



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ADOLFO IGNACIO BARROS ROMO

**“COMPLEXOS DE COBRE COM O LIGANTE 2CP-BZ-SME, UM DERIVADO
SULFURADO DA BASE CLIP-PHEN. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E
ESTUDOS DE GERAÇÃO DE RADICAIS E CLIVAGEM DE DNA”**

FORTALEZA

2015

ADOLFO IGNACIO BARROS ROMO

“COMPLEXOS DE COBRE COM O LIGANTE 2CP-BZ-SME, UM DERIVADO
SULFURADO DA BASE CLIP-PHEN. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E
ESTUDOS DE GERAÇÃO DE RADICAIS E CLIVAGEM DE DNA”

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Química. Área de concentração:
Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Izaura Cirino
Nogueira Diógenes

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B273c Barros Romo, Adolfo Ignacio.

Complexos de cobre com o ligante 2CP-Bz-SMe, um derivado sulfurado da base clip-phen. Síntese, caracterização e estudos de geração de radicais e clivagem de DNA / Adolfo Ignacio Barros Romo. – 2015.
84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2015.

Orientação: Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes.

1. Complexo de cobre. 2. Clip-phen. 3. Espécies reativas de oxigenio. 4. SECM. 5. SPR. I. Título.

CDD 540

ADOLFO IGNACIO BARROS ROMO

“COMPLEXOS DE COBRE COM O LIGANTE 2CP-BZ-SME, UM DERIVADO SULFURADO DA BASE CLIP-PHEN. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE GERAÇÃO DE RADICAIS E CLIVAGEM DE DNA”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Aprovada em: 07/08/2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Marta Sofia Peixe Carepo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Tercio de Freitas Paulo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

...Aos meus pais, Solange e Juan
Carlos, aos meus avós Brunila,
Reinaldo e Elva, e especialmente a
Alexandra...

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. A Prof. Dr. Izaura Cirino Nogueira Diógenes, pela excelente orientação, apoio e ajudas concedidas, por ser quase uma mãe aqui no Brasil. Ao Dr. Luis Lemus, por seus conselhos e ajuda durante o trabalho desenvolvido em seu laboratório de química da “Universidad de Santiago de Chile”. Ao professor Héctor Abruña por suas contribuições neste trabalho no desenvolvimento da técnica de SECM e eletroquímicas. Aos professores Otáciro e Alzir do Instituto de Química de São Carlos por suas contribuições em EPR.

Aos professores participantes da banca examinadora Tercio de Freitas Paulo e Marta Peixe Carepo pelo tempo e valiosas colaborações e sugestões. Aos professores do grupo de Bioinorgânica, pela boa disposição para comigo. Ao Dr. Juan Guerrero e o grupo do laboratório do Chile.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas. A meus grandes amigos de fortaleza Dieric, Ricardo, Felipe, Marquinhos, Paulinho, Thales, Renato e na distância a meu irmão mexicano Uriel. A Magna, uma amiga quase irmã. A Alexandre... meu irmão que ache em Fortaleza e a Marta pelo seus conselhos e experiência.

A minha família, pai, mãe e vovó... por ser muito gente boa comigo.... e por último, agradecer a companhia e apoio de Alexsandra Bandeira...

“Se você domina seus medos, vai
vencer na morte.” (Alejandro Magno)

RESUMO

Compostos de coordenação de cobre têm sido considerados peças fundamentais em processos que envolvem a redução de oxigênio molecular, particularmente com a geração de espécies radicalares. Neste trabalho, foram reunidos resultados obtidos em superfície e em solução a fim de obter informações sobre a espécie reativa de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) gerada por um composto de coordenação de cobre(II) contendo um derivado tioéter do ligante clip-phen, 1,3-bis(1,10-fenantrolin-2-iloxi)-N-(4-(metiltio)benzilideno)propan-2-amina (2CP-Bz-SMe). A adsorção do complexo de cobre(II) sobre superfície de ouro foi realizada de forma espontânea por simples imersão do substrato metálico em solução aquosa do complexo. A caracterização do eletrodo de ouro modificado foi feita por eletroquímica e espectroscopia Raman de superfície (SERS – *Surface Enhanced Raman Scattering*) onde se concluiu que a adsorção ocorre através do átomo de enxofre do fragmento tioéter da molécula. Enquanto os resultados de ressonância de plásmons de superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*) e eletroquímica sugeriram a formação de um intermediário dimérico de Cu(I) contendo oxigênio molecular como ligante ponte, imagens de microscopia de varredura eletroquímica (SECM – *Scanning Electrochemical Microscopy*) indicaram a geração do radical hidroxil, OH•. A captura de spin por ressonância paramagnética de elétrons (EPR – *Electron Paramagnetic Resonance*) e ensaios de nuclease de DNA, os quais envolveram a utilização de inibidores de ROS, mostram que a geração do radical depende da quantidade de oxigênio e H₂O₂. Assim, é razoável admitir um mecanismo catalítico envolvendo reações do tipo Fenton onde o complexo de cobre(II) é, reduzido a cobre(I). Na presença de oxigênio e em meio ácido, o composto reduzido é oxidado por H₂O₂ resultando na regeneração do complexo de partida e na formação do radical OH• que, por sua vez, deve ser a espécie ROS responsável pela clivagem do DNA. Os resultados deste projeto foram apresentados no XVII *Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry* e estão em fase final de compilação para publicação.

Palavras-chave: Compostos de coordenação. Complexo de cobre. Clip-phen. Espécies reativas de oxigênio. Reação Fenton. SECM. SPR.

ABSTRACT

Coordination compounds of copper have been invoked as major actors in processes involving the reduction of molecular oxygen, mostly with the generation of radical species whose assignment have so far not been unanimously addressed. In the present work we have joined results acquired on surface and solution to get insights on the radical oxygen species (ROS) generated by a copper(II) coordination compound containing a thioether clip-phen derivative, 1,3-bis(1,10-phenanthroline-2-ylthio)-N-(4-(methylthio) benzylidene)propan-2-amine (2CP-Bz-SMe). The adsorption of the copper(II) complex on gold surface was spontaneously by simple immersion of the metallic substrate in aqueous solution of the complex. The characterization of the modified gold electrode, which was performed by electrochemistry and surface Raman spectroscopy (SERS – *Surface Enhanced Raman Scattering*), indicated that the adsorption occurs through the sulfur atom of the thioether fragment of the molecule. While surface plasmon resonance (SPR) and electrochemistry of the adsorbed complex indicated the formation of a dimeric Cu(I) intermediate containing molecular oxygen as bridging ligand, scanning electrochemical microscopy images (SECM) pointed for OH• radical generation. Spin trapping measurements acquired by electron paramagnetic resonance (EPR) and nuclease assays run in the presence of radical scavengers, reinforced such conclusions showing that the radical production is dependent on the amount of oxygen and H₂O₂. Therefore, it is reasonable to assume a catalytic mechanism involving Fenton-like reaction in which the copper(II) complex is, at first, reduced to copper(I). Accordingly, in the presence of oxygen and in acid medium, the reduced compound is oxidized by H₂O₂ resulting in the recovering of the parent complex and in the generation of OH• that, in turn, must be the ROS responsible for the DNA cleavage. The results obtained during the developing of this proposal were presented at the XVII *Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry* and are in the final compilation stage for publication in peer-reviewed journal.

Keywords: Coordination compounds. Copper complex. Clip-phen. Reactive oxygen species (ROS). Fenton-like reaction. SECM. SPR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- a) Estrutura do DNA mostrando os sulcos maiores e menores; b) pares de bases nitrogenadas (pb).....	17
Figura 2	- Geometrias associadas aos estados de oxidação (I) e (II) do cobre tetracoordenado.....	18
Figura 3	- Complexos de cobre com ligantes: (a) 1,10-fenantrolina; (b) 3-clip-phen (3CP); (c) 2-clip-phen (2CP).....	19
Figura 4	- Capacidade de interação com DNA através do sulco maior, menor e de intercalação de complexos de cobre(I) coordenado aos ligantes; a) phen, b) 2CP e c) 3CP.....	20
Figura 5	- Representação do modo de ligação “on-top” por meio de cálculos teóricos para a quimissorção de enxofre sobre ouro. Os ângulos de ligação estão em graus e a distância em Å. A distância Au-Au é fixada em 2,884 Å.....	21
Figura 6	- Proposta mecanística dos danos oxidativos ao DNA na desoxirribose nos carbonos C1', C4' e C5' devido ao complexo [Cu ^{III} (phen) ₂] na presença de H ₂ O ₂ gerando 5-MF, 3'-fosfoglicolato e furfural como subprodutos de reação.....	23
Figura 7	- Reação genérica dos “Spin-trap” a) PBN e b) DMPO com espécies radicalares (R*).....	24
Figura 8	- Representação ilustrativa das etapas redox envolvidas nos modos SI-SG/TC de operação SECM.....	25
Figura 9	- Estrutura do ligante 2CP-Bz-SMe.....	27

Figura 10	- Esquema simplificado da síntese do ligante 2CP-Bz-SMe: (i) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ em C_6H_6 ; (ii) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, NaOH ; (iii) PCl_5 em POCl_3 ; (iv) Serinol, NaH em DMF ; (v) 4-(metiltio)benzaldeído em CH_3OH anidro.....	32
Figura 11	- Espectro ^1H -RMN do ligante 2CPBzSMe em equipo de 400 MHz. Espectro inserido com ampliação de região de alifático..	36
Figura 12	- Espectro ^1H -RMN do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$ em $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$. Equipamento: 400 MHz.....	38
Figura 13	- Espectro EPR policristalino do complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$	39
Figura 14	- Espectro eletrônico do ion complexo $[\text{Cu}(\text{2CPBzSMe})]^+$ em acetonitrila (azul) e metanol (vermelho).....	40
Figura 15	- Espectros UV-Vis do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ em acetonitrila (azul) e metanol (vermelho). Concentração: $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	41
Figura 16	- Voltamogramas cíclicos do eletrodo de platina a 100 mV s^{-1} em acetonitrila contendo PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e os íons complexos a) $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$ e b) $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ Como eletrodos auxiliar e de referência, foram usados fio de prata e Ag/AgCl respectivamente.....	42
Figura 17	- Estrutura dos complexos a) $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ e b) $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]\text{ClO}_4$	42
Figura 18	- Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de ouro em solução de KClO_4 e KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo o íon complexo	

	[Cu(2CP-Bz-SMe)] ²⁺	43
Figura 19	- Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de ouro em solução de PBS 0.1 mol L ⁻¹ de diferentes valores de pH contendo o íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)] ²⁺ . Velocidade de varredura 375 mVs ⁻¹	45
Figura 20	- Representação gráfica de E versus pH para o íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)] ²⁺	45
Figura 21	- Estrutura proposta para o dímero de Cu(I) contendo uma ponte O-O entre os centros metálicos.....	47
Figura 22	- Voltamograma cíclico a 50 mV s ⁻¹ (linha sólida preta) do eletrodo de ouro em KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo 5,0 mmol L ⁻¹ do íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)] ²⁺ . Voltamograma cíclico a 10 mV s ⁻¹ (linha pontilhada azul) em eletrodo de ouro em KCl 0.1 mol L ⁻¹ após 1h de imersão em uma solução 5,0 mmol L ⁻¹ do íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)] ²⁺	48
Figura 23	- Espectro vibracionais raman (verde) e na região do infravermelho(azul) do composto [Cu(2CP-Bz-SMe)](NO ₃) ₂ disperso em sólido.....	50
Figura 24	- Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro modificado com o íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)] ²⁺ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ em diferentes velocidades de varredura. Pt e Ag/AgCl foram usados como eletrodos auxiliar e de referência, respectivamente.....	52
Figura 25	- Representação gráfica de corrente versus velocidade de varredura obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos ilustrados na Figura 24.....	52

Figura 26	- Espectro SERS <i>ex situ</i> do eletrodo de ouro modificado com o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ e espectro Raman normal do composto $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ no estado sólido.....	53
Figura 27	- Representação esquemática de uma molécula do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ adsorvido sobre ouro.....	54
Figura 28	- Variação de frequência (Δf) em função do tempo durante a adsorção do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ sobre um cristal piezoelétrico de ouro em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹	55
Figura 29	- Variação de ângulo SPR em função do tempo durante a adsorção do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ sobre ouro com aplicação de potencial negativo (#) e em condição de circuito aberto (*)......	56
Figura 30	- Estrutura proposta para o dímero do complexo de $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$ sobre ouro.....	57
Figura 31	- Espectros Raman do complexo de Cu^{2+} : (a) Raman normal; (b) SERS <i>ex situ</i> e (c) SERS <i>in situ</i> (-0,4 V por 60s).....	59
Figura 32	- Esquema da geração do possível radical nitrila.....	60
Figura 33	- Titulação espectroscópica do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ de concentração 2×10^{-5} mol L ⁻¹ , com alíquotas de 50 μL de DNA (1.56×10^{-3} mol L ⁻¹).....	61
Figura 34	- Representação gráfica de $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ em função de $[\text{DNA}]$ para a obtenção da constante de afinidade (K_b) para o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$	62

Figura 35	- Esquema comparativo de valores de constantes de afinidade (mol L^{-1}) de diferentes tipos e geometrias de complexos de cobre.....	63
Figura 36	- Espectro de fluorescência de DNA-ct incubado com EB em proporção de 1:1 de concentração $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em [bp]. Adições de $20 \mu\text{L}$ de uma solução $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ em PBS 2 mmol L^{-1} e pH 7,4.....	64
Figura 37	- Aplicação da equação de Stern-Volmer para a interação do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ dentro do intervalo $[\text{complexo}]/[\text{DNA}]$ de 0-6.....	65
Figura 38	- Forma circular e clivagem do plasmídeo pBR 322 devido a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Cu}(\text{II})^*$. A; (1) controle de DNA; (2) DNA + $\text{Cu}(\text{II})$; (3) DNA + $\text{Cu}(\text{II})$ + $30 \mu\text{mol L}^{-1}$; (4) DNA + $\text{Cu}(\text{II})$ + $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ + $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ catalase; (5) DNA + $\text{Cu}(\text{II})$ + $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ + 50 mmol L^{-1} D-manitol; (6) DNA + $\text{Cu}(\text{II})$ + $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ + $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ SOD. B; (1) controle de DNA; (2) DNA + $3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$; (3) DNA + $3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ + $\text{Cu}(\text{II})$. $\text{Cu}(\text{II})^* = [\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$	66
Figura 39	- Imagem ilustrativa esquemática do experimento de SECM usando os modos de interrogação de superfície (SI – <i>Surface Interrogation</i>) e detecção de corrente gerada na tip (SG/TC – <i>Surface Generated Tip Collection</i>), com o íon complexo $[\text{IrCl}_6]^{2-}$ como mediador.....	68
Figura 40	- Imagens de SECM SG-SI/TC mostrando a corrente na tip de SECM atribuída à detecção de espécies ROS geradas sobre o substrato de ouro modificado com o complexo $[\text{Cu}(\text{2CPBzSMe})]^{2+}$. Condições de obtenção das imagens: SECM tip a $0,5 \text{ V}$ em solução aerada de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e	

	substrato de ouro em OCP após 60 s a (A) 0,40 V e (B) -0,20 V. Distância tip-substrato = 12 μm e velocidade de varredura da tip (direção eixo-y) = 200 $\mu\text{m/s}$. Referência: Ag/AgCl/Cl ⁻ (KCl saturado).....	69
Figura 41	- Mecanismo sugerido para a formação de radical hidroxila durante a reoxidação do complexo de cobre (I) por médio de SECM.....	70
Figura 42	- Espectros de EPR do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em soluções aeradas e parcialmente desareadas que contem H_2O_2 e PBN. Espectro simulado obtido usando o programa EasySpin ⁴⁶ . a) Aduto PBN-OH [•] ; b) Radical PBN [•]	71
Figura 43	- Proposição mecanística para a geração do radical OH [•] a partir do processo redox do composto $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Condutividade molar expressada em $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ para o complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ em acetonitrila e água.....	47
Tabela 2	- Tabela de atribuição de sinais dos modos vibracionais dos espectros Raman e Infravermelho para o complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$	50
Tabela 3	- Dados utilizados na obtenção da constante de afinidade do íon oncomplexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ com DNA.....	62

