-Dimetilformamida (Vetec); Etanol (Merck e Vetec); Metanol (Vetec); Dimetilsulfóxido- d_6 (Aldrich).

2. Reagentes Orgânicos

Isoniazida (Fluka), 8-Hidroxiquinolina-2-carboxaldeído (Sigma-Aldrich e Acros Organics); 5-bromoindol-3-carboxaldeído (Sigma-Aldrich).

3. Reagentes Inorgânicos

Ácido clorídrico (Vetec), Brometo de potássio, KBr (Sigma-Aldrich); Cloreto de cobre(II) diidratado, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (Sigma-Aldrich); Cloreto de zinco(II) anidro, $ZnCl_2$ (Vetec); Hidróxido de potássio (Vetec); Cloreto de potássio (Vetec).

2.2. Equipamentos e técnicas analíticas

2.2.1. Análise Elementar

Os elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio foram analisados de forma simultânea a partir da curva de calibração obtida com padrões secos e de alta pureza, sob temperatura de 60 °C, que é aquela do forno da coluna

cromatográfica, e 900 °C, referente ao forno do tubo reacional, e com fluxo de gás hélio.

As análises foram realizadas em um analisador elementar (CHN), modelo EA112, da Thermo Electron, pesando-se em balança analítica entre 2 e 3 mg de cada amostra, as quais foram acondicionadas em cápsulas de estanho. Todas as análises foram feitas em duplicata no departamento de Química da PUC-Rio.

2.2.2. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Foi utilizado um espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio, modelo 100 FT-IR, da Perkin-Elmer, sendo os dados coletados a intervalos de 0,5 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , velocidade de varredura de 0,2 $\text{cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e número de varreduras igual a 120 no departamento de Química da PUC-Rio.

Foram coletados espectros nas regiões de 4000-450 cm^{-1} e 700-30 cm^{-1} para todos os ligantes e complexos sintetizados, sendo a amostragem feita em pastilhas de brometo de potássio seco (IV médio) e polietileno (IV afastado).

2.2.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) foram obtidos em espectrofotômetro Bruker-FT 200 MHz à temperatura ambiente, em colaboração com a professora Marciela Scarpellini, da instituição Universidade Federal do Rio de Janeiro. Todos eles foram calibrados com base no sinal residual do solvente (2,50 ppm) e as amostras foram solubilizadas em 0,5 mL de DMSO- d_6 .

2.2.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica dos complexos de Cu^{2+} foram registrados em um equipamento Bruker ESP300E, com frequência modulada de 100 kHz, e operando em 9,5 GHz (Banda X), em colaboração com o professor Odivaldo Cambraia Alves, da instituição Universidade Federal Fluminense.

2.2.5. Difração de Raios X em monocristal

A análise de difração de raios X do ligante $\text{H}_2\text{L1}$ foi realizada pelo Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo, São Carlos), em uma colaboração com o Prof Javier Ellena. A amostra foi medida em um difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD, utilizando-se radiação $\text{Mo K}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite. Os dados foram coletados à temperatura ambiente (298 K) com o programa Collect³⁷, sendo a integração e o escalonamento das reflexões realizados com o sistema de programas HKL Denzo-Scalepack.³⁸ A estrutura cristalina foi resolvida por métodos diretos com SHELXS-97³⁹ e os átomos que não são hidrogênios, refinados anisotropicamente pelo método dos mínimos quadrados de matriz completa em F2 usando-se o programa SHELXL-97.³⁹ Já as medidas envolvendo o ligante HL2 foram realizadas, a baixa temperatura (173 K), num difratômetro Enraf-Nonius CAD-4 equipado com tubo de molibdênio e monocromador de grafite, em cooperação com o grupo do Prof. Adailton J. Bortoluzzi (Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis). Neste caso, a estrutura cristalina foi resolvida por métodos diretos com a utilização do programa computacional SIR97⁴⁰ e refinada pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa (programa SHELXL-97).³⁹ Os programas ORTEP-3⁴¹ e MERCURY⁴² (versão 2.3) foram utilizados para a representação gráfica das moléculas.

2.2.6. Ponto de Fusão

As determinações dos pontos de fusão dos ligantes foram realizadas no aparelho MQAPF-302 no departamento de Química da PUC-Rio.

2.2.7. Potenciometria

Estes experimentos foram executados no Laboratório de Equilíbrio Químico – LEQ na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, sob supervisão da co-orientadora desta tese, Profa. Ana Lucia Ramalho Mercê.

