

4 Procedimento Experimental

4.1 Reagentes utilizados

Dihidrocloridrato de etilenodiamina (en ·2 HCl) (Aldrich Chem. Co (USA)).

Dihidrocloridrato de 1,3 diaminopropano (tn ·2 HCl) (Aldrich Chem. Co (USA)).

Dihidrocloridrato de 1,4 diaminobutano (Put ·2 HCl) (Putrescina) (Acros Organics (USA)).

Trihidrocloridrato de spermidina (Spd ·3 HCl) (Aldrich Chem. Co (USA)).

Tetrahidrocloridrato spermina (Spm ·4 HCl) (Sigma Aldrich (USA)).

Fosfocreatina (PCr) (Sigma Aldrich (USA))

Adenosina 5´trifosfato (ATP) ((Sigma Aldrich) (USA)).

Sulfato pentahidratado de cobre(II) (Vetec (Brazil))

Nitrato tetrahidratado de zinco(II) (Merck (Alemanha))

Nitrato de potássio (Merck)

Solução padrão tampão 4,0 (Merck)

Solução padrão tampão 7,0 (Merck)

Solução padrão de KOH 0,1 mol L⁻¹ (Merck)

Solução padrão de HCl 0,1 mol L⁻¹ (Merck)

Água deuterada (Cambridge Isotope Laboratories)

Óxido de sódio deuterado (Cambridge Isotope Laboratories)

Cloreto deuterado (Cambridge Isotope Laboratories)

4.2 Metodologia e equipamentos

4.2.1 Potenciometria

A determinação de constantes de formação de complexos é bastante útil para avaliar as intensidades das interações no corpo humano, entre os íons metálicos e ligantes, bem como interações que possam ocorrer entre os ligantes, sem ou com a presença dos íons metálicos. O estudo em solução é o que mais se aproxima do que ocorre no corpo humano. Afinal, em média 73% do nosso organismo é composto por água [84].

As constantes termodinâmicas de equilíbrio, a uma determinada temperatura, são rigorosamente definidas como razões das atividades das espécies em equilíbrio e são independentes da força iônica do meio. Entretanto, a determinação destas constantes é, em geral, impraticável por não ser possível determinar as atividades de todas as espécies químicas presentes em equilíbrios superpostos. Por esta razão, exprime-se as constantes de equilíbrio como razões de concentrações, obtendo-se dessa forma, constantes estequiométricas. Para isto, é necessário fazer as determinações na presença de um eletrólito suporte concentrado para obter um meio de força iônica constante, à uma determinada temperatura.

Foram realizadas titulações potenciométricas para os ligantes puros, e para os sistemas binários e ternários entre os íons metálicos e os ligantes.

As titulações foram realizadas com o titulador automático modelo 809 Titrande Metrohm Automatic Microburette, acoplado a um adicionador automático modelo 800 Dosino Metrohm, e a um eletrodo de vidro combinado, acoplados ao software *Tiamo*. Todas as titulações foram realizadas com a temperatura e a força iônica constantes, mantidas sempre a 25°C e de 0,1 mol L⁻¹, respectivamente. Em todas as titulações 10 mL de KNO₃ 1,2 mol L⁻¹ foram adicionado para manter a força iônica constante num volume inicial de 120 mL. As titulações foram realizadas com a adição de incrementos de 0,1 mL de solução de KOH 0,1 mol L⁻¹.

As titulações de padronização das poliaminas e fosfocreatina partiram de um volume total inicial de 121 mL, sendo 100 mL do ligante 1x10⁻³ mol L⁻¹, 10 mL de KNO₃ 1,2 mol L⁻¹, 10 mL de H₂O e 1 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹. O HCl foi necessário adicionar devido a ausência de inflexão e ao elevado pH inicial da

titulação. À titulação de padronização do ligante ATP não foi necessária a adição de HCl. Nesse caso, a titulação foi realizada com o volume total inicial de 120 mL, sendo 100 mL do ligante, 10 mL de KNO_3 e 10 mL de H_2O .