SUMÁRIO

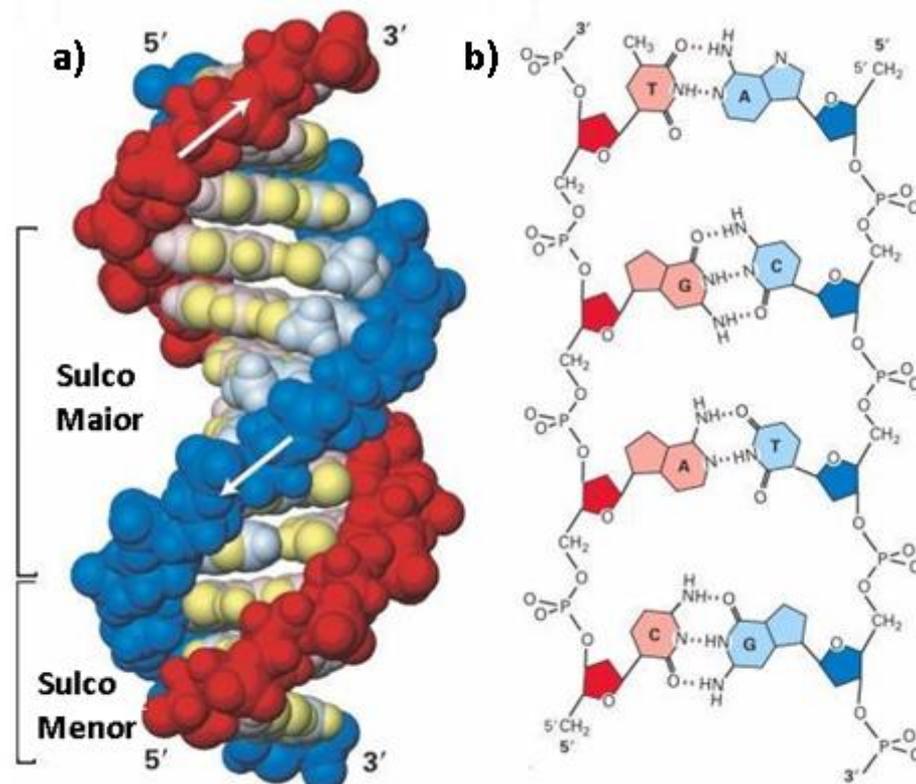
1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Complexos de cobre com o ligante Clip-phen que interagem com DNA.....	18
1.2	Adsorção de moléculas sobre superfícies condutoras.....	21
1.3	Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	22
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	Objetivo Geral.....	26
2.2	Objetivos Específicos.....	26
3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	28
3.1	Materiais e reagentes.....	28
3.2	Instrumentação.....	28
3.3	Procedimentos Sintéticos.....	31
3.3.1	<i>Síntese do ligante 2-Cl-1,10-fenantrolina.....</i>	<i>31</i>
3.3.2	<i>Síntese do ligante 2Clip-phen (2CP).....</i>	<i>31</i>
3.3.3	<i>Síntese do ligante 2CP-Bz-SMe.....</i>	<i>31</i>
3.3.4	<i>Síntese do complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)](NO₃)₂.....</i>	<i>32</i>
3.3.5	<i>Síntese de complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]ClO₄.....</i>	<i>32</i>
3.4	Procedimentos experimentais.....	33
3.4.1	<i>Preparação do DNA.....</i>	<i>33</i>
3.4.2	<i>Obtenção da constante de afinidade (K_b).....</i>	<i>33</i>
3.4.3	<i>Estudo de intercalação com brometo de etídio (EB).....</i>	<i>33</i>
3.4.4	<i>Estudo de geração de radicais por SECM.....</i>	<i>34</i>
3.4.5	<i>Estudo de geração de espécies ROS por EPR.....</i>	<i>34</i>
3.4.6	<i>Ensaio de clivagem com o plasmídeo pBR322.....</i>	<i>34</i>
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1	Caracterizações estruturais dos compostos.....	36
4.1.1	<i>Caracterização do ligante 2CP-Bz-SMe.....</i>	<i>36</i>
4.1.2	<i>Caracterização dos complexos [Cu(2CP-Bz-SMe)]ClO₄ e [Cu(2CP-Bz-SMe)](NO₃)₂.....</i>	<i>37</i>
4.1.2.1	<i>Ressonância magnética nuclear protônica ¹H-RMN.....</i>	<i>37</i>
4.1.2.2	<i>Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....</i>	<i>38</i>

4.1.2.3	<i>Espectroscopia eletrônica nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis).....</i>	39
4.1.2.4	<i>Caracterização eletroquímica.....</i>	41
4.1.2.5	<i>Estudo de condutância molar.....</i>	47
4.2	Caracterização eletroquímica do eletrodo de ouro modificado com o íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺.....	48
4.3	Espectroscopia vibracional.....	49
4.4	Estudo da adsorção do íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺ sobre ouro.....	51
4.4.1	<i>Estudo gravimétrico da adsorção do íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺ sobre ouro.....</i>	54
4.4.1.1	<i>Microbalança de cristal de quartzo (QCM).....</i>	54
4.4.1.2	<i>Ressonância de plásmons de superfície (SPR).....</i>	55
4.4.1.3	<i>Estudo de SERS in situ.....</i>	58
4.5	Estudo de interação do complexo com DNA.....	60
4.5.1	<i>Estudo de constante de afinidade do complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)] (NO₃)₂ com DNA.....</i>	60
4.5.2	<i>Estudo de competência com brometo de etidio (EB); obtenção da constante de Stern-Volmer (K_{sv}).....</i>	64
4.6	Estudo de geração de espécies ROS (Reactive Oxygen Species).....	66
4.6.1	<i>Estudo de geração de espécies ROS mediante eletroforese.....</i>	66
4.6.2	<i>Deteção de espécies reativas de oxigênio por meio de SECM..</i>	68
4.6.3	<i>Determinação do radical OH• por médio de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....</i>	71
5	CONCLUSÃO.....	73
	REFERENCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

O Câncer tem sido objeto de estudo de diferentes áreas da ciência, concentrando grande quantidade de esforços e recursos para o seu tratamento. A Química Medicinal, uma dessas áreas, é a parte da química que estuda as interações entre compostos sintéticos¹ e sistemas biológicos, com o objetivo de sintetizar medicamentos com atividade biológica específica para uso terapêutico. Com os avanços científicos das últimas décadas sobre o papel e o conhecimento estrutural da molécula de DNA, foram desenvolvidos agentes sintéticos²⁻⁴ capazes de interromper ou modificar a replicação da dupla fita, principalmente no que diz respeito ao reconhecimento e à interações posteriores. A interação droga-DNA, que se constitui na base dos tratamentos quimioterápicos correntes, pode ser classificado em interações com os sulcos maiores e menores do DNA⁵ e reconhecimento da estrutura do DNA que, por sua vez, pode ocorrer através de ligações covalentes com as bases nitrogenadas, conforme ilustrado na (Figura 1).

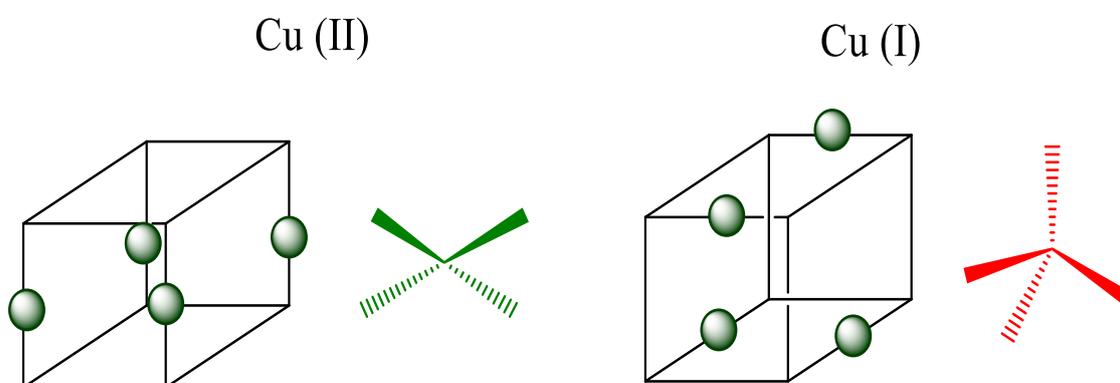
Figura 1: A) Estrutura do DNA mostrando os sulcos maiores e menores; b) pares de bases (pb) nitrogenadas.



1.1 Complexos de cobre com o ligante Clip-phen que interagem com DNA

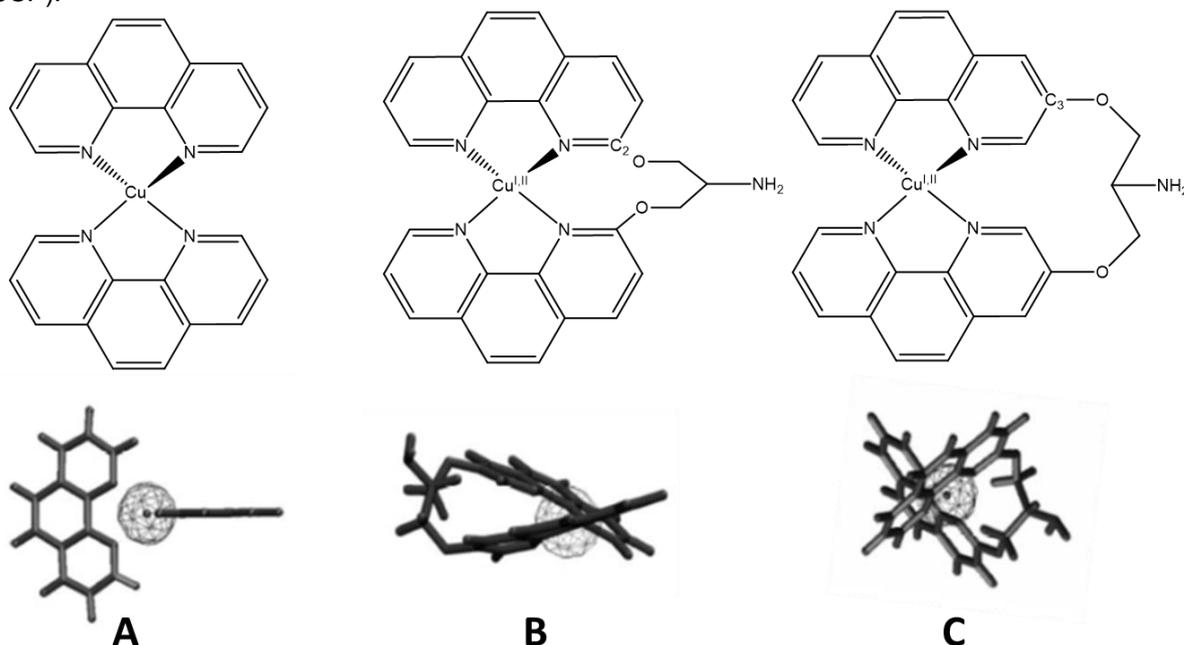
As diferentes geometrias e números de coordenação que o cobre apresenta em seus estados de oxidação (I) e (II) têm sido amplamente estudadas em diferentes áreas da química, tais como química supramolecular^{6,7}, fotoquímica e bioinorgânica⁸. A Figura 2 ilustra as geometrias quadrado planar e tetraédrica^{9,10} para Cu^{2+} e Cu^+ , respectivamente, ambos com número de coordenação igual a quatro.

Figura 2: Geometrias associadas aos estados de oxidação (I) e (II) do cobre tetracoordenado.



No fim da década de noventa do século passado foi desenvolvida uma família de compostos que mimetiza os sítios ativos de proteínas que contêm cobre. Destaque particular tem sido dispensado a complexos de Cu (I) e (II) com ligantes bis-fenantrolínicos, denominados “clip-phen”^{11,12}, devido a capacidade do ligante de se adaptar a mudanças de geometria de acordo com o estado de oxidação do centro metálico. Esses ligantes e seus derivados são constituídos por duas moléculas de 1,10-fenantrolina unidas por uma ponte 2-amino-1,3-propiléter nas posições C2 ou C3 de modo a diferenciar esses compostos como 2-clip-phen (2CP) ou 3-clip-phen (3CP), respectivamente, conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Complexos de cobre com ligantes: (a) 1,10-fenantrolina; (b) 2-clip-phen (2CP); (c) 3-clip-phen (3CP).



Estudos sobre a interação de DNA com compostos de cobre¹³ que apresentam elevada densidade aromática, tais como $[\text{Cu}(\text{dmp})_2]^+$ ou $[\text{Cu}(\text{bcp})_2]^+$, onde dmp = 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina e bcp = 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina¹⁴, sugerem que a afinidade observada deve-se, em parte, à geometria que os complexos apresentam¹⁵. Experiências de clivagem de DNA realizadas¹⁶ em meio aerado na presença de um agente redutor¹⁷ revelaram notável capacidade de clivagem dos complexos $\text{Cu}(2\text{CP})$ e $\text{Cu}(3\text{CP})$. Estudos mais elaborados^{17,18} estabeleceram que o modo de ação dos complexos de cobre com os ligantes (CP) é semelhante ao do composto $[\text{Cu}^{\text{I/II}}(\text{phen})_2]$ ¹⁹⁻²³, uma vez que interage com o sulco menor do DNA, clivando-o.

Estudos de DFT (*Density Functional Theory*) foram realizados para racionalizar a diferença na atividade de clivagem (Figura 4) entre os complexos $\text{Cu}(2\text{CP})$ e $\text{Cu}(3\text{CP})$ ¹⁸. Verificou-se que o complexo $\text{Cu}(3\text{CP})$ apresenta, em ambos os estados de oxidação, uma forma geométrica mais plana em comparação com o complexo $\text{Cu}(2\text{CP})$ o que facilita a intercalação de uma das suas unidades de fenantrolina¹⁸. A eficiência de tais sistemas tem sido atribuída, principalmente, à capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) que promovem a degradação oxidativa do DNA, conforme mecanismo representativo descrito²³ nas Equações de 1 a 3.

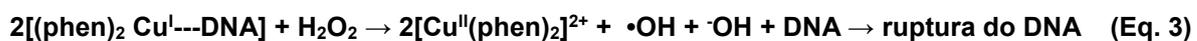
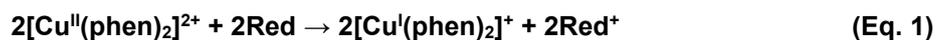
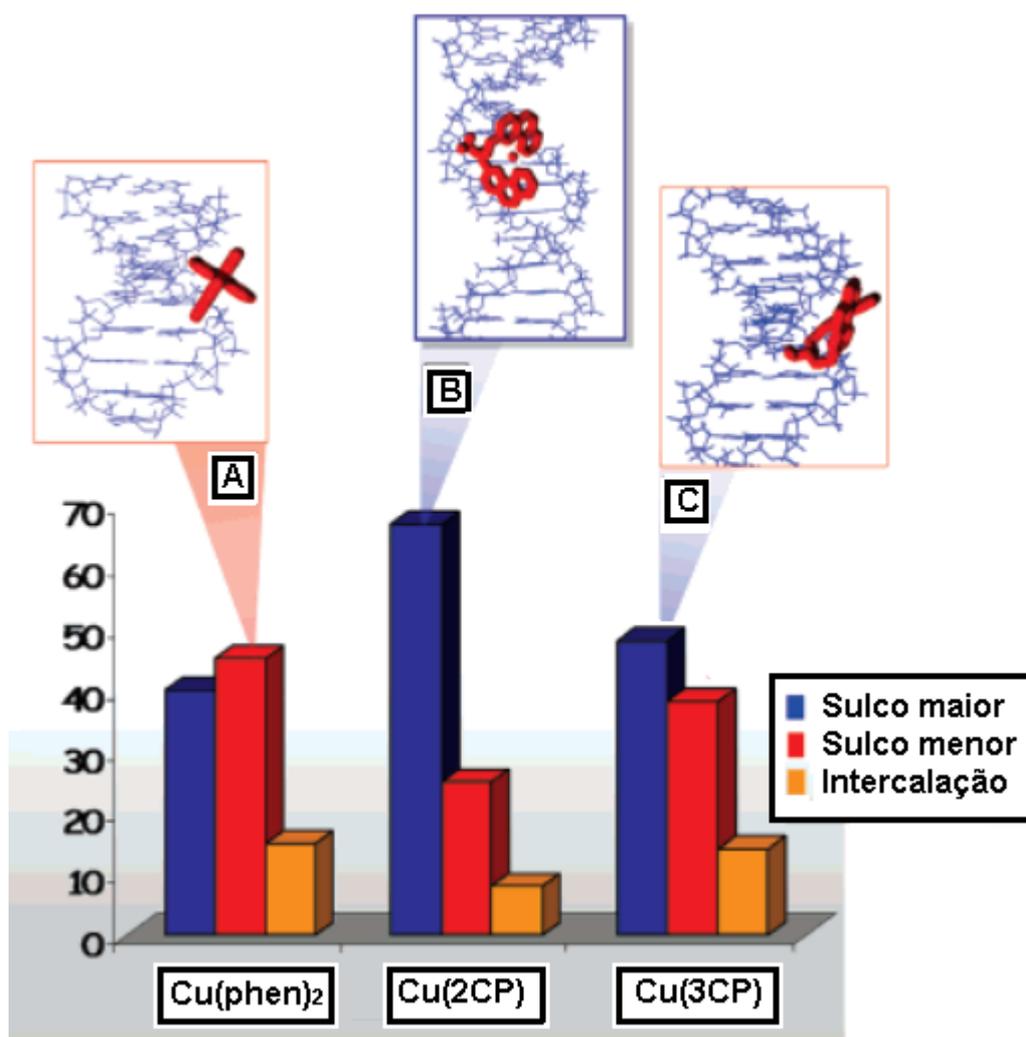


Figura 4: Capacidade de interação com DNA através do sulco maior, menor e de intercalação de complexos de cobre(I) coordenado aos ligantes; a) phen, b) 2CP e c) 3CP.

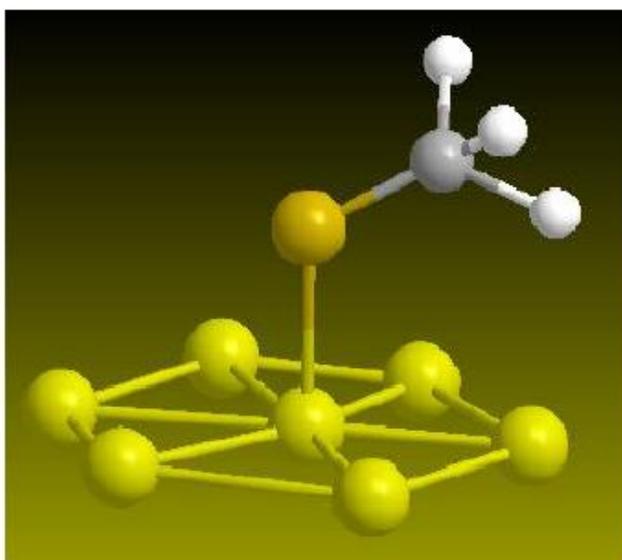
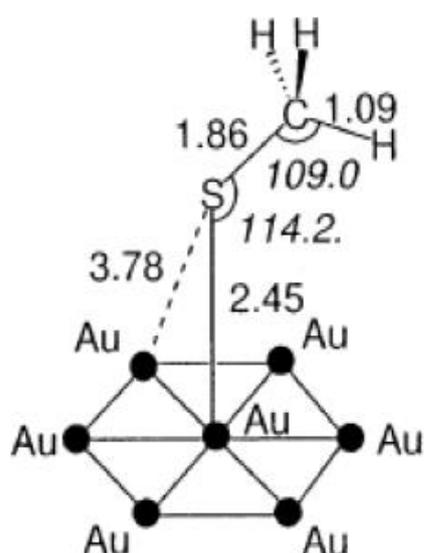


1.2 Adsorção de moléculas sobre superfícies condutoras

Uma forma viável de realizar estudos focados principalmente nos processos redox de uma espécie é mediante a adsorção desta para formar monocamadas automontadas²⁴⁻²⁶ (SAMs – *Self-Assembled Monolayers*) sobre superfícies condutoras. A adsorção de complexos contendo ligantes aromáticos sulfurados pode ser realizada sobre eletrodo de ouro devido à reconhecida afinidade entre átomos de enxofre e ouro²⁴.