Os estudos potenciométricos foram realizados em uma mistura água / etanol (30/70% v/v), uma vez que os ligantes **H₂L1** e **HL2** apresentaram baixa solubilidade em meio aquoso. Utilizou-se um pHmetro Analyser 2 A14 acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl). As soluções foram preparadas com água bidestilada (livre de CO₂) e etanol (Merck). A calibração do pHmetro foi efetuada com soluções-tampão a pH 4, 7 e 10, verificando-se o valor da inclinação da curva (slope). Posteriormente, fazia-se a leitura do pH experimental de uma solução diluída de HCl ($0,04575 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH teórico = 2,340) preparada em água/etanol 30/70% v/v e com força iônica de $0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (KCl). O valor do pH teórico era subtraído daquele do pH experimental ($\Delta\text{pH} = \text{pH experimental} - \text{pH teórico}$) antes da realização de cada titulação. À medida que se realizava a titulação, naturalmente outros valores de pH eram devidamente registrados e, após o término dela, a quantidade ΔpH era sempre descontada de todos os valores de pH registrados ao longo do processo antes da realização do refinamento das constantes.

Os experimentos para a determinação das constantes de protonação dos ligantes foram realizados com 0,1 mmol do ligante **H₂L1** solubilizado em 50,00 mL de solução com força iônica $I = 0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (KCl). Já para o ligante **HL2**, usou-se apenas 0,05 mmol, devido à menor solubilidade dele comparada ao primeiro, também solubilizados em 50,00 mL e com a mesma força iônica que o sistema anterior. Para as titulações visando à obtenção das constantes de formação dos complexos desses ligantes com os íons Cu(II) e Zn(II), trabalhou-

se com soluções dos sais de nitrato de cada um dos íons, sendo a solução de Cu(II) padronizada por ICP-OES e a de Zn(II), por titulação complexométrica.

As titulações da solução dos ligantes foram realizadas de duas maneiras: com a acidificação da solução pela adição de 0,05 mL de HCl 0,181713 mol L⁻¹, de modo a se ter um pH inicial próximo a 3, e sem a acidificação. Para as titulações envolvendo os complexos, a acidificação foi realizada em todas as ocasiões e de modo idêntico àquele descrito acima, trabalhando-se nas proporções metal:ligante 1:1 e 1:2.

Todas as titulações foram realizadas em uma célula de vidro com parede dupla e capacidade de 100 mL, em um banho termostatizado que manteve a temperatura reacional a 25,0 ± 0,1°C, sob atmosfera de nitrogênio, sendo utilizada como titulante solução padrão de KOH 0,100 mol.L⁻¹, também preparada na mistura água/etanol (30/70 % v/v). O pK_w da solução água/etanol, contendo 0,100 mol.L⁻¹ de KCl, utilizado para os refinamentos foi 14,71.⁴³ A adição de alíquotas de 0,02 mL do titulante foi feita com o auxílio de uma bureta Schott, modelo TM 96, com adições sucessivas de titulante após a obtenção de valores constantes de pH. As titulações para cada sistema foram feitas em triplicata. As constantes de equilíbrio foram refinadas com o programa Hyperquad 2000 e as curvas de distribuição de espécies foram simuladas com o programa Hyss 2008.⁴⁴

2.2.8. Análise farmacológica *in silico*

A análise farmacológica *in silico* (ou seja, aquela que é realizada através de uma simulação computacional) é um estudo teórico de significativa importância quando se visa ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, já que ela prevê as características farmacológicas e farmacocinéticas de novas moléculas com possíveis ações terapêuticas. Neste trabalho, fez-se a análise *in silico* para os ligantes **H₂L1** e **HL2** em colaboração com o aluno de doutorado de nosso grupo de pesquisa Wellington da Silva Cruz. Utilizaram-se três programas para a realização dela: o programa Osiris Property Explorer ⁴⁵ para a obtenção dos parâmetros log P, log S, massa molar, druglikeness, drug-score e toxicidade; já com o Wavefunction Spartan 10 ⁴⁶ obteve-se os dados para HBA, HBD e PSA e com o programa SMARTCyp 2.4.2 ⁴⁷ fez-se a análise de metabolismo.

2.2.9.