Todas as titulações dos complexos binários e ternários obtidos foram realizadas com volume total inicial de 120 mL. Sendo nos complexos binários, sistemas M:L razão 1:1, 100 mL de ligante $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 10 mL de íon metálico $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e 10 mL de KNO_3 $1,2 \text{ mol L}^{-1}$. Nos complexos ternários, sistemas $\text{M:L}_a\text{L}_b$ razão 1:1:1, 50 mL de ligante L_a $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 50 mL de ligante L_b $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 10 mL de íon metálico $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e 10 mL de KNO_3 $1,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Para o cálculo das constantes de formação das espécies foi utilizado o programa de computador HYPERQUAD 2000 [85]. Os valores das constantes de hidrólise do íons metálicos cobre [86] e zinco [87] também foram levados em conta nos cálculos. No caso dos cálculos das espécies dos complexos ternários, as constantes de formação dos complexos binários participam, porém são mantidas constantes, só sendo refinados as espécies ternárias. A validação do cálculo é realizada através de uma comparação entre a curva teórica obtida através das constantes encontradas pelo cálculo e a curva de titulação obtida experimentalmente. As curvas de validação, assim como o diagrama de distribuição de espécies em função do pH, foram feitas com auxílio do programa de computador HYSS [88].

4.2.2 Espectrofotometria no Ultravioleta e visível

A absorção de radiação deve-se ao fato das moléculas terem elétrons que podem ser promovidos a níveis de energia elevados mediante a absorção de energia. Além da variação de energia eletrônica, que é consequência da absorção de radiação, há também variações associadas à energia de vibração dos átomos na molécula e variações da energia de rotação. As energias dos níveis rotacional e vibracional são muito semelhantes. Portanto não se apresentam em bandas separadas e nítidas, mas sim em uma banda relativamente larga.

Com o auxílio do espectrofotômetro é possível determinar, em uma solução, a quantidade de luz absorvida para um determinado comprimento de onda. Fazendo a varredura da variação de absorvância num intervalo de

comprimento de onda, observa-se através de um gráfico Absorvância x λ (comp. de onda), a variação de absorção de radiação.

Nos espectros UV-Visível de solução de complexos de metais de transição, podem ser observadas transições de transferência de carga na região do ultravioleta (300 – 190 nm) e transições d-d correspondentes a rearranjos eletrônicos dentro do subnível d do íon metálico na região do visível (900 – 400 nm).

A intensidade das bandas nos espectros de absorção está relacionada com o fato de a transição ser permitida ou não. As bandas de transferência de carga são permitidas segundo as regras de seleção de Laporte e do Spin. Essas bandas são intensas. Já as bandas d-d, que envolvem transições dos elétrons entre os estados d, são “proibidas” segundo a regra de Laporte e “permitidas” segundo a regra do spin. Essas bandas são menos intensas do que as bandas de transição.

A realização dos espectros no Ultravioleta visível, se deu a partir de titulações manuais, utilizando o pHmetro B 375 Micronal. Todas as soluções foram preparadas de acordo com o procedimento utilizado na potenciometria. A cada adição de KOH 0,1 mol L⁻¹, uma pequena alíquota era coletada e colocada no cubeta de quartzo com comprimento de 1 cm para a leitura da amostra no espectrômetro modelo Perkin-Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer, acoplado ao software PerkinElmer UV WINLAB. Depois da leitura, a alíquota era devolvida a fim de manter o volume relativamente constante.

4.2.3 Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

A ressonância paramagnética do elétron (RPE) é uma técnica de investigação de moléculas ou íons que têm elétrons desemparelhados. A técnica se baseia na observação dos campos magnéticos que propiciam a ressonância na presença de radiação eletromagnética monocromática e no desdobramento de níveis de energia correspondentes ao spin eletrônico mediante a aplicação de um campo magnético estático.

O desdobramento hiperfino origina-se da interação do momento magnético eletrônico de núcleos vizinhos. Para íons de metais de transição, o desdobramento hiperfino dominante provém do núcleo do íon paramagnético e a

estrutura superhiperfina, com desdobramentos menores, pode vir dos ligantes, sendo o mais comum o nitrogênio.

Os parâmetros obtidos do espectro em solução são chamados de isotrópicos [89].

Os espectros de RPE foram obtidos à temperatura ambiente de 300 K, em um equipamento Bruker ESP300E com modulação de frequência de 100 kHz operando a 9,5 GHz (banda X). Os espectros em soluções aquosas, com pHs previamente ajustados, foram obtidos em células planas de quartzo. Os valores dos parâmetros isotrópicos de RPE foram obtidos através do tratamento e simulação dos espectros experimentais usando os programas de software do Windows WIN-EPR e SIMFONIA, e padrão de amostra WEAK PITCH BRUKER.