Por meio de modelamento molecular, foram desenvolvidos alguns modelos para estudar a interação adsorbato/substrato^{25,27-29} entre compostos sulfurados (-SH e -SCH₃) e superfícies de ouro monocristalino (Au(111)). A ligação entre a superfície de ouro e o enxofre tem principalmente caráter σ com uma pequena contribuição π para adsorções em sítios “on-top”³⁰, ou seja, ligação da molécula de enxofre com só um átomo de ouro (Figura 5). Nesta ligação, o átomo de enxofre apresenta uma hibridização sp^3 com ângulo de 109° para a ligação Au-S-R. Considerando o eixo z como eixo internuclear, a ligação σ é realizada principalmente pelos orbitais p_z do enxofre e $6s$ dos átomos de ouro.

Figura 5: Representação de modo de ligação “on-top” por meio de cálculos teóricos para a quimissorção de enxofre sobre ouro. Os ângulos de ligação estão em graus e a distância em Å. A distância Au-Au é fixada em 2,884 Å.



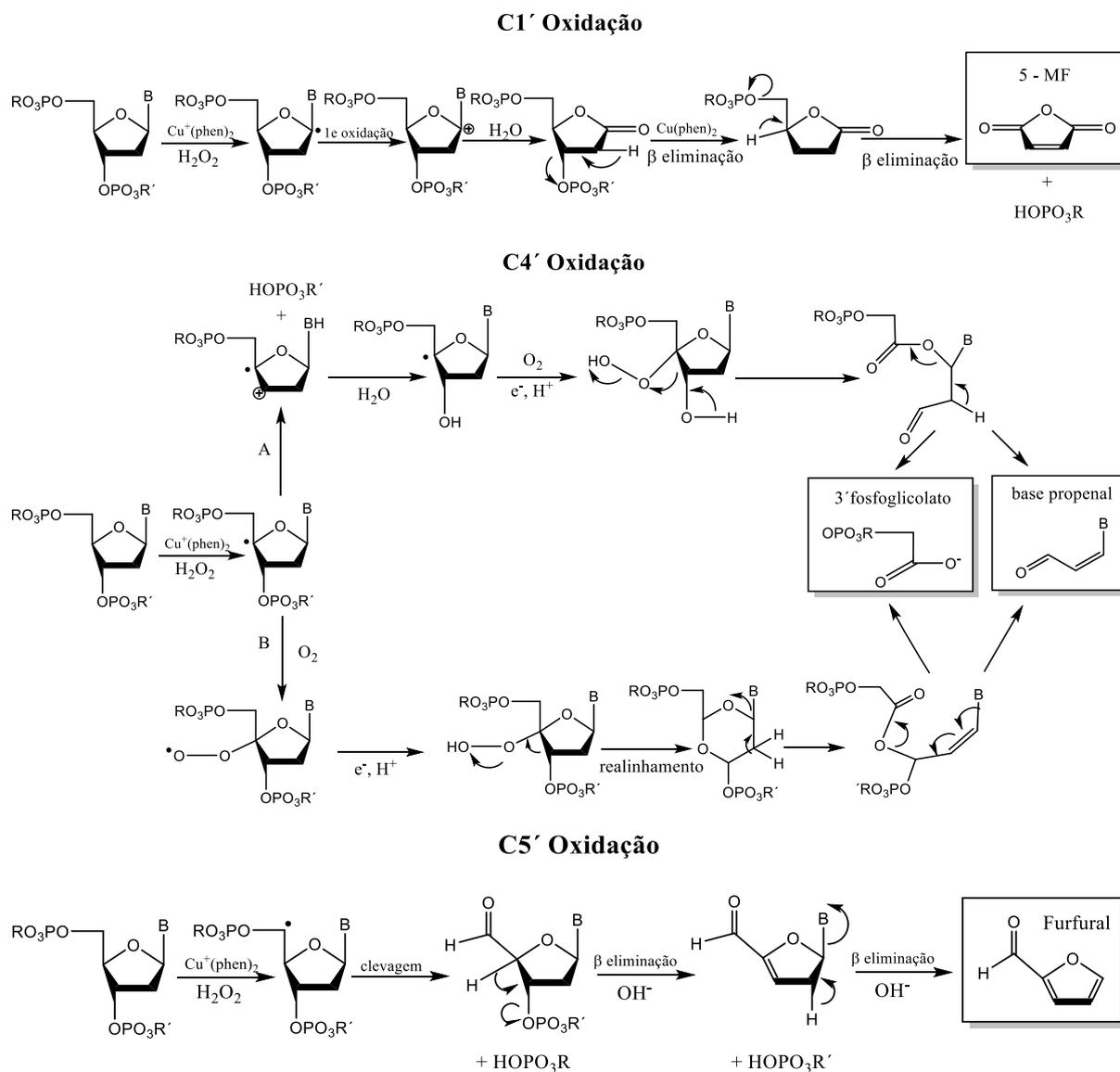
Para superfícies tais como Au(111), a presença de grupos tioéteres, portanto, pode favorecer a formação de SAMs apesar da adsorção de espécies tiois permitir a formação de SAMs mais robustas. Por outro lado, o fragmento tioéter (-SCH₃) pode melhorar o ordenamento³¹ da monocamada, dada a maior mobilidade que este grupo apresenta sobre o eletrodo. Complexos que contêm grupos amino associados a fragmentos aromáticos podem apresentar, ainda, duas possibilidades de adsorção sobre superfícies de grafite³²⁻³⁴ a saber: (i) através do grupo amino ou (ii) por interações π .

Após adsorção é possível, mediante técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica, microbalança de cristal de quartzo (QCM – *Quartz Crystal Microbalance*) e ressonância de plásmons de superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*), determinar a quantidade de moléculas adsorvidas sobre a superfície (Γ). Além disso, as superfícies modificadas podem ser caracterizadas por espectroscopia vibracional Raman (SERS – *Surface-Enhanced Raman Scattering*).

1.3 Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

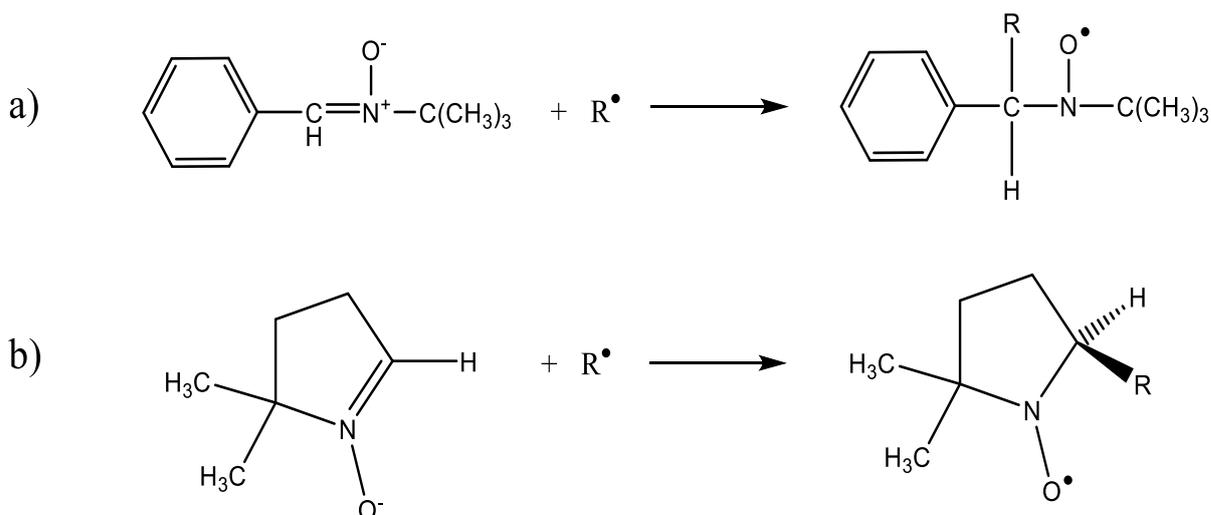
Os radicais livres que causam danos oxidativos^{20,35} ao DNA na desoxirribose nos carbonos C1', C4' e C5' (Figura 6)²³ são chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS). Sabidamente, o desequilíbrio entre as atividades oxidantes e anti-oxidantes em humanos pode conduzir a vários problemas de saúde, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, Alzheimer e Parkinson^{36,37}, entre outras. O mecanismo de ação é atribuído a reações de Fenton e/ou de Haber-Weiss^{38,39}, onde se tem a redução do cobre (II) a cobre (I) com geração subsequente de radicais hidroxil (OH•) e superóxido (O₂^{•-})⁴⁰⁻⁴³ que podem reagir com diferentes macromoléculas tais como ácidos nucleicos, proteínas ou lipídios constituintes da membrana celular, causando dano oxidativo generalizado dentro da célula. Os radicais OH• e O₂^{•-}, entre outros ROS, entretanto, também são conhecidos por atuarem de forma positiva em vários processos fisiológicos que envolvem reações redox e sinalização celular⁴⁵.

Figura 6: Proposta mecanística dos danos oxidativos ao DNA na desoxirribose nos carbonos C1', C4' e C5' devido ao complexo $[Cu^{III}(phen)_2]$ na presença de H_2O_2 gerando 5-MF, 3'-fosfoglicolato e furfural como subprodutos de reação²³.



A detecção de espécies ROS bem como o estudo do mecanismo de formação destas espécies tem sido feita por EPR⁴⁶ (*Electronic Paramagnetic Resonance*) usando a metodologia de captura de spin (*spin trapping*). Os radicais OH^\bullet , $O_2^{\bullet-}$ e OOH^\bullet , por exemplo, são seletivamente detectados por EPR através da formação de adutos com as bases PBN (α -fenil-*t*-butilnitrona) e DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido)⁴⁷ (Figura 7) que resultam em acoplamentos hiperfinos característicos para cada espécie.

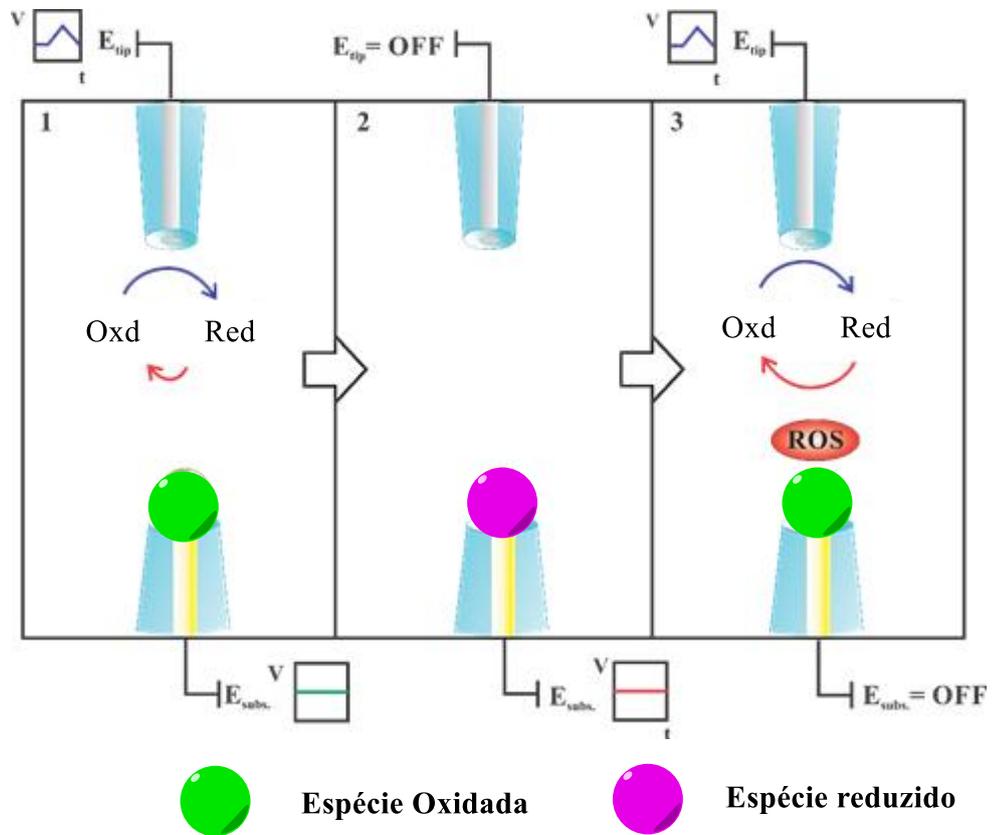
Figura 7: Reação genérica dos “Spin-trap” a) PBN e b) DMPO com espécies radiculares (R^\bullet)



Mais recentemente⁴⁸, a técnica de microscopia de varredura eletroquímica (SECM – *Scanning Electrochemical Microscopy*) tem sido empregada na detecção de espécies ROS, desde que a molécula geradora esteja adsorvida sobre um substrato condutor, usualmente ouro e grafeno. Para este fim, a técnica é utilizada nos modos de interrogação de superfície (SI – *Surface Interrogation*) e de coleta de corrente gerada na tip (SG/TC) usando uma espécie redox no meio, denominada espécie titulante.

De acordo com o mecanismo de operação SI⁴⁹, enquanto o potencial aplicado na tip é constante e suficiente para reduzir as moléculas da espécie titulante, o potencial aplicado ao substrato, a princípio, deve ser tal que permita a formação das espécies ROS. Em seguida, o mesmo é mantido na condição de potencial de circuito aberto (OCP – *Open Circuit Potential*) quando, então, as espécies ROS podem reagir quimicamente com as moléculas reduzidas do titulante que difundiram para a interface do substrato, conforme ilustração esquemática da Figura 8. Assim, as espécies ROS podem não apenas ser identificadas como quantificadas por SECM⁵⁰⁻⁵².

Figura 8: Representação ilustrativa das etapas redox envolvidas nos modos SI-SG/TC de operação SECM.



2. OBJETIVOS

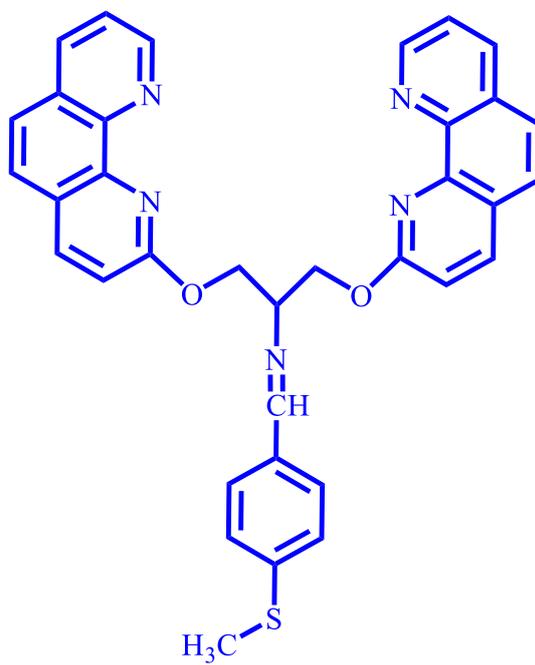
2.1 Objetivo Geral

Sintetizar complexos de cobre com o ligante sulfurado 2CP-Bz-SMe (1,3-bis-1,10-fenantrolin-2-il)oxi)-N-(4-(metiltio)benziliden)propano-2-amina) e estudar a interação com DNA e a geração de espécies ROS em meios heterogêneo e homogêneo.

2.2 Objetivos Específicos

- ✚ Sintetizar e caracterizar o ligante 2CP-Bz-SMe (1,3-bis-1,10-fenantrolin-2-il)oxi)-N-(4-(metiltio)benziliden)propano-2-amina).
- ✚ Sintetizar os complexos $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ e $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]\text{ClO}_4$ a partir da reação entre o ligante 2CP-Bz-SMe (Figura 9) e o correspondente precursor de cobre.
- ✚ Caracterização dos complexos por espectroscopias vibracional e eletrônica nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis), e técnicas eletroquímicas.
- ✚ Estudar a adsorção do complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ sobre superfícies de ouro.
- ✚ Estudar a interação entre o complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ e a molécula de DNA.
- ✚ Estudar a geração de espécies ROS a partir dos processos redox do complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ em solução e adsorvido sobre superfície de ouro.

Figura 9: Estrutura do ligante 2CP-Bz-SMe



3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 Reagentes

Os reagentes usados na sínteses do ligante e dos complexos são de procedência Sigma - Aldrich ou Merck, a saber: 1,10- fenantrolina 99% (Sigma), Metanol e Etanol P.A. (Merck), e 4-metil-tiobenzaldeído (Sigma-Aldrich), POCl₃, PCl₅, (CH₃)₂S e K₃[Fe(CN)₆] (Merck), NaH 60% em óleo mineral (Sigma-Aldrich), DMF (Dimetilformamida) (Sigma-Aldrich), alumina ativa neutra (0,063-0,200 mm, malha de 70-230) (Merck), sódio metálico ACS (Sigma-Aldrich), 2-amino-1,3-propanodiol (Sigma-Aldrich). O precursor de cobre(I), [Cu^I(CH₃CN)₄]ClO₄ foi sintetizado de acordo com o procedimento relatado na literatura⁵³. O ligante e os complexos foram caracterizados mediante RMN para o qual se utilizou C₂D₂Cl₄ de procedência Sigma-Aldrich. Para a formação do complexo cúprico, foi usado o sal Cu(NO₃)₂•3H₂O em acetonitrila (Sigma-Aldrich) não tratada. Para os experimentos de eletroforese foram utilizados os seguintes inibidores de espécies ROS: catalase, D-manitol, superóxido dismutase (SOD) e agarose, todos de procedência Sigma-Aldrich e GelRed (Biotium), e KCl e NaTFA Sigma-Aldrich. Para SECM se utilizou o complexo K₂IrCl₆ e FcMeOH (Alfa-Aesar Ward Hill). Para a preparação da solução tampão fosfato se utilizou K₂HPO₄ e KH₂PO₄, ambos de procedência Sigma-Aldrich. Para eletroquímica em acetonitrila, se utilizou PTBA (perclorato de tetrabutilamônia) de procedência Sigma-Aldrich. Para a determinação da constante de afinidade se utilizou DNA-ct (*calv-thymus*) e brometo de etídio (EB) de procedência Sigma-Aldrich.