Estudos de interação com os sistemas Cu(II)-A β e Zn(II)-A β

Estes estudos visam avaliar, através de espectroscopia de RMN, o potencial de determinado composto como MPAC, no sentido de bloquear interações metal-proteína anômalas. Eles foram realizados apenas para o ligante **H₂L1**, em virtude de sua maior solubilidade, em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Claudio O. Fernández, nas instalações do “Laboratorio de Biología Estructural y Molecular de Enfermedades Neurodegenerativas (IBR-CONICET)” em Rosário, Argentina.

2.2.10.

Estudos de toxicidade aguda de H₂L1 em modelo animal mamífero

Estes ensaios foram realizados em colaboração com as pesquisadoras Rachel Ann Hauser-Davis (UNIRIO / PUC-Rio) e Silvia S. Maisonette (PUC-Rio) e o Prof. Jesús Landeira-Fernandez (Departamento de Psicologia, PUC-Rio). Além de avaliar a sobrevivência de animais injetados intraperitonealmente com o composto, este estudo teve como objetivo monitorar as concentrações de glutatona reduzida (GSH, um tiol de baixa massa molar e biomarcador de estresse oxidativo), metalotioneínas (MTs) e certos metais fisiológicos (Cu, Zn e Fe) importantes no contexto da DA.

2.2.10.1.

Injeção do composto e pré-preparo das amostras

Ratos Wistar machos foram usados como sujeitos, divididos em três grupos: um grupo controle (n=4), que não foi injetado; um grupo injetado apenas com o veículo (n=4), e um grupo injetado com o composto dissolvido no veículo (solução salina/10% DMSO), em concentração aguda de 200 mg kg⁻¹ (n=8). Após as injeções, os animais foram mantidos em condições de fotoperíodo de 12 h e comida e água foram oferecidos *ad libitum* (ou seja, à vontade).

Os animais foram sacrificados após 72 h por guilhotinagem. Após o sacrifício, as cobaias foram dissecadas e os seus cérebros removidos, rinsados com água ultra-pura e imediatamente armazenados a -80 °C. Após o congelamento, as amostras foram cortadas em pequenos pedaços e separadas em duas frações: uma destinada à liofilização e uma para análise úmida. As

amostras destinadas à liofilização foram liofilizadas por 48 h em um liofilizador modelo Liotop 101 (Liobras, SP, Brasil), maceradas com gral e pistilo e, então, armazenadas em tubos de polipropileno estéreis até a análise.

Todos os protocolos experimentais desta parte do trabalho foram aprovados pelo comitê de ética do Departamento de Psicologia da PUC-Rio e foram realizados de acordo com os Guias de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento, baseado no Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (revisado em 1996).⁴⁸

2.2.10.2.

Extração e quantificação de metalotioneínas

As metalotioneínas (MTs) foram extraídas dos diferentes órgãos de acordo com o procedimento de extração térmica de Erk *et al*⁴⁹, em triplicata. As amostras liofilizadas foram homogeneizadas em aproximadamente 500 µL de tampão de extração contendo Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ pH 8,6, PMFS 0,5 mmol L⁻¹ e β-mercaptoetanol 0,01%. As amostras foram então centrifugadas a 20.000 x g por 1 h a 4 °C. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos, transferidos para outros tubos identificados e então aquecidos a 70 °C por 10 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 20.000 x g por 30 min a 4 °C e os sobrenadantes finais contendo as metalotioneínas foram transferidos para outros microtubos. Estas amostras purificadas foram então centrifugadas em microtubos de filtração Vivaspin (Sartorius, Alemanha) com corte de 3 kDa, de acordo com as instruções do fabricante, para remover interferentes como a glutathiona reduzida, além de outros compostos de tamanho menor que 3 kDa, e concentrar as amostras.⁵⁰ Após esta etapa, as amostras foram congeladas a -80 °C até a análise.

As absorvâncias das amostras foram avaliadas a 412 nm em um espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis. As concentrações de MT foram estimadas a partir de uma curva analítica de GSH (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA), assumindo a relação de 1 mol MT sendo equivalente a 20 mols GSH.

2.2.10.3.

Extração e quantificação de glutathiona reduzida (GSH)

As amostras úmidas foram homogeneizadas em atmosfera inerte (fluxo contínuo de nitrogênio ultra-puro) em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato de sódio, pH 7,0 contendo 0,25 mol L⁻¹ de sacarose⁵¹ e centrifugadas a 13.500 rpm, em triplicata. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos, transferidos para outros microtubos e imediatamente analisados. O conteúdo total de GSH foi determinado pelo método de Ellman⁵², em que as amostras são tratadas com DTNB 0,1 mol L⁻¹ em tampão fosfato de sódio pH 8,0 em uma razão 1:1. As absorvâncias das amostras foram avaliadas a 412 nm em um espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis. As concentrações de GSH foram estimadas a partir de uma curva analítica de GSH (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA), e expressas como $\mu\text{mol g}^{-1}$ peso úmido.