4.2.4 Raman

Na espectroscopia Raman, os níveis de energia das moléculas são evidenciados pelas frequências presentes na radiação espalhada pelas moléculas. Numa experiência típica, um feixe de radiação incidente, monocromática, passa pela amostra e observa-se a radiação espalhada (difundida) perpendicularmente à direção do feixe. Cerca de 1 em cada 10^7 fótons do feixe colide com as moléculas, cede parte da sua energia e é re-emitido com energia mais baixa. Estes fótons constituem a radiação Stokes, de frequência mais baixa que a original. Outros fótons podem receber energia das moléculas (que estiverem excitadas) e aparecem como radiação anti-Stokes, de energia mais alta que a original. A radiação que é emitida na direção do feixe, sem modificação da frequência, é a radiação Rayleigh.

As diferenças entre as frequências da radiação espalhada e da radiação incidente são muito pequenas, e é preciso que a radiação original seja muito monocromática para que possam ser observadas. Além disso, a intensidade da radiação espalhada é muito baixa, daí ser preciso usar feixes incidentes de grande intensidade. As fontes de laser propiciam radiação com as duas características.

Para aplicações biológicas, onde se trabalha com soluções aquosas, a espectroscopia Raman fornece mais informações que o infravermelho, pois o espectro de infravermelho de uma solução aquosa é dominado pelas frequências vibracionais da água.

Os espectros de Raman foram obtidos através espectrômetro modelo Perkin Elmer Raman Station 400 Raman Spectrometer, acoplado com o software SPECTRUM. Os espectros foram obtidos em solução aquosa, preparadas a uma concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a temperatura ambiente de 25°C sob as seguintes condições: Um laser de 100 mW foi focado nas soluções, um total de 10 scans foram acumulados e o tempo de exposição foi de 10 segundos. A resolução espectral foi de 2 a 4 cm^{-1} . As leituras dos espectros dos complexos binários e ternários foram feitas em determinados pHs escolhidos a partir dos diagramas de distribuição de espécies em função do pH de cada sistema, Os pHs foram escolhidos de maneira que a leitura fosse mais simplificada evitando pHs onde coexistissem diversas espécies. O ajuste de pH foi realizado com soluções de KOH e HCl.

4.2.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é a absorção ressonante de radiação de rádio frequência pelos núcleos atômicos expostos a um campo magnético.

A princípio todos os núcleos com número quântico de spin nuclear I diferente de zero sofrem este fenômeno. Um spin nuclear se comporta como um dipolo magnético, que tende a se alinhar ao campo magnético aplicado. O magnetismo de um núcleo é descrito em termos de sua constante giromagnética γ , que é proporcional à razão entre o momento magnético nuclear μ e o momento angular de spin nuclear I .

O resultado dos processos de magnetização e relaxação é convertido em um espectro, que apresenta linhas de ressonância com frequência ν correspondentes aos valores ΔE (diferença entre os níveis de energia) das transições dos núcleos estudados. Os valores de ν são proporcionais a B_0 (campo magnético aplicado diretamente), portanto um determinado núcleo terá diferentes frequências de ressonâncias em espectrômetros de diferentes valores de B_0 . Para facilitar a análise de espectro, utiliza-se o deslocamento químico δ (ppm) ao invés da frequência. O deslocamento químico independe do valor do campo B_0 .

Uma importante aplicação da técnica de RMN está relacionada com a avaliação da coordenação de um ligante a um íon metálico. As respostas do

RMN são diferentes para o ligante não coordenado e quando o ligante está coordenado.

Os espectros de RMN de ^1H (300 MHz) foram obtidos em espectrômetro de modelo Unity-300 (Varian), em sonda de 5 mm (IME). Foi utilizada a água deuterada (D_2O) como solvente e como referência (δ 4,75 ppm). Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em unidades de partes por milhão (ppm).

As soluções analisadas foram preparadas em concentrações $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As leituras dos espectros dos complexos binários e ternários foram feitas em determinados pHs escolhidos a partir dos diagramas de distribuição de espécies em função do pH de cada sistema, Os pHs foram escolhidos de maneira que a leitura fosse mais simplificada evitando pHs onde coexistissem diversas espécies. O ajuste de pD foi realizado com NaOD e DCl.