3.2 Instrumentação

As medidas de RMN (ressonância magnética nuclear) foram realizadas em um equipamento Bruker Avance 400 operando a 400,13 MHz para ¹H e equipado com uma sonda de banda larga de 5 mm com gradientes de campo em Z. Os espectros do ligante 2CP-Bz-SMe foram obtidos à 25 °C em CDCl₃ em tubos de quartzo de 5 mm de diâmetro.

As medidas de espectroscopia UV-Vis foram realizadas à temperatura ambiente 25 ± 0.2 °C em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico utilizando os espectrofotômetros Hewlett Packard, modelo 8453, e Analytik Jena Specord S-100.

As medidas das absorvâncias foram efetuadas pela leitura direta dos espectros usando-se como branco o respectivo solvente.

A caracterização eletroquímica dos compostos sintetizados foi realizada em um sistema eletroquímico da Bioanalytical System BAS. West Lafayette, modelo Epsilon a 25 ± 0.2 °C. usando uma célula convencional de três eletrodos: carbono vítreo ou ouro como eletrodo de trabalho, Pt e Ag/AgCl (Bas, KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrodos auxiliar e de referência, respectivamente. O eletrodo de trabalho, antes das varreduras de potencial, era submetido a um processo de polimento com alumina. Em seguida, este era lavado exaustivamente com água destilada e colocado em ultrasom por 5 minutos, também em água. O eletrodo de ouro foi eletroquimicamente limpo em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico até obtenção de um voltamograma cíclico consistente com uma superfície limpa. As medidas eletroquímicas foram realizadas em KCl e NaTFA ambos de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Também foram feitas medidas em pH 4, 5 e 6 utilizando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Os valores dos potenciais de meia-onda ($E_{1/2}$) dos complexos sintetizados foram calculados a partir da média dos valores dos potenciais de pico anódico (E_a) e catódico (E_c), $E_{1/2} = (E_a + E_c)/2$. A diferença entre os valores destes potenciais, $\Delta E_p = E_a - E_c$, o módulo da razão entre as correntes de pico anódica (i_a) e catódica (i_c), $|i_a/i_c|$, e a dependência de i_c com a velocidade de varredura ou com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial (i_c vs v ou i_c vs $(v)^{1/2}$), foram determinados a fim de se avaliar o grau de reversibilidade do sistema e o transporte de massa dominante.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos a partir de amostras dispersas em pastilhas de brometo de potássio (KBr), utilizando-se um espectrômetro modelo FTLA 2000-ABB com janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

Os estudos de variação de massa durante o monitoramento do processo de adsorção do complexo de Cu(II) foram feitos por microbalança de cristal de quartzo (QCM – *Quartz Crystal Microbalance*), PM-740 Maxtex, e ressonância de plásmos de superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*), Autolab ESPRIT. Nas medidas de QCM foram utilizados eletrodos comerciais com ouro depositado sobre cristais piezoelétricos de quartzo de corte AT (Standford Research System, 5 MHz Ti/Au

polished) com diâmetro de 24,5 mm. O eletrodo de ouro depositado apresenta áreas geométricas de 1,37 cm² na parte frontal e 0,317 cm² na parte inferior para estes eletrodos. O substrato do SPR têm diâmetro do disco de 25 mm sendo de vidro BK7® com espessura do filme de ouro 48 nm, depositado sobre uma fina camada de titânio.

A condutividade do composto de cobre(II) foi medida nos equipamentos Hanna Instruments CE-215 e DDS-12DW modelo W com controle de temperatura. As medidas, feitas em triplicata, foram realizadas em água e em acetonitrila.

As medidas de SECM (*Scanning electrochemical Microscopy*) foram realizadas em um equipamento CH Instrument Austin Texas modelo 920D. O ultra microeletrodo de Pt (25 µm de diâmetro) e ultra microeletrodo de Au (50 µm de diâmetro) foram fabricados utilizando platina e ouro 99.99%, Goodfellow Corp., Oakdale, PA e capilar Narishige Scientific Instrument Lab, Tokyo, Japan.

Os testes de eletroforese foram feitos em um sistema de eletroforese horizontal (Bio-Rad). Após as medidas, os géis foram corados utilizando GelRed (Biotium) durante 30 minutos e os dados foram revelados em Gel Doc sistema XR + (Bio-Rad).

Os espectros de EPR do complexo [Cu(2CP-BzS-Me)](NO₃)₂ em sólido foram registrados em um equipamento Bruker EMX-1572 operando a banda X (9,0-9,9 GHz) em -140 ± 1 °C. Os parâmetros experimentais usados para aquisição dos espectros de EPR foram: frequência 9.876022 GHz, potência de micro-ondas de 0,638 mW; modulação de amplitude de 10 G; constante de tempo de 40,96 ms e tempo de conversão de 81,92 ms. Para as medidas utilizando "spin traps" foi utilizado um equipamento de EPR Varian E-109 X-Band com cavidade retangular de quartzo Wilmad Glass a 25 °C na Universidade de São Paulo. Para a simulação do espectro foi utilizado o programa Easy Spin com parâmetros para PBN• [g = 2,0063, espessura de linha = 0.149mT, A_N = 1.638mT, A_H = 0.318mT] e OH• [g = 2,0064, espessura de linha = 0.144mT, A_N = 1.553mT, A_H = 0.295mT].

3.3 Procedimentos Sintéticos

3.3.1 Síntese do ligante 2-Cl-1,10-fenantrolina^{54,55}

A reação de metilação da molécula de 1,10-fenantrolina com sulfato de dimetila foi feita em benzeno de acordo com procedimento descrito na literatura. Após a remoção do solvente, o produto foi oxidado com ferricianeto de potássio em uma solução aquosa de hidróxido de sódio para produzir 1-metilfenantrolona. Em seguida, o produto resultante foi aquecido com cloreto de fosforilo e pentacloreto de fósforo. Rendimento: 70%.

3.3.2 Síntese do ligante 2Clip-phen (2CP)¹¹

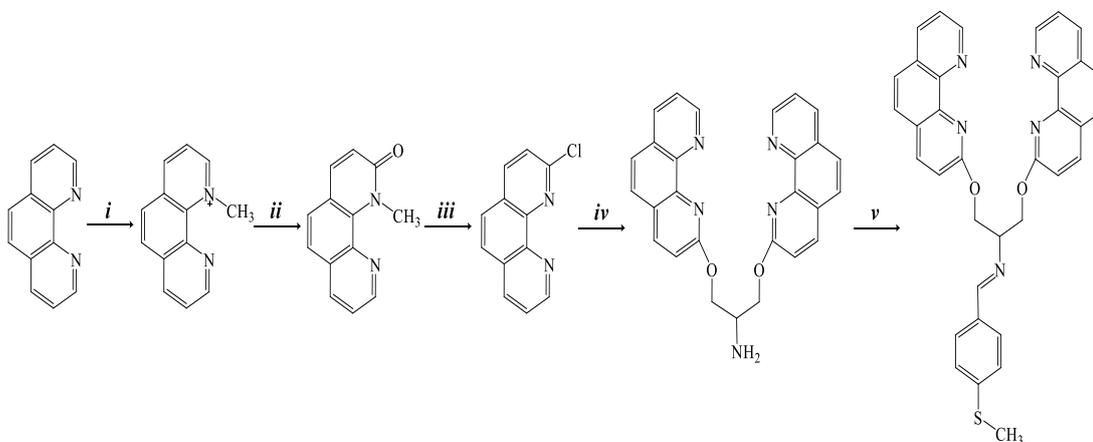
À uma solução de NaH em DMF seco, 2-Cl-1,10-fenantrolina e 2-amino-1,3-propanodiol foram misturados em banho de gelo. A mistura foi agitada durante 24 horas à temperatura ambiente. O produto bruto foi dissolvido em uma mistura de DMF/EtOH 3:1 e precipitado com H₂O. Após filtração, o sólido foi dissolvido em clorofórmio e, em seguida, precipitado com hexano resultando em um pó amarelo, o composto 2Clip-phen (2CP). Rendimento 70%.

3.3.3 Síntese do ligante 2CP-Bz-SMe

À uma solução de MeOH contendo o ligante 2CP, foi adicionado uma quantidade equivalente em moles do composto 4-metiltiobenzaldeído. Após 4 horas de refluxo, a mistura foi rotoevaporada até a secura para a obtenção do produto final. Rendimento: 90 %.

A Figura 10 apresenta um resumo das etapas de síntese para obtenção do composto 2CP-Bz-SMe.

Figura 10: Esquema simplificado da síntese do ligante 2CP-Bz-SMe: **(i)** $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ em C_6H_6 ; **(ii)** $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, NaOH ; **(iii)** PCl_5 em POCl_3 ; **(iv)** Serinol, NaH em DMF ; **(v)** 4-(metiltio)benzaldeído em CH_3OH anidro.



3.3.4 Síntese do complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$

Os reagentes 2CP-Bz-SMe (1 grama, 1,7 mmol) e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (0,324 gramas, 1,7 mmol) dissolvidos em acetonitrila em uma razão estequiométrica de 1:1, foram deixados sob agitação à temperatura ambiente durante 2 horas. Em seguida, a mistura foi rotaevaporada, lavada com água e cromatograficamente purificada em coluna de alumina (condição de eluição: de mistura 10% de $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$). Rendimento: 90%.

3.3.5 Síntese de complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]\text{ClO}_4$

À 50 mL de uma solução de acetonitrila desareada contendo o ligante 2CP-Bz-SMe (1 grama, 1,7 mmol), foram adicionados (gota a gota) 20mL de acetonitrila contendo o complexo de partida $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$ (0,554 gramas, 1,7 mmol). Após 2 horas sob agitação em atmosfera inerte de N_2 , a mistura foi rotaevaporada até a secura e purificada com coluna cromatográfica de gel de sílica (eluição com cloreto de metileno). Rendimento: 80%. A síntese deste composto foi realizada no Laboratório de Química Inorgânica, da “*Facultad de Química y Biología*” da “*Universidad de Santiago de Chile*”.

3.4 Procedimentos e Técnicas experimentais

3.4.1 Preparação do DNA

Foi preparada 5 mL de solução de DNA-ct (ct - *Calf- Thymus*) em 2 mmol L⁻¹ de tampão de fosfato (PBS – *Phosphate Buffer Solution*), pH 7,4. Após 20 minutos a 80°C em banho de água termostaticado, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e, em seguida, foi determinada a concentração do DNA por espectroscopia UV-Vis utilizando a absorvância em 260 nm e o coeficiente de extinção molar relatado de 6600 Lmol⁻¹cm⁻¹. A banda em 280 nm corresponde a impurezas de origem proteico, por ém, se estabelece a razão entre a Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ é 1,95, confirmando a ausência de proteínas e nucleases no DNA-ct. A concentração molar do DNA-ct foi considerado em pares de bases [pb].

3.4.2 Obtenção da constante de afinidade (K_b)

Uma solução 2x10⁻⁵ mol L⁻¹ do íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺ em PBS 2 mmol L⁻¹ e pH 7,4, foi titulada com DNA preparado em PBS 2 mmol L⁻¹ pH 7,4. As variações de absorvância em bandas associadas à transições intraligantes foram registradas e corrigidos pela absorvância de DNA em 260 nm. Valores de absorção relativos à formação do complexo foram aplicados a Equação 17 (Resultados e Discussão secção 4.3.1), para a determinação da constante de afinidade (K_b).

3.4.3 Estudo de intercalação com brometo de etidio (EB)

A 2 mL de uma solução de DNA e brometo de etidio (EB) na proporção 1:1 de concentração 4 µmol L⁻¹ em PBS 2 mmol L⁻¹ pH 7,4 foram adicionadas alíquotas de 400 µL de uma solução 2x10⁻⁵ mol L⁻¹ do íon complexo [Cu(2CPBzSMe)]²⁺ PBS 2 mmol L⁻¹ pH 7,4. As variações na intensidade de emissão do aduto de DNA-EB e os valores de emissão foram aplicados na Equação 19 (Resultados e Discussão secção 4.3.2) para a determinação da constante de K_{sv}.

3.4.4 Estudo de geração de radicais por SECM

O substrato de ouro foi modificado por imersão (1 hora) em solução aquosa 5 mmol L⁻¹ do íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺. Foi utilizado o método de interrogação de superfície (SI - *surface interrogation*) em conjunto com o método de geração em superfície e coleta na sonda (SG/TC – *Surface Generation Tip Collection*) sendo utilizado o mediador eletroquímico [IrCl₆]²⁻ (E⁰, Ir^{IV/III} = 0.87V vs Ag/AgCl). Dessa forma foi aplicado um potencial de -0,2 V no substrato de ouro previamente modificado a fim de reduzir o complexo, favorecendo a formação da espécie [Cu(2CP-Bz-SMe)]⁺. Após da redução, o sistema foi deixado a potencial de circuito aberto (OCP) e, então, foram registradas as correntes geradas pelo sistema devido a formação de espécies no substrato capaz de oxidar o mediador previamente reduzido na Tip.

3.4.5 Estudo de geração de espécies ROS por EPR

O íon complexo [Cu(2CPBzSMe)]²⁺ possui a capacidade de gerar espécies radicais de oxigênio que podem ser detectadas utilizando EPR (*Electronic Paramagnetic Resonance*). Para facilitar a detecção das espécies ROS geradas foi utilizado um “spin trap” chamado PBN (N-terc-butil- α -fenilnitrona) que tem um tempo de vida longo para poder detectar o aduto formado com a espécie radicalar de oxigênio. Em uma solução contendo o PBN, o complexo de Cu(II) foi reduzido a Cu(I) pela adição de uma solução de H₂O₂. O experimento foi feito em solução aerada e parcialmente desareada.

3.4.6 Ensaio de clivagem com o plasmídeo pBR322

As reações usando o plasmídeo pBR322 super-enovelado foram realizadas em tampão fosfato de sódio 20 μ L de 10 mmol L⁻¹ pH 7,4. Em todas as reações, as concentrações do DNA e do composto [Cu(2CP-Bz-SMe)](NO₃)₂ foram mantidas constantes, 5 ng/mL e 10 μ mol L⁻¹ respectivamente. Uma reação de controle foi realizada contendo apenas o plasmídeo de DNA e o tampão nas mesmas condições experimentais. Nas reações contendo ácido ascórbico, a concentração final deste composto foi de 30 μ mol L⁻¹. Para investigar a natureza das espécies ROS foram

utilizados os seguintes sequestradores de espécies radicais (scavenger) catalase, D-manitol e superóxido dismutase (SOD) com concentrações de 100 µg/mL, 50 mmol L⁻¹ e 100 µg/ml, que reagem respectivamente, com H₂O₂, OH•, O₂•⁻, protegendo o plasmídeo pBR322. Após incubação durante 30 min, as amostras foram imediatamente aplicadas em gel de 0,8% de agarose em TEA pH 7,4 e realizada a eletroforese a voltagem constante de 70 mV.

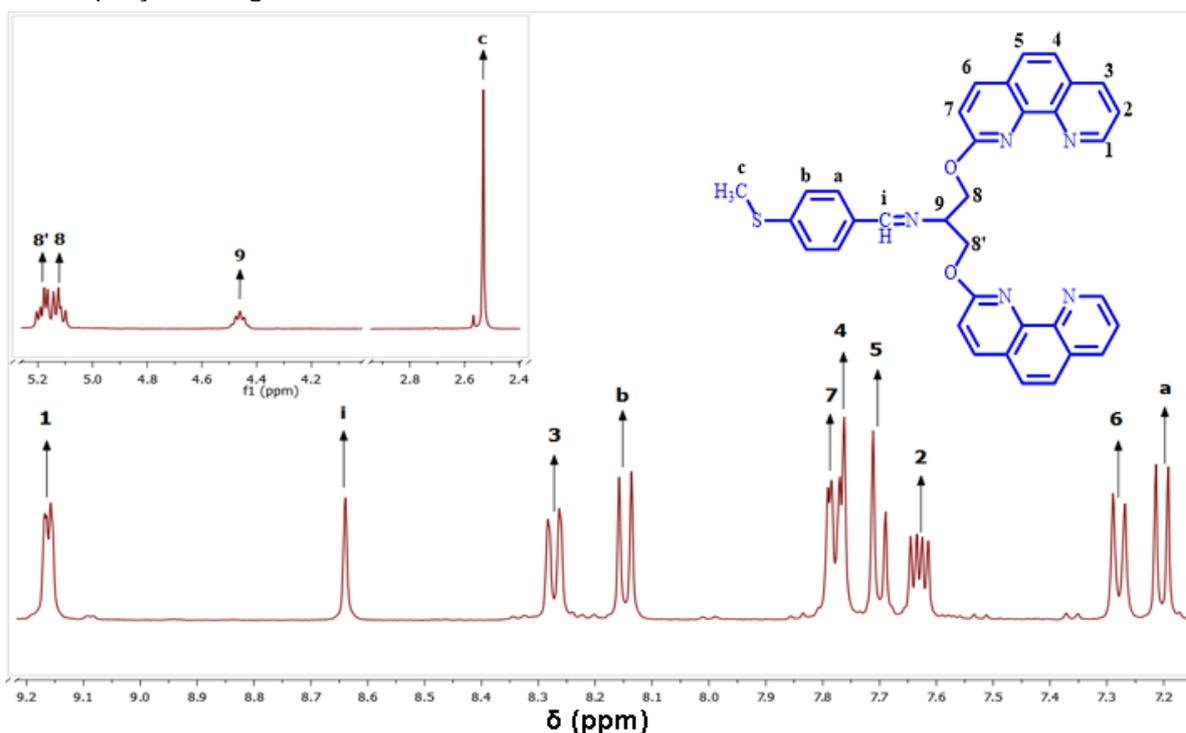
4 RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1 Caracterizações estruturais dos compostos

4.1.1 Caracterização do ligante 2CP-Bz-SMe

O espectro ^1H -RMN em CDCl_3 do ligante 2CP-Bz-SMe encontra-se ilustrado na Figura 11. Os deslocamentos químicos característicos de hidrogênio ligado a carbono sp^2 de aromático são comumente observados⁵⁶ na faixa de 9,2 a 7,0 ppm. Assim, os deslocamentos observados em 9,18 (d, 2H), 7,63 (dd, 2H), 8,28 (d, 2H), 7,75 (dAX, 2H), 7,70 (dAX 2H), 7,28 (d, 2H) e 7,78 (d, 2H) (d: duplete; dd: duplo duplete; dAX: duplete com efeito telhado; s: singlete; m: multiplete) foram atribuídos aos hidrogênios do anel fenantrolínico enquanto aqueles observados em 7,2 (d, 2H), e 8,15 (d, 2H) foram atribuídos ao anel benzênico. O próton da ligação imina foi observado em 8,64 (s, 1H). Na região de hidrogênio ligado a carbono alifático foram observados deslocamentos correspondentes à cadeia propílica fenantrolínica em 5,15 (m, 2H), 5,19 (m, 2H) e 4,45 (q, 1H). O sinal atribuído ao grupo metila foi observado em 2,52 (s, 3H).