2.2.10.4.

Determinações de metais

Aproximadamente 100 mg das amostras liofilizadas transferidas para tubos estéreis de polipropileno e 0,5 mL de HNO₃ (Merck, Alemanha) foram adicionados para iniciar a digestão ácida. Os tubos foram deixados em repouso por 12 horas e a digestão foi finalizada em chapa de aquecimento a aproximadamente 100 °C por 4 h. Após a digestão, as amostras foram avolumadas em seus respectivos tubos de polipropileno até 10 mL.

Os metais (⁵⁶Fe, ⁶⁵Cu, ⁶⁶Zn) foram determinados em um ICP-MS ELAN DRC II (Perkin-Elmer Sciex, Norwalk, CT, USA) no modo padrão, sem o uso de célula de reação. A introdução da amostra foi feita usando um nebulizador tipo Meinhard com uma câmara ciclônica *twister*. Durante a análise, ¹⁰³Rh foi utilizado como padrão interno em concentração de 20 mg L⁻¹. A precisão do procedimento analítico foi verificada utilizando-se brancos das amostras e pela análise, em paralelo, de material de referência certificado comercial (DORM-2, músculo de peixe-cachorro; National Research Council of Canada), em triplicata.

2.3. Sínteses dos ligantes

2.3.1.

Síntese da 8-hidroxiquinolina-2-carboxaldeído isonicotinoíl hidrazona (H_2L1)

Em um balão de reação de 50 mL, solubilizaram-se 3 mmol (0,5190 g) de 8-hidroxiquinolina-2-carboxaldeído em 10 mL de etanol. A esta solução, foram adicionados, lentamente, 3 mmol (0,4116 g) de isoniazida, solubilizada em 10 mL de etanol. Em seguida, adicionou-se duas gotas de HCl P.A. à mistura a fim de catalisar a formação do composto. O sistema foi mantido sob agitação constante e refluxo a 80 °C por 1 h, havendo a formação de um precipitado amarelo claro, o qual foi filtrado e recristalizado em metanol, sendo obtido um pó cristalino de cor amarelo pálido que foi lavado três vezes com metanol frio e seco à temperatura ambiente. Depois de alguns dias, monocristais adequados à difração de raios-X foram obtidos a partir do líquido-mãe, filtrados e lavados com metanol gelado.

Rendimento: 0,4900 g (56%). Análise elementar - percentual encontrado (percentual calculado): C 66,3 (65,7); H 4,1 (4,1); N 19,4 (19,2). Fórmula: $C_{16}H_{12}N_4O_2$ (292,28 g mol⁻¹). Ponto de fusão: 246-249 °C.

Na Figura 21 é mostrado o esquema de síntese para o ligante.

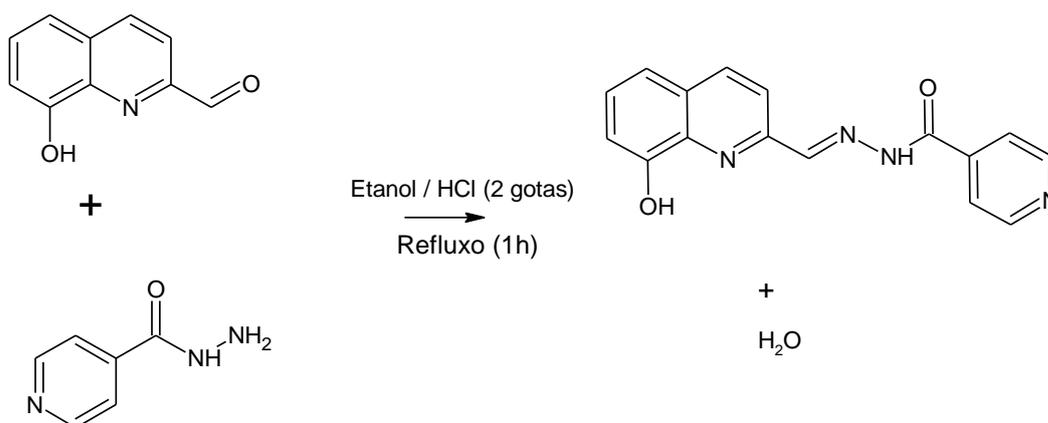


Figura 21: Esquema reacional para a síntese do ligante H_2L1 .