Figura 11: Espectro ^1H -RMN do ligante 2CP-Bz-SMe em equipamento de 400 MHz. Espectro inserido com ampliação de região de alifático.



4.1.2 Caracterização dos complexos $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]\text{ClO}_4$ e $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$

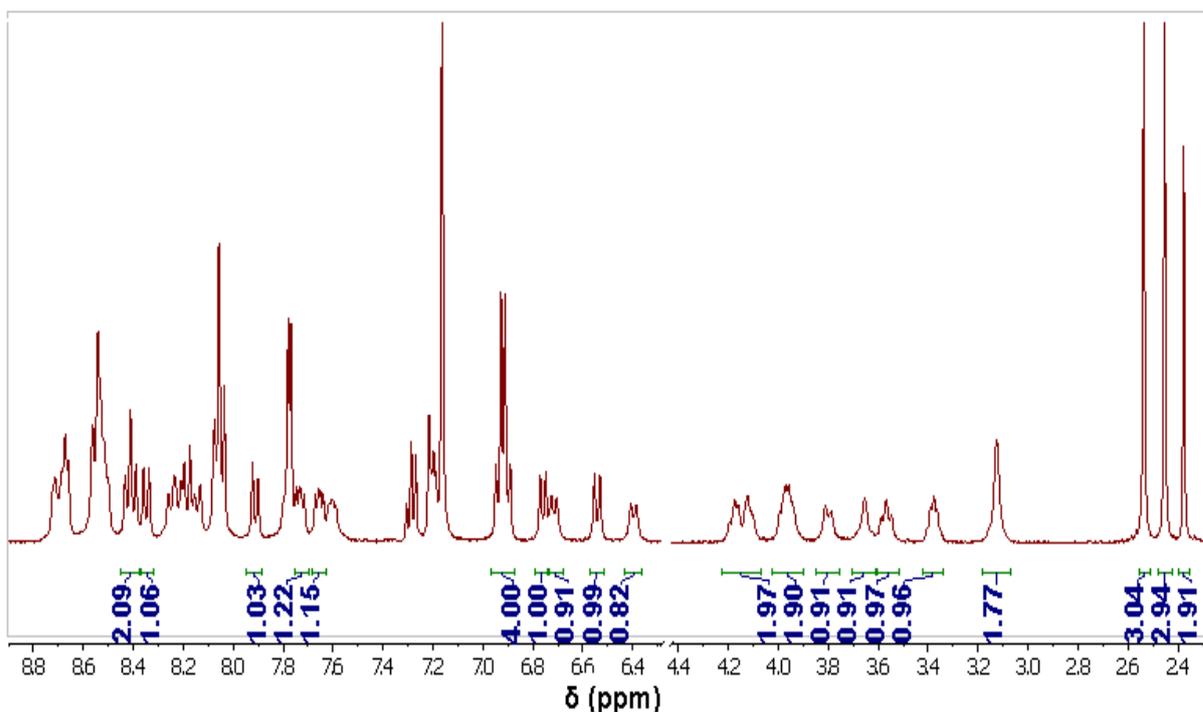
É conhecido que os sistemas de cobre (I) reagem muito rapidamente com o oxigênio, sendo esta uma propriedade favorável para a geração de espécies ROS. Essa instabilidade em relação a sua rápida oxidação, porém, complica muito a caracterização deste composto, já que quase sempre ele vai ter traços de Cu(II) o que torna quase impossível a obtenção de um espectro $^1\text{H-RMN}$. Para a obtenção do espectro deste composto foi necessário desarear o solvente deuterado ($\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$) e manter um meio redutor adicionando hidrazina (N_2H_4). Posteriormente, a solução contida no tubo de RMN foi congelada com nitrogênio líquido, e foi feito vácuo para retirar oxigênio da solução.

O complexo $[\text{Cu}(\text{2CPBzSMe})](\text{NO}_3)_2$ foi caracterizado por EPR, espectroscopias UV-Vis e vibracional Raman e na região do infravermelho, condutimetria e eletroquímica. Por fim, um estudo de condutimetria foi conduzido para estudar a composição da amostra.

4.1.2.1 Ressonância magnética nuclear protônica $^1\text{H-RMN}$

O espectro de $^1\text{H-RMN}$ do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$, ilustrado na Figura 12, apresenta um padrão duplo que é atribuído ao equilíbrio entre o complexo monometálico e espécies bimetálicas⁷ de $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]_2^{2+}$ em solução, dada a natureza tetracoordenante do ligante bis-fenantrolínico, conforme já reportado para sistemas similares.

Figura 12: Espectro ^1H -RMN do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$ em $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$. Equipamento: 400 MHz.

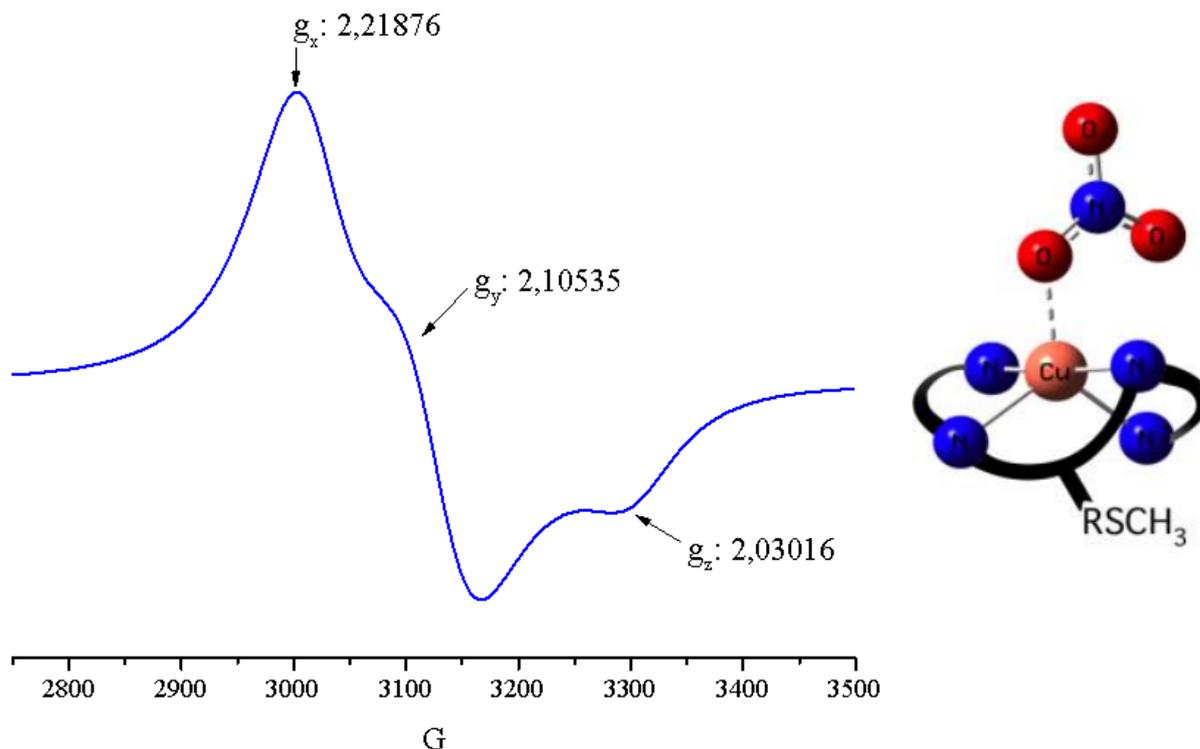


O espectro ^1H -RMN do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$ mostra um padrão complexo de sinais devido, possivelmente, a presença de Cu^{II} oriundos da rápida oxidação do complexo cuproso em solução (baixa resolução de sinais). Apesar disso, é possível obter informações a partir da análise do espectro. Na região de hidrogênio alifático (3,3-3,7 ppm) e aromático (7,6-7,8 ppm), por exemplo, os prótons parecem ter um comportamento diastereotópico o que seria atribuído à formação de um complexo bimetalico helicoidal e justificaria o número excessivo de sinais observados no espectro. O número de espécies em solução pode ser estimado pelos sinais singletes correspondentes aos prótons $\text{CH}_3\text{-S-}$ na região de 2,4 a 2,6 ppm. Esta informação sugere que, após a dissolução do complexo de $\text{Cu}(\text{I})$, há um equilíbrio entre as espécies bimetalica e monometalica, reforçando a sugestão anterior.

4.1.2.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A configuração eletrônica paramagnética de compostos de $\text{Cu}(\text{II})$, d^9 , impossibilita a utilização da técnica de RMN, mas torna possível a aquisição de espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR). A Figura 13 ilustra e esquematiza o espectro EPR do complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ no estado sólido.

Figura 13: Espectro EPR policristalino do complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$

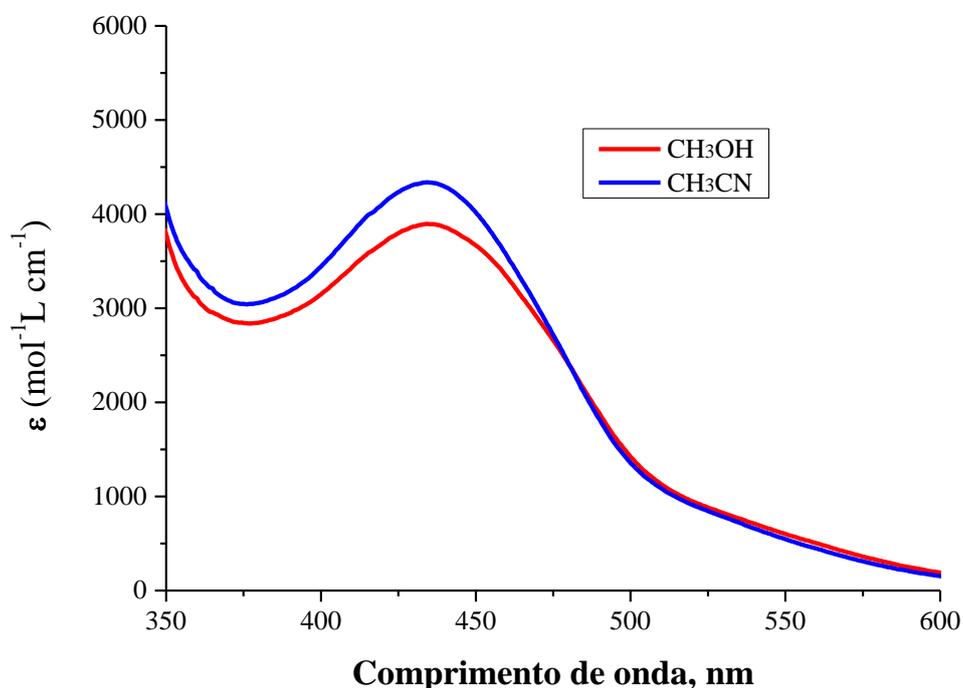


Os valores de g_x , g_y e g_z utilizados para obter o parâmetro R , onde $R = (g_y - g_z)/(g_x - g_y)$ é maior que 1 ($R = 1,37$), o que significa que o orbital d_{z^2} tem a maior contribuição no orbital HOMO que está composto por uma combinação linear de orbitais d_{z^2} e $d_{x^2-y^2}$, o que sugere uma geometria intermediária entre bipirâmide trigonal e pirâmide quadrada. Tendo em consideração a estrutura do ligante 2CP-Bz-SMe, sugere-se que a geometria do complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ é semelhante a uma bipirâmide trigonal⁵⁷ distorcida onde uma unidade de fenantrolina do ligante está em posição equatorial e a outra axial referente ao átomo de cobre e a quinta posição de coordenação⁵⁸⁻⁶³ é ocupada por um NO_3^- .

4.1.2.3 Espectroscopia eletrônica nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis)

As Figuras 14 e 15 apresentam os espectros UV-Vis dos íons complexos $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$ e $[\text{Cu}(\text{2CPBzSMe})]^{2+}$ em acetonitrila e metanol.

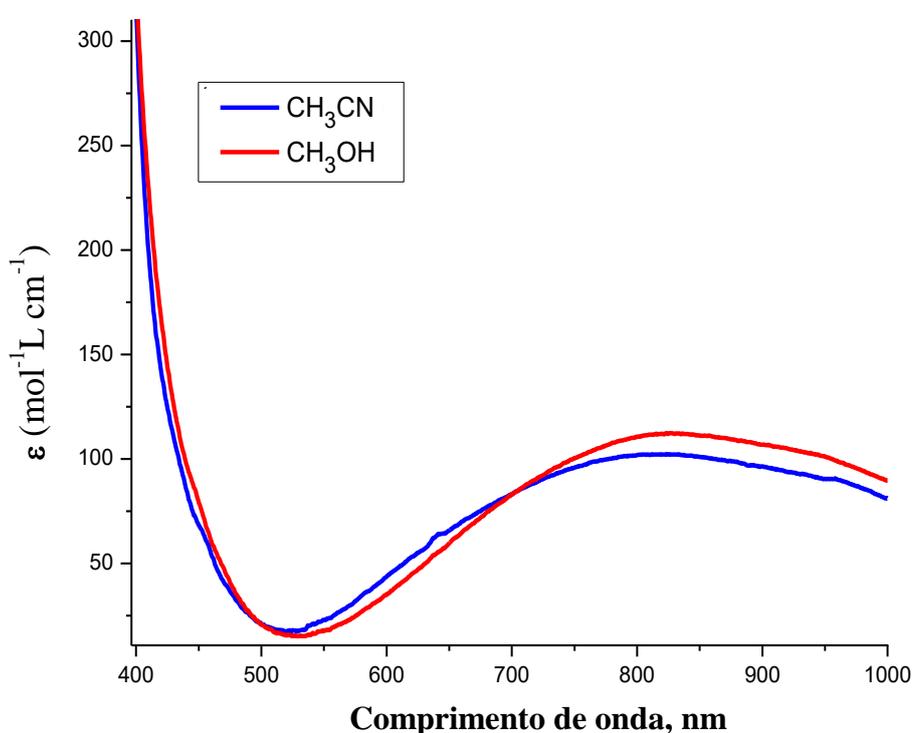
Figura 14: Espectro eletrônico do ion complexo $[\text{Cu}(\text{2CPBzSMe})]^+$ em acetonitrila (azul) e metanol (vermelho).



A banda observada em 434 nm é atribuída à transições de transferência de carga do tipo metal ligante⁹ (MLCT – *Metal-to-Ligand Charge-Transfer*). Os espectros apresentaram valores de coeficiente de absorção molar para o estado de oxidação +1 ($\epsilon = 4337 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ em acetonitrila, momento de dipolo ($D = 3,84$) e $\epsilon = 3895 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ em metanol, momento de dipolo ($D = 1,69$)). Este composto não apresenta o solvatocromismo esperado para transições de transferência de carga. Este comportamento pode ser explicado devido a estrutura tetraédrico distorcida apresentada, fato que gera que o momento dipolar do composto seja muito baixo, sendo percebido como ausência do solvatocromismo, já que este efeito depende da polaridade do composto assim como a do solvente, onde solventes mais polares vão deslocar a MLCT para o azul⁶⁴. Espera-se que as espécies de cobre (I) (d^{10}) apresentem três transições de carga⁶⁵. No sistema em estudo, apenas uma banda com máximo em 434 nm foi observada. Esta absorção, todavia, apresenta-se bastante larga ($\Delta\lambda = 150 \text{ nm}$) podendo compreender as distintas transições normalmente observadas em compostos de Cu(I) com ligantes fenantrolínicos.^{65,66}

Para o complexo $[\text{Cu}(\text{2CPBzSMe})](\text{NO}_3)_2$ foi observada por espectroscopia eletrônica UV-Vis em dois solventes, acetonitrila e metanol, observando-se uma banda do tipo d-d com máximo em 824 nm, como ilustrado na Figura 15. As bandas possuem baixa intensidade em ambos os solventes, provavelmente por se tratar de uma transição d-d ($\epsilon = 115 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ para metanol e $\epsilon = 99 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ para acetonitrila) que são proibidas por Laporte.⁶⁷

Figura 15: Espectros UV-Vis do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ em acetonitrila (azul) e metanol (vermelho). Concentração: $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

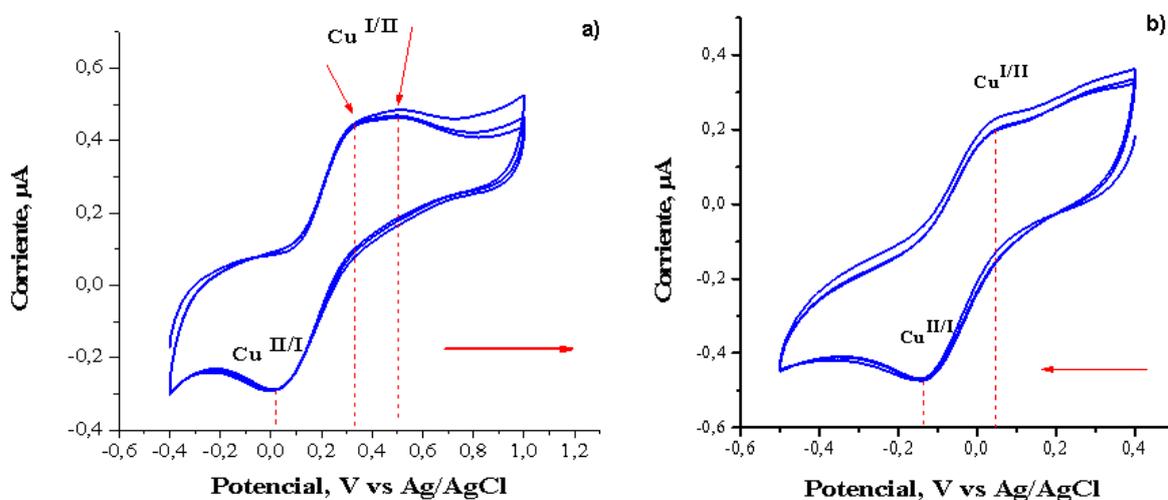


Pode-se observar, também, uma segunda absorção em 950 nm, possivelmente devido a uma distorção tetragonal, tal como previsto pelo teorema de Jahn-Teller, uma vez que íons Cu^{II} apresentam uma assimetria de configuração eletrônica nos orbitais e_g .