2.3.2.

Síntese da 5-bromoindol-3-carboxaldeído isonicotinóil hidrazona (HL2)

Em um balão de reação de 50 mL, solubilizou-se 3 mmol (0,6723 g) de 5-bromoindol-3-carboxaldeído em 15 mL de etanol. A esta solução, foram adicionados, lentamente, 3 mmol (0,4116 g) de isoniazida, solubilizada em 10 mL de etanol. Em seguida, adicionou-se duas gotas de HCl PA à mistura a fim de catalisar a formação do composto. Cerca de 5 minutos após a adição do ácido uma turbidez intensa foi observada no sistema, que foi mantido sob agitação constante e refluxo a 80 °C por mais uma hora, havendo a formação de um precipitado amarelo claro de aspecto brilhoso, que foi filtrado e lavado com etanol frio três vezes. Realizou-se então a recristalização do composto numa mistura de dimetilformamida (DMF) e metanol na razão 1:1, obtendo-se monocristais adequados à difração de raios-X, que foram retirados e lavados com metanol gelado. Rendimento: 0,7187 g (70%). Análise elemental - percentual encontrado (percentual calculado): C 52,2 (52,5); H 3,1 (3,2); N 16,6 (16,3). Fórmula: $C_{15}H_{11}N_4OBr$ (342,2 g mol⁻¹). Ponto de fusão: 287-291 °C.

Na Figura 22 é mostrado o esquema de síntese para o ligante.

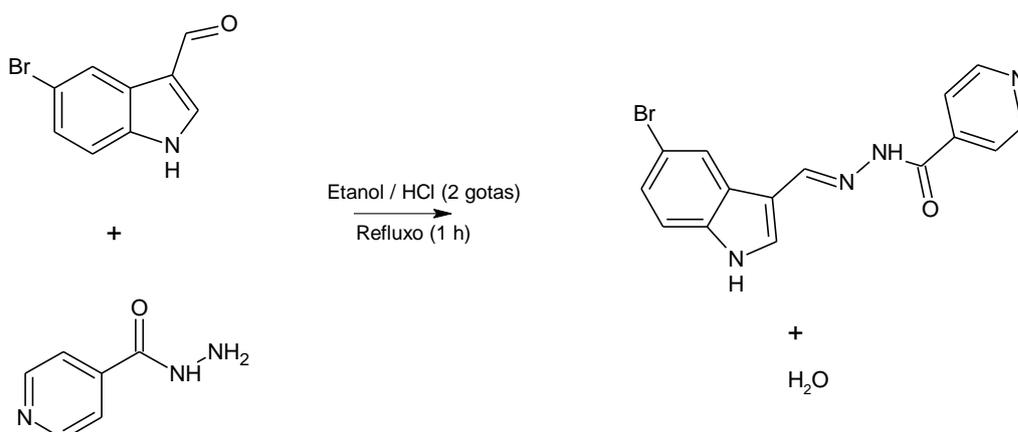


Figura 22: Esquema reacional para a síntese do ligante **HL2**.

2.4. Sínteses dos complexos

2.4.1.

Síntese do complexo $[\text{ZnCl}_2(\text{H}_2\text{L}1)] \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$, 1

Em um bécher, solubilizou-se 1 mmol (0,2923 g) do ligante **H₂L1** em 60 mL de etanol a quente. A esta solução, foi adicionado, lentamente, 1 mmol (0,1360 g) de cloreto de zinco(II) anidro, previamente solubilizado em 5 mL de etanol, mantendo-se a agitação constante e a temperatura próxima a 60 °C. A solução, que continha apenas o ligante e era inicialmente amarelo-clara, tornou-se alaranjada à medida que era adicionada a solução do íon metálico. Com o término da adição desta, observou-se uma intensa turbidez no sistema, o qual foi mantido sob agitação e deixado em repouso, por cerca de uma hora, até atingir a temperatura ambiente, havendo a formação de um precipitado de cor amarelo-ouro. O sólido foi separado por filtração a vácuo e lavado três vezes com etanol gelado. O composto mostrou-se pouco solúvel em solventes como metanol, etanol, acetonitrila, acetona e acetato de etila, sendo parcialmente solúvel em *N,N*-dimetilformamida e dimetilsulfóxido (DMSO). Rendimento: 0,1715 g (40%). Análise elementar - percentual encontrado (percentual calculado): C 43,9 (44,8); H 3,0 (2,8); N 12,8 (13,1). Fórmula: $[\text{ZnCl}_2(\text{H}_2\text{L}1)] \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ (437,70 g mol⁻¹).

2.4.2.

Síntese do complexo $[\text{CuCl}(\text{HL}1)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2

Este complexo foi sintetizado de modo similar ao anterior, exceto que, desta vez, foi utilizado 0,1705 g (1 mmol) de cloreto de cobre(II) diidratado como fonte de metal, previamente solubilizado em 5 mL de etanol. A solução amarelo-clara inicial, que continha apenas o ligante, tornou-se acastanhada à medida que era adicionada a solução do íon metálico. Com o término desta adição, observou-se intensa turbidez no sistema, o qual foi mantido sob agitação e deixado em repouso, por cerca de uma hora, até atingir a temperatura ambiente, havendo a formação de um precipitado marrom-acastanhado. O sólido foi separado por filtração a vácuo e lavado três vezes com etanol gelado. O composto mostrou-se pouco solúvel em solventes como metanol, etanol, acetonitrila, acetona e acetato de etila, sendo parcialmente solúvel em DMF e DMSO.

Rendimento: 0,1333 g (30%). Análise elementar - percentual encontrado (percentual calculado): C 42,7 (43,2); H 3,3 (3,8); N 12,6 (12,4). Fórmula: $[\text{CuCl}(\text{HL}1)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($444,30 \text{ g mol}^{-1}$).

2.4.3.

Síntese do complexo $[\text{ZnCl}(\text{L}2)\text{H}_2\text{O}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3

Em um bécher, solubilizou-se 1 mmol (0,3422 g) do ligante **HL2** em 80 mL de etanol a quente. A esta solução, foi adicionado, lentamente, 1 mmol (0,1360 g) de cloreto de zinco(II) anidro, previamente solubilizado em 5 mL de etanol, mantendo-se a agitação constante e a temperatura próxima a 70 °C. A solução, que era inicialmente amarelo-pálida, mostrou uma cor mais intensa à medida que era adicionada a solução do íon metálico. Com o término da adição desta, o sistema permaneceu visualmente homogêneo, e foi deixado em repouso, por cerca de uma hora, até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a redução do volume do solvente por evaporação lenta até que ocorresse precipitação no sistema. Foi obtido um sólido de cor amarela, que foi isolado e lavado três vezes com etanol gelado. O composto mostrou-se pouco solúvel em solventes como metanol, acetonitrila, acetona e acetato de etila, sendo parcialmente solúvel em etanol, *N,N*-dimetilformamida e DMSO. Rendimento: 0,1243 g (25%). Análise elementar - percentual encontrado (percentual calculado): C 35,1 (36,2); H 3,0 (3,4); N 10,7 (11,3). Fórmula: $[\text{Zn}(\text{OH}_2)\text{Cl}(\text{L}2)] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($497,20 \text{ g mol}^{-1}$).

2.4.4.

Síntese do complexo $[\text{CuCl}_2(\text{HL}2)] \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$, 4

Em um bécher, solubilizou-se 1 mmol (0,3422 g) do ligante **HL2** em 80 mL de etanol a quente. A esta solução, foi adicionado, lentamente, 1 mmol (0,1705 g) de cloreto de cobre(II) diidratado, previamente solubilizado em 5 mL de etanol, mantendo-se a agitação constante e a temperatura próxima a 80 °C. A solução do ligante, que era inicialmente amarelo-pálida, tornou-se esverdeada à medida que era adicionada a solução de cobre(II). Ao término desta adição, o sistema apresentava intensa turbidez, e foi mantido sob agitação e deixado em repouso, por cerca de uma hora, até atingir a temperatura ambiente. Foi obtido

um sólido de cor verde musgo, que foi lavado três vezes com etanol gelado. O composto mostrou-se pouco solúvel em solventes como metanol, etanol, acetonitrila, acetona e acetato de etila, sendo parcialmente solúvel em *N,N*-dimetilformamida e dimetilsulfóxido. Rendimento: 0,1947 g (40%). Análise elementar - percentual encontrado (percentual calculado): C 36,9 (37,0); H 2,3 (2,5); N 11,7 (11,5). Fórmula: $[\text{CuCl}_2(\text{HL}_2)] \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ ($486,70 \text{ g mol}^{-1}$).