4.1.2.4 Caracterização eletroquímica

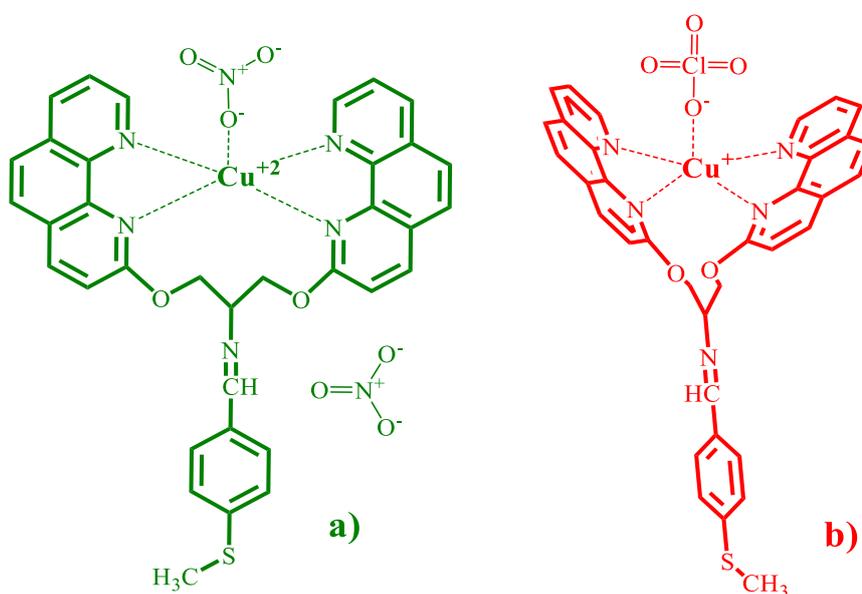
Os estudos eletroquímicos dos íons complexos $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$ e $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ foram realizados por voltametria cíclica e encontram-se ilustrados na Figura 16.

Figura 16: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de platina a 100 mV s^{-1} em acetonitrila contendo PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e os íons complexos a) $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$ e b) $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$. Como eletrodos auxiliar e de referência, foram usados fio de prata e Ag/AgCl respectivamente.



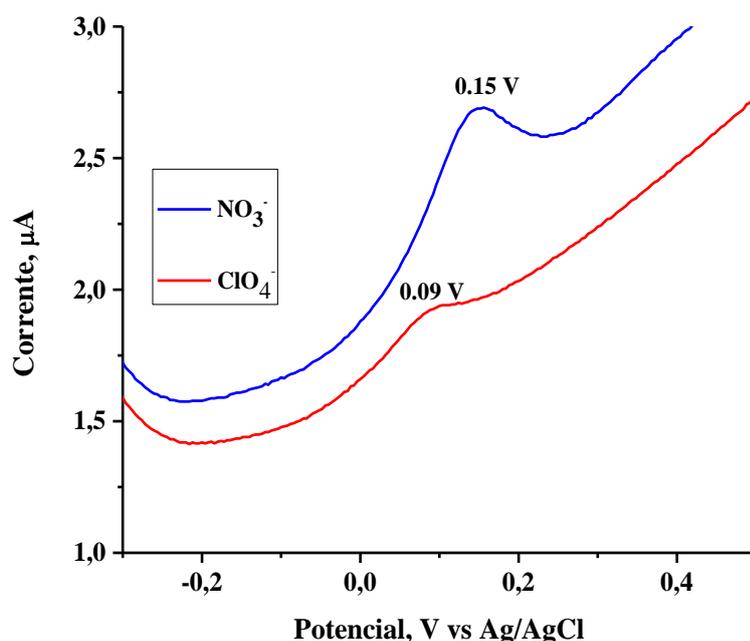
De fato, as curvas voltamétricas dos íons complexos $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$ em acetonitrila (Figura 16) apresentam valores de $E_{1/2}$ consideravelmente diferentes. Considerando que a esfera de coordenação em ambos os complexos são iguais, esperar-se-ia o mesmo perfil voltamétrico. A observação de curvas voltamétricas distintas sugere a atribuição de coordenação dos íons NO_3^- e ClO_4^- ao centro metálico de cobre (Figura 17) nos íons complexos $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$, respectivamente.

Figura 17: Estrutura dos complexos a) $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ e b) $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]\text{ClO}_4$.



Dado a capacidade de coordenação de um quinto ligante no complexo de Cu(II), foi realizado um estudo eletroquímico de onda quadrada em diferentes eletrólitos suporte, tal como se apresenta na Figura 18. Se observou diferentes valores de potencial de meia onda para os processos.

Figure 18: Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de ouro em solução de KClO₄ e KNO₃ 0.1 mol L⁻¹ contendo o íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺.



Os ciclo voltamogramas obtidos para o íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺ nos diferentes solventes apresentaram um perfil característico de processo *quasi-reversível* com valores de diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p) superiores a 150 mV. Além disso, outro parâmetro eletroquímico a considerar é a razão entre as correntes de pico anódica (i_{pa}) e catódica (i_{pc}).

Os valores de potencial de meia-onda ($E_{1/2}$) atribuídos ao processo redox Cu^{III/II} do íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺ foram observados em -0,045 e 0,13 V em acetonitrila e KCl, respectivamente. De acordo com a literatura, complexos de Cu(II) contendo ligantes derivados de fenantrolina costumam apresentar estrutura bipirâmide trigonal distorcida ou pirâmide de base quadrada tendo moléculas do solvente como quinto ligante. A dependência dos valores de $E_{1/2}$ com o meio eletrolítico, de fato, reforça esta observação. Foi realizado uma voltametria de onda quadrada do complexo em KNO₃ e KClO₄ 0,1 mol L⁻¹ obtendo valores de 0,15 e 0,09

V vs Ag/AgCl respectivamente (Figura 18), esta observação reforça a sugestão da coordenação de um quinto ligante¹⁹ no complexo, onde o íon NO_3^- gera uma forma pentacoordinada^{11,68} do complexo mais estável que o íon ClO_4^- .

A redução do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ (0.13 V vs Ag/AgCl) é facilitada em comparação aos íons complexos $[\text{Cu}(\text{Clip-Phen})]^{2+}$ ($E_{1/2} = 0.085$ V vs Ag/AgCl) e $[\text{Cu}(\text{Phen})_2]^{2+}$ ($E_{1/2} = -0.056$ V vs Ag/AgCl) considerando o mesmo meio (KCl 0,1 mol L⁻¹). Em todas as soluções eletrolíticas pode se observar um comportamento de *quase-reversibilidade* com diferenças entre os potenciais de picos catódicos e anódicos de 190 mV.

No voltamograma ilustrado (Figura 16, Quadro a), é possível observar dois processos de oxidação centrados em 330 e 500 mV, enquanto apenas uma onda de redução é vista em 18 mV. Os dois processos oxidativos são atribuídos à oxidação de duas espécies de Cu(I) resultantes do equilíbrio entre os compostos bimetálico e monometálico em solução. Resultados semelhantes têm sido reportado para compostos similares e helicoidais de Cu(I) em solução⁷. Este resultado é consistente com o perfil de padrão duplo observado no espectro de ¹H-RMN (Figura 12).

Os experimentos obtidos em meio aquoso para o complexo de Cu(I), em menores velocidades de varredura que a apresentada na Figura 16, quadro b, sugerem um processo de dois elétrons para a onda de oxidação. A fim de verificar esta hipótese, foram obtidos voltamogramas em diferentes valores de pH. A Figura 19 ilustra os voltamogramas de onda quadrada obtidos em PBS nos valores de pH de 4, 5 e 6.

Figure 19: Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de ouro em solução de PBS 0.1 mol L⁻¹ de diferentes valores de pH contendo o íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺. Velocidade de varredura 375 mVs⁻¹.

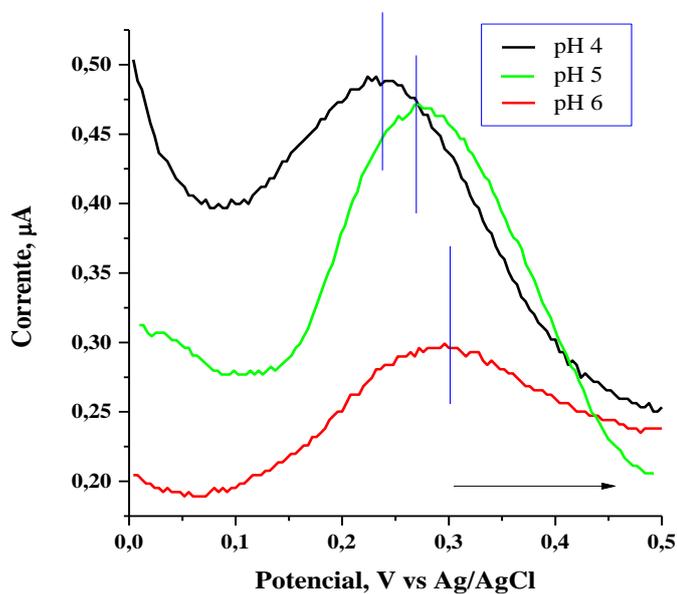
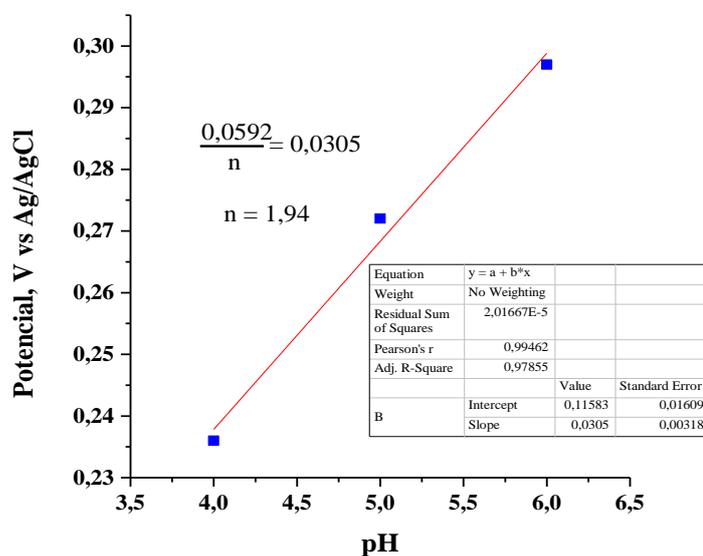


Figure 20: Representação gráfica de E versus pH para o íon complexo [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺.



Utilizando a dedução a partir da Equação 4, pode-se determinar o número de elétrons envolvidos no processo.



$$E = E^0 - \frac{0,0592}{n} \log Q \quad (\text{Eq.5})$$

$$Q = \frac{[\text{Cu}^+]}{[\text{Cu}^{2+}][\text{H}^+]} \quad (\text{Eq.6})$$

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{n} \log \frac{[\text{Cu}^+]}{[\text{Cu}^{2+}][\text{H}^+]} \quad (\text{Eq.7})$$

Como as concentrações de Cu(I) e Cu(II) são iguais, segue;

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{n} \log \frac{1}{[\text{H}^+]} \quad (\text{Eq.8})$$

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{n} \log 1 + \frac{0,0592}{n} \log [\text{H}^+] \quad (\text{Eq.9})$$

$$E = E^0 + \frac{0,0592}{n} \log [\text{H}^+] \quad (\text{Eq.10})$$

Como o $\log[\text{H}^+]$ é o pH, tem-se então:

$$E = E^0 + \frac{0,0592}{n} \text{pH} \quad (\text{Eq.11})$$

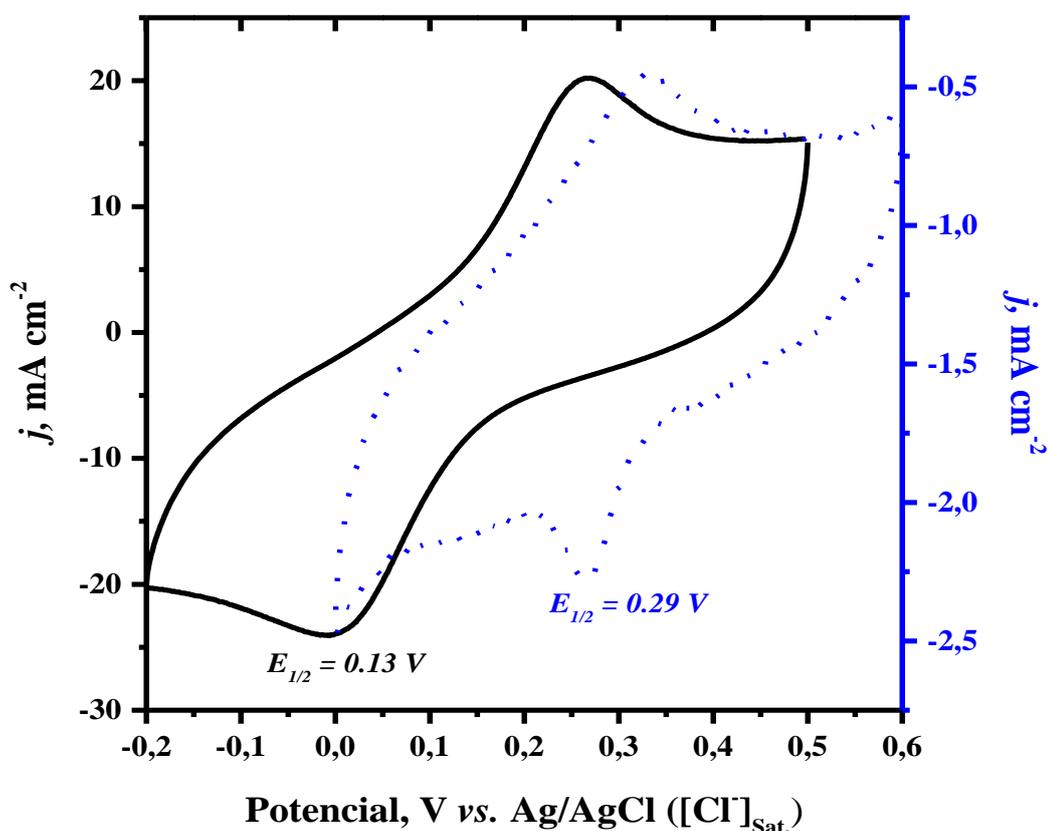
Onde o valor da inclinação da curva ilustrada no gráfico de E versus pH corresponde a $0,0592/n$, sendo n o número de elétrons envolvidos na reação de eletrodo. O valor 1,94 elétrons encontrado para o complexo de cobre a partir da inclinação da curva é consistente para um processo de 2 elétrons confirmando, portanto, a sugestão discutida anteriormente e reforçando os resultados de $^1\text{H-RMN}$ e eletroquímica obtidos para o complexo de Cu (I). Possivelmente esta espécie bimetalica corresponde a um dímero formado por uma ponte de oxigênio entre os centros metálicos de cobre, conforme representação ilustrada na Figura 21 simulando sítios ativos de enzimas mono oxigenasse.⁶⁹⁻⁷²

qual é razoável admitir a mistura de compostos com diferentes moléculas na esfera de coordenação, $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)$ e $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$. Fato que pode-se observar ao comparar os voltamogramas de ambos os complexos em acetonitrila, Figura 21.

4.2 Caracterização eletroquímica do eletrodo de ouro modificado com o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$

A Figura 22 ilustra o ciclo voltamograma do eletrodo de ouro modificado com o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ (linha azul pontilhada) obtido em solução de KCl sem complexo em solução. Para efeitos de comparação, a Figura 22 ilustra, também, o ciclo voltamograma em solução contendo o complexo.

Figura 22: Voltamograma cíclico a 50 mV s^{-1} (linha sólida preta) do eletrodo de ouro em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$. Voltamograma cíclico a 10 mV s^{-1} (linha pontilhada azul) em eletrodo de ouro em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após 1h de imersão em uma solução $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$.



A observação das ondas de oxidação e redução atribuídas ao centro metálico de cobre na curva voltamétrica obtida após modificação (linha azul pontilhada) e em solução sem complexo indica que o composto encontra-se, efetivamente, adsorvido sobre o eletrodo. Comparativamente ao complexo em solução, o valor de $E_{1/2}$ após adsorção apresenta um deslocamento positivo de 0,13 para 0,29V indicando uma maior estabilização do complexo no estado reduzido. Adicionalmente, a onda de oxidação do voltamograma obtido após adsorção não é consistente com um processo de dois elétrons sugerindo que a dimerização não ocorre nestas condições. A quantidade de composto adsorvido ($\Gamma = 5,1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$) foi calculada a partir da integração da área sob a onda de redução, de acordo com a Equação 12:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (\text{Eq. 12})$$

onde Q é a carga relativa ao processo redox, A é a área do eletrodo, n é o número de elétrons envolvidos na reação de eletrodo e F é a constante do Faraday.

4.3 Espectroscopia vibracional

A Figura 23 apresenta os espectros vibracionais na região do infravermelho e Raman, respectivamente, do complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ no estado sólido.

A Tabela 2 apresenta as vibrações mais relevantes e suas respectivas atribuições.⁷⁴⁻⁷⁶

Figura 23: Espectro vibracionais raman (verde) e na região do infravermelho(azul) do composto $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ disperso em sólido.

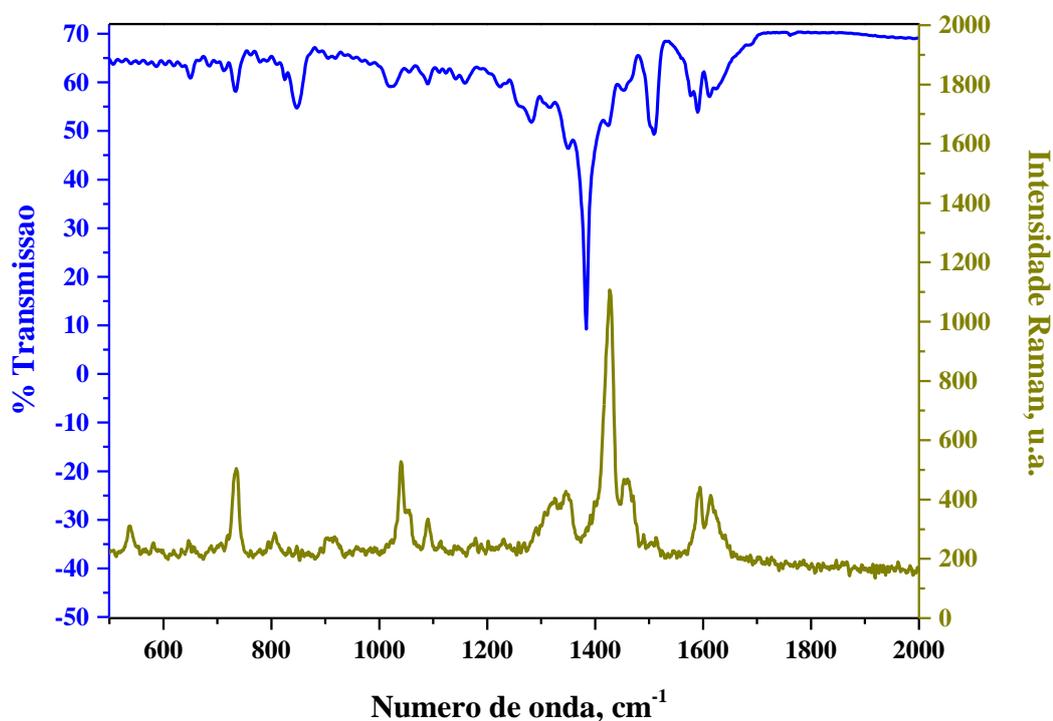


Tabela 2: Tabela de atribuição de sinais dos modos vibracionais do espectro Raman e Infravermelho para o complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$

Número de onda (cm^{-1})	Infravermelho		Raman	
	Intensidade	Atribuição	Intensidade	Atribuição
738	Fraca	$\nu = \text{C-S}$	Média	$\nu = \text{C-S}$
804	Muito fraca	$\delta = \text{C-S-C}$	Fraca	$\delta = \text{C-S-C}$
850	Fraca	$\nu = \text{C-H}$	Muito fraca	$\nu = \text{C-H}$
1043	Fraca	$\nu = \text{C-N}$	Média	$\nu = \text{C-N}$
1324	Fraca	$\nu = \text{C-C}$	Média	$\nu = \text{C-C}$
1344	Fraca	$\nu = \text{C-C}$	Média	$\nu = \text{C-C}$
1383	Intensa	$\nu = \text{N=O}$	Muito fraca	$\nu = \text{N=O}$
1427	Fraca	$\nu = \text{C-C}$	Forte	$\nu = \text{C-C}$
1464	Fraca	$\nu = \text{C-H}$	Média	$\nu = \text{C-H}$
1513	Media	$\nu = \text{C-N}$	Muito fraca	$\nu = \text{C-N}$
1596	Media	$\nu = \text{C=N}$	Média	$\nu = \text{C=N}$
1612	Media	$\nu = \text{C=C}$	Média	$\nu = \text{C=C}$

Os espectros vibracionais do composto $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ são dominados pelos modos vibracionais do ligante 2CP-Bz-SMe.

A região no espectro vibracional na região do infravermelho ressalta as vibrações atribuídas aos modos de estiramento da ligação C=C em 1612 cm^{-1} e 1596 cm^{-1} para a ligação C=N, além do modo de estiramento simétrico atribuído a ligação N=O do contra íon, em 1383 cm^{-1} . Os sinais observados em 738 e 804 cm^{-1} correspondem as vibrações do C-S (metila terminal) e a deformação $\delta = \text{C-S-C}$ (grupo tioéter) respectivamente. Estas sinais podem ser observadas também no espectro Raman com uma intensidade media para a vibração C-S e fraca para a vibração C-S-C. Se observa que em 1383 cm^{-1} a sinal correspondente a N-O em infravermelho não é observada no Raman. Os sinais compreendidas entre 1043 cm^{-1} e 1612 cm^{-1} correspondem as vibrações para os átomos dos anéis fenantrolínicos e benzênicos que tem o ligante.

4.4 Estudo da adsorção do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ sobre ouro

As superfícies de ouro foram modificadas através da imersão das mesmas por 1 hora em solução aquosa contendo o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$). As Figuras 24 e 25 apresentam, respectivamente, os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades e o gráfico de corrente catódica vs velocidade de varredura de potencial para o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ adsorvido sobre ouro.

Figura 24: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro modificado com o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura. Pt e Ag/AgCl foram usados como eletrodos auxiliar e de referência, respectivamente.

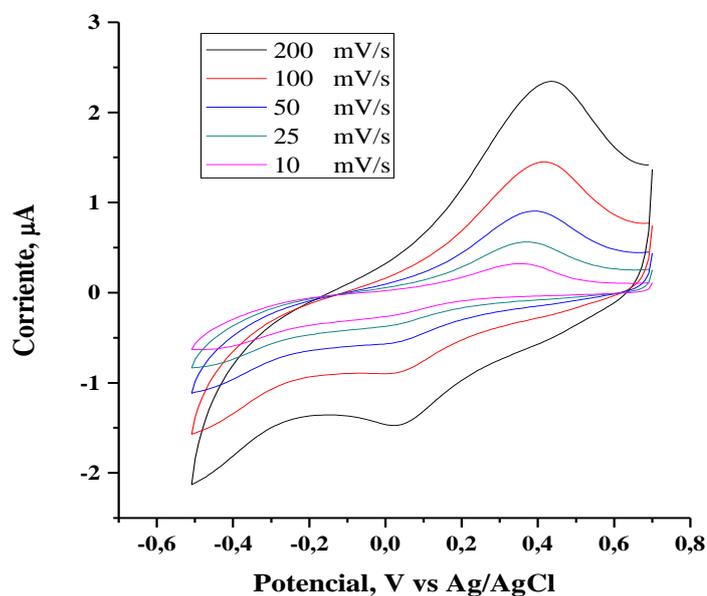
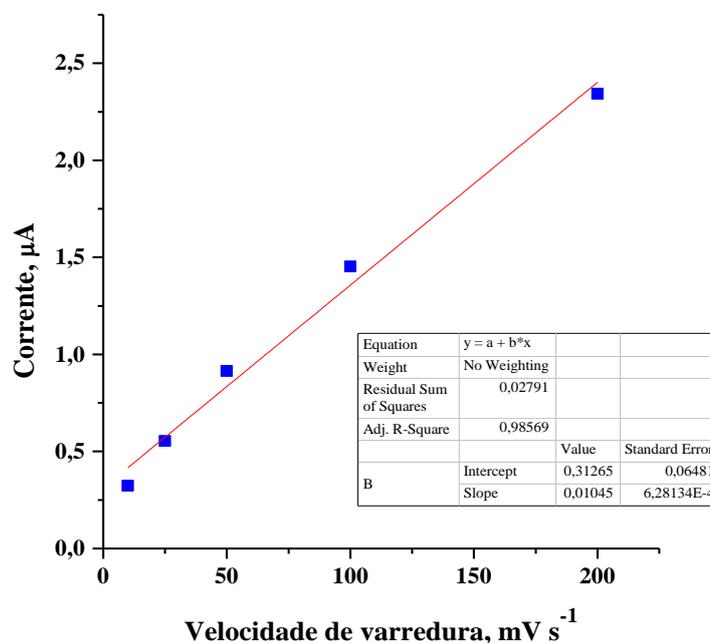


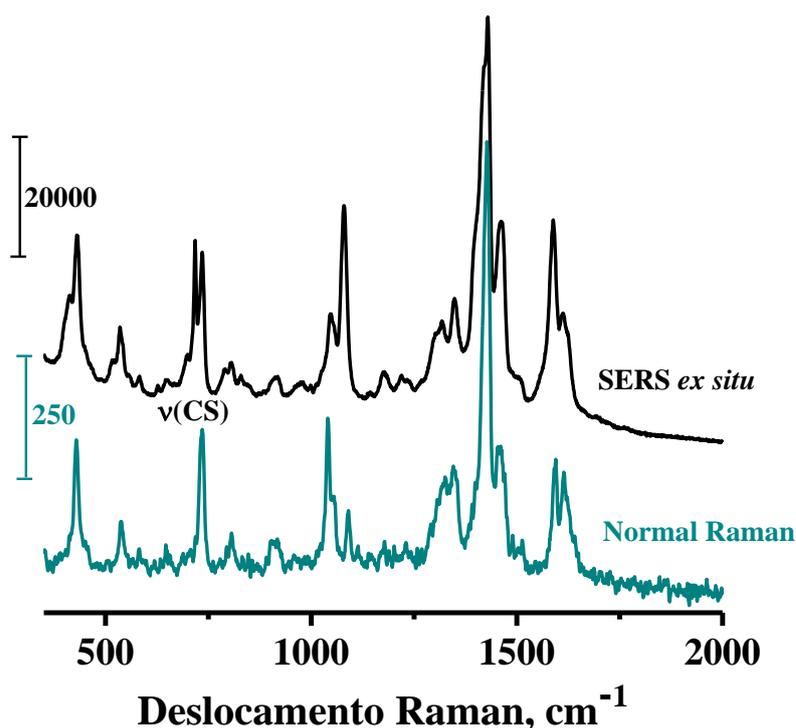
Figura 25: Representação gráfica de corrente versus velocidade de varredura obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos ilustrados na Figura 24.



A relação linear observada no gráfico de corrente versus velocidade de varredura, ilustrado na Figura 25, indica que o processo redox está confinado na superfície do eletrodo.⁷⁷ Este resultado reforça a atribuição de que o composto experimentou adsorção sobre a superfície de ouro. A Figura 25 ilustra o espectro

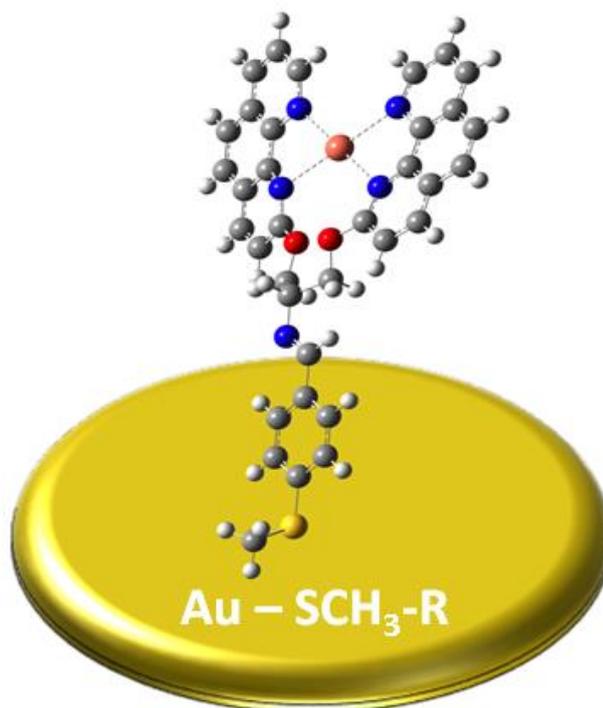
SERS *ex situ* (sem aplicação de potencial) obtido para o eletrodo de ouro modificado com o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$. Para efeitos de correlação, a Figura 26 contém, também, o espectro Raman normal do complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ no estado sólido.

Figura 26: Espectro SERS *ex situ* do eletrodo de ouro modificado com o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ e espectro Raman normal do composto $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ no estado sólido.



Comparativamente ao espectro Raman normal, o aumento de intensidade relativa das bandas associadas aos modos vibracionais do fragmento $\text{CH}_3\text{-S}$ em 717 e 739 cm^{-1} no espectro SERS indica que o complexo experimenta adsorção através do átomo de enxofre. Tal resultado, em verdade, é normalmente observado para a modificação de superfícies de ouro com moléculas que contêm enxofre.⁷⁸ A Figura 27 apresenta uma representação esquemática de uma molécula do complexo adsorvida sobre ouro. Os outros sinais correspondem as vibrações que estão presentes nos anéis fenantrolínicos e no grupo benzênico. O sinal correspondente a ligação N-O do grupo nitrato, é observada em 1040 cm^{-1} reafirmando a estrutura pentacoordinada proposta para o complexo.

Figura 27: Representação esquemática de uma molécula do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ adsorvido sobre ouro.

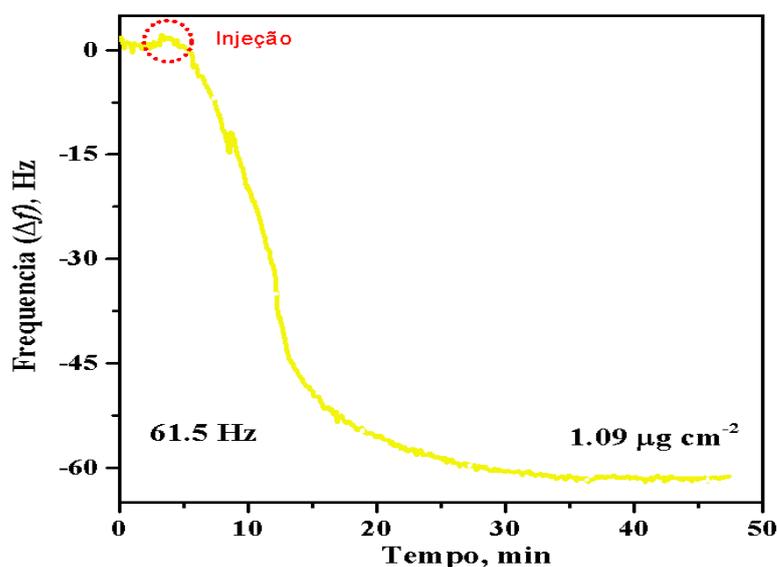


4.4.1 Estudo gravimétrico da adsorção do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ sobre ouro

4.4.1.1 Microbalança de cristal de quartzo (QCM)

A microbalança de cristal de quartzo permite monitorar em tempo real as mudanças na superfície do eletrodo de ouro através de um transdutor piezoelétrico de quartzo acoplado a um circuito de oscilação ligado a um medidor de frequência.⁷⁹ A Figura 28 apresenta o gráfico de variação de frequência em função do tempo durante a modificação do eletrodo de ouro com o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$.

Figura 28: Variação de frequência (Δf) em função do tempo durante a adsorção do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ sobre um cristal piezoelétrico de ouro em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



A variação de massa, Δm , está associada à variação de frequência através da Equação de Sauerbrey⁸⁰ (Equação 13);

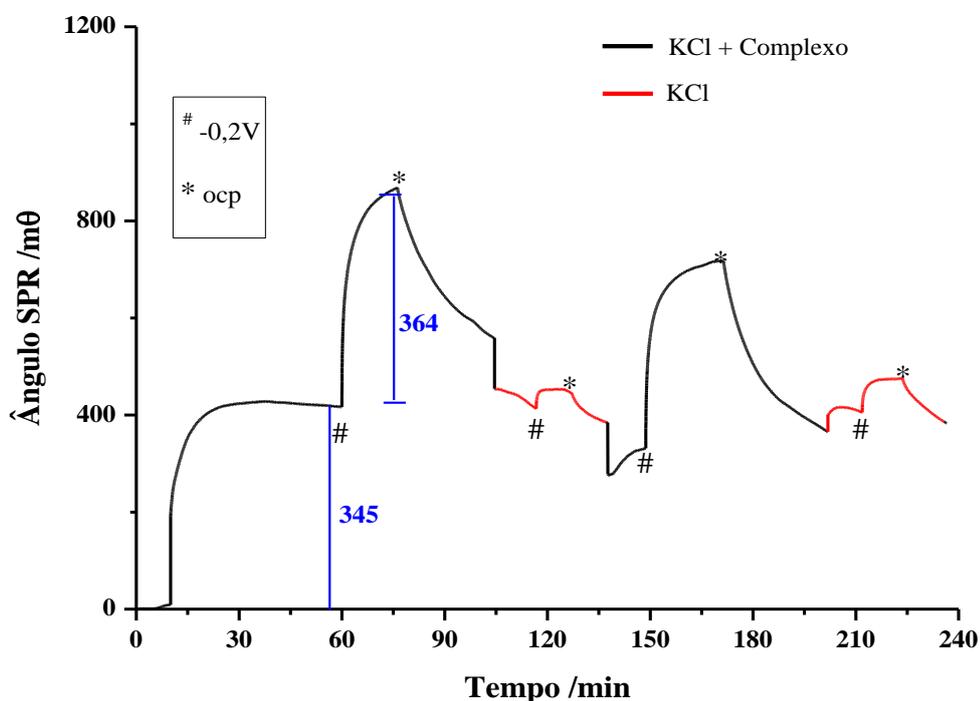
$$\Delta m = -C_f \Delta f \quad (\text{Eq. 13})$$

onde C_f é a constante de proporcionalidade ($C_f = 17,7 \text{ ngHz}^{-1}\text{cm}^{-2}$ para os cristais utilizados neste trabalho). A diferença de frequência Δf de 61,5 Hz observada no gráfico ilustrado na Figura 31 corresponde a uma variação de massa de Δm de 61,5 Hz, ou seja, $\Gamma = 1,09 \mu\text{g cm}^{-2}$ ou $1,42 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, diferente do valor $5,1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ obtido da modificação superficial do eletrodo com o complexo. Esta diferença é atribuída a que a técnica de microbalança de cristal de quartzo considera contra íons e moléculas de água que geram uma variação de frequência do eletrodo.

4.4.1.2 Ressonância de plásmons de superfície (SPR)

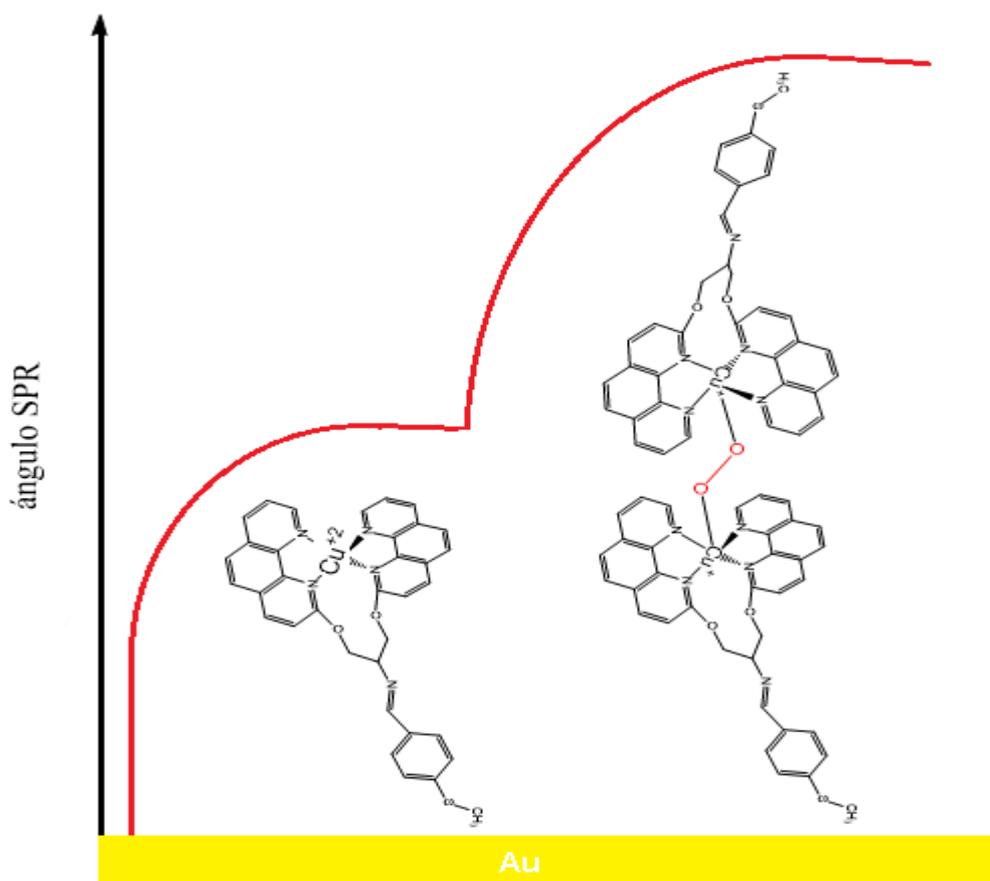
O monitoramento da adsorção do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ bem como o estudo do efeito da aplicação de potencial sobre este processo foi realizado, também, por ressonância de plásmons de superfície (SPR). A Figura 28 apresenta um sensorgrama com a variação de ângulo SPR (θ) em função do tempo.

Figure 29: Variação de ângulo SPR em função do tempo durante a adsorção do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ sobre ouro com aplicação de potencial negativo (#) e em condição de circuito aberto (*).

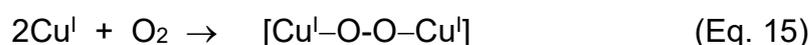


A injeção de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ durante 60 min resulta em um aumento de ângulo SPR indicando a adsorção do complexo, tal como previamente observado por eletroquímica e SERS. A partir da relação⁸¹ $122 \text{ m}^\circ \rightarrow 1,0 \text{ ng mm}^{-2}$, o valor de Γ foi calculado em $5,4 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ coincidindo, portanto, com o valor calculado a partir da curva voltamétrica ilustrada na Figura 22. Após a aplicação de potencial negativo (#, $-0,2\text{V}$), observa-se um segundo aumento do ângulo SPR (364 mθ) com aproximadamente a mesma variação de massa observada na primeira etapa. Após 15 min, quando a condição de OCP é restabelecida e é passado fluxo de KCl sem a presença do complexo, o ângulo SPR diminui até o valor observado no primeiro patamar (345 mθ). Este comportamento é observado em todas as etapas exceto naquelas destacadas em vermelho que se referem ao fluxo de solução de KCl sem a presença de complexo. Este resultado sugere que o processo de dimerização ocorre apenas quando há moléculas do complexo no meio eletrolítico. Admitindo que dióxigênio é o ligante ponte entre os dois centros metálicos, a diferença entre os valores de massa ($364 - 345 = 19 \text{ ng cm}^{-2}$) corresponde a $5,9 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ que é consistente para uma molécula de dióxigênio entre duas moléculas do complexo dada a quantidade adsorvida ($5,4 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$). A Figura 30 ilustra uma representação do dímero formado.

Figura 30: Estrutura proposta para o dímero do complexo de $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^+$ sobre ouro.



Assim, é razoável admitir que, após redução, há a formação de uma espécie dimérica, de acordo com as Equações 14 e 15:



A sugestão de formação de uma espécie dimérica intermediária contendo dióxigênio como ligante ponte é consistente com alguns trabalhos publicados na literatura.⁸² Recentemente, Karlin e colaboradores⁸³ sugeriram a formação de um intermediário de $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{OOH}$ em solução, mas não é suficientemente reativo para fazer a abstração de H e, portanto, experimenta uma quebra homolítica da ligação O-O produzindo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{OH}$ e o radical OH^\bullet . Neste trabalho, para o complexo adsorvido e tendo-se o composto em solução, os dados de SPR indicam um aumento de massa consistente com a ligação de moléculas do complexo (em solução) à moléculas

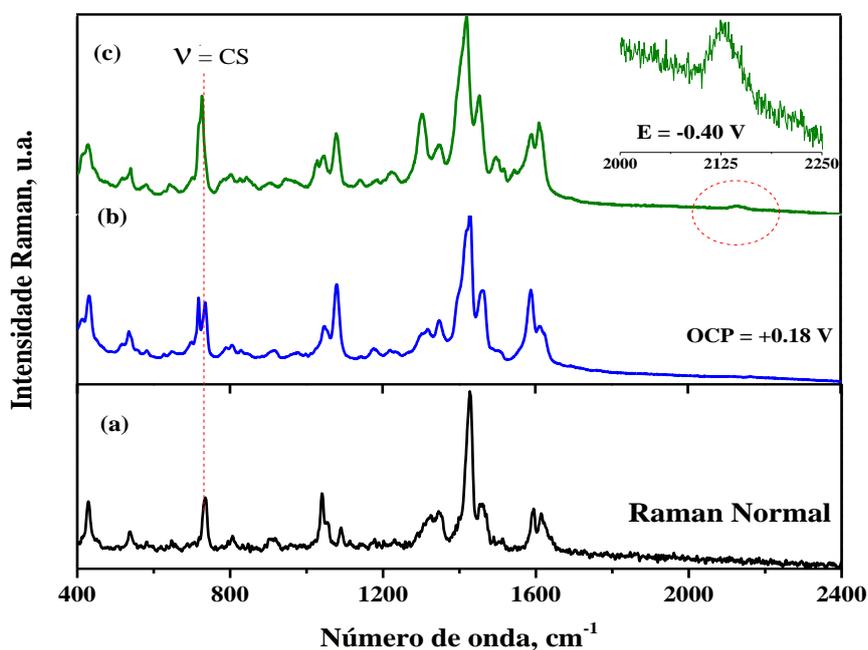
adsorvidas através de uma ponte O-O. De fato, a formação de espécies intermediárias de cobre contendo oxigênio tem sido proposta por vários autores,⁸⁴⁻⁸⁶ como comentado anteriormente. Na maioria das publicações, todavia, a detecção de tais intermediários só é possível mediante a aplicação de condições extremas, tais como temperaturas abaixo de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Adicionalmente, a possibilidade de formação de uma espécie dimérica helicoidal, tal como sugerido em solução, é descartada em superfície devido a impedimentos estéricos. Para a formação da espécie helicoidal, é necessária a saída do ligante fenantrolínico da esfera de coordenação. Após adsorção, quando se tem uma diminuição dos graus de liberdade da molécula, esta saída não é possível.

Foi realizado o mesmo experimento utilizando NaF $0,1\text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte em vez de KCl, para descartar a possibilidade de que o dímero formado na superfície correspondesse a uma espécie contendo cloreto como ligante ponte. O sensorgrama obtido apresentou o mesmo perfil ilustrado na Figura 30 descartando, por tanto, o ligante cloreto como a espécie responsável pelo ponte entre os dois átomos de cobre.

4.4.2 Estudo de SERS *in situ*

O comportamento do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ adsorvido sobre ouro com a aplicação de potencial foi estudada por espectroscopia SERS com aplicação de potencial (*in situ*) suficiente para reduzir o composto ($-0,4\text{ V}$). A Figura 30 ilustra, além do espectro SERS *in situ*, os espectros Raman normal e *ex situ* (sem aplicação de potencial) para fins de correlação.

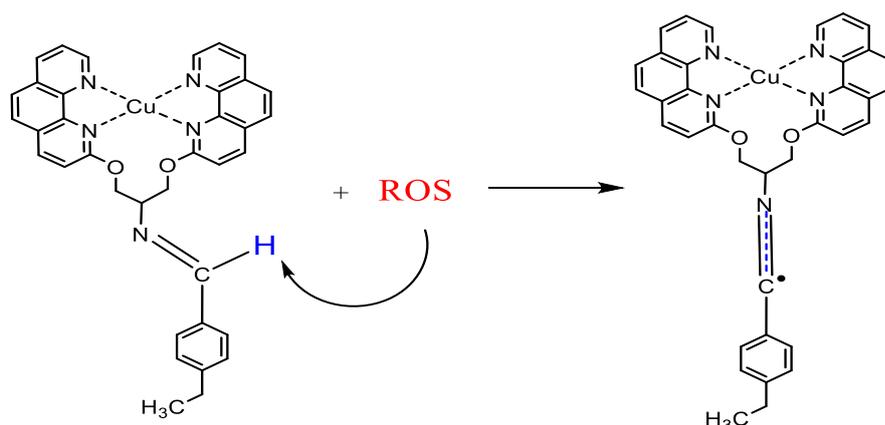
Figura 31: Espectros Raman do complexo de Cu^{2+} : (a) Raman normal; (b) SERS *ex situ* e (c) SERS *in situ* (-0,4 V por 60s).



O espectro SERS do composto $[\text{Cu}(2\text{CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ (Figura 31, Quadro b) é muito similar ao espectro Raman do mesmo (Figura 31, Quadro c), apresentado a mesma atribuição de sinais para ambos casos (O espectro de Raman foi discutido na seção 4.1.4.1, Figura 27, Tabela 1). A aplicação de potencial negativo (-0,4 V) induz a redução do centro metálico da molécula. Pode-se ver que as bandas do espectro SERS com aplicação de potencial (Figura 31, Quadro c) mudam em comparação ao espectro de SERS sem aplicação de potencial (Figura 31, Quadro b), fato que é atribuído a mudança de geometria devido ao processo de redox. Esta mudança conformacional devido à mudança no estado de oxidação de Cu(II) a Cu(I) é tão dramática, que pode ser percebida nas vibrações do fragmento final da molécula (R-SCH₃) a través da banda correspondente aos modos vibracionais de ligação CS em 719 e 739 cm^{-1} após da redução do centro metálico.^{24,78,87-89}

Adicionalmente, observou-se uma mudança significativa entre os espectro devido ao surgimento de um sinal em 2132 cm^{-1} . A literatura reporta⁹⁰ que essa banda é atribuída para o fragmento CN de radicais. Esta banda pode-se formar devido a abstração do hidrogênio imínico gerando um radical nitrila (Figura 31) mediante ação alguma espécie ROS gerada no processo redox do cobre.

Figura 32: Esquema da geração do possível radical nitrila



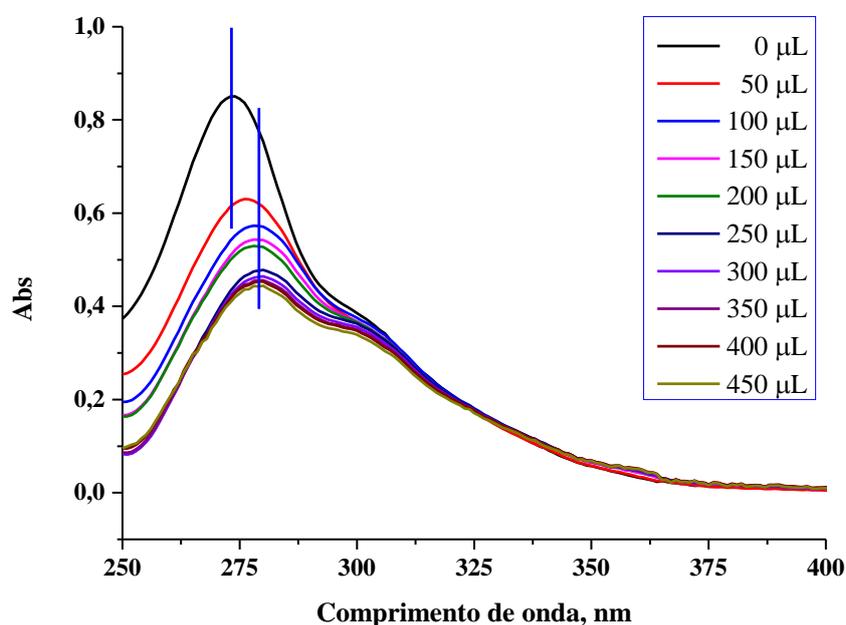
4.5 Estudo de interação do complexo $[\text{Cu}(\text{2CPBzSMe})](\text{NO}_3)$ com DNA

4.5.1 Estudo de constante de afinidade do complexo $[\text{Cu}(\text{2CPBzSMe})](\text{NO}_3)_2$ com DNA

A inclusão de um complexo dentro da estrutura do DNA, ou seja, no sulco maior ou menor da dupla fita por intercalação total ou parcial, produz uma alteração no coeficiente de absorção molar do complexo, ϵ , ou um deslocamento do máximo de absorção das bandas intraligante (IL) ou na banda MLCT do complexo.^{91,92}

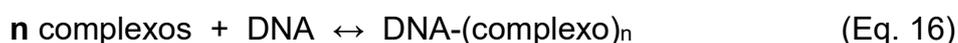
Como foi mencionado na seção introdutória, complexos de cobre com ligante Clip-phen interagem significativamente com o DNA. Para o complexo cúprico derivado do ligante 2CP-Bz-SMe foi realizado o estudo da interação com o DNA por meio de uma titulação espectroscópica na região do ultravioleta e visível. Como o complexo é de cobre (II), não apresenta bandas MLCT, mas apenas transições d-d, cujas intensidades são muito fracas. Assim, os valores de absorvidade molar da banda intraligante observada em 273 nm foram subtraídas considerando-se para ser utilizadas neste estudo. Assim utilizou-se a banda de 273 nm, que corresponde a absorção em 260 nm atribuída a transições associadas ao DNA-ct. Os espectros obtidos encontram-se ilustrados na Figura 33.

Figura 33: Titulação espectroscópica do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ de concentração $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com alíquotas de 50 μL de DNA ($1.56 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).



A titulação da solução do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ (Figura 36) com DNA resulta em uma diminuição na intensidade da banda em 273 nm (hipocromismo) devido a interação do composto com o DNA. Além disso, pode-se observar um efeito batocrômico, onde o máximo de absorvância se desloca (5 nm) para uma região de menor energia, sugerindo a intercalação do composto ao DNA.⁹³⁻⁹⁵

Um método amplamente aceito para quantificar a interação de compostos com DNA é através da determinação da constante de afinidade, K_b , que é uma constante aparente, uma vez que não é necessário determinar a estequiometria exata da interação DNA-complexo (Equação 16).



Para calcular a constante de afinidade, utilizou-se a equação proposta por Schmechel e Crothers⁹⁶ (Equação 17):

$$\frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (\text{Eq. 17})$$

Onde [DNA] é a concentração molar de ct-DNA em pares de base [bp], ϵ_a é a $Abs_{obs}/[Complexo]$, ϵ_f é a absorvância do complexo livre e ϵ_b é o coeficiente de extinção molar do complexo com o DNA. Representando graficamente $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs [DNA] obtém-se uma relação linear, conforme ilustrado na Figura 34. A Tabela 3 apresenta os dados obtidos.

Figura 34: Representação gráfica de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ em função de [DNA] para a obtenção da constante de afinidade (K_b) para o íon complexo $[Cu(2CP-Bz-SMe)]^{2+}$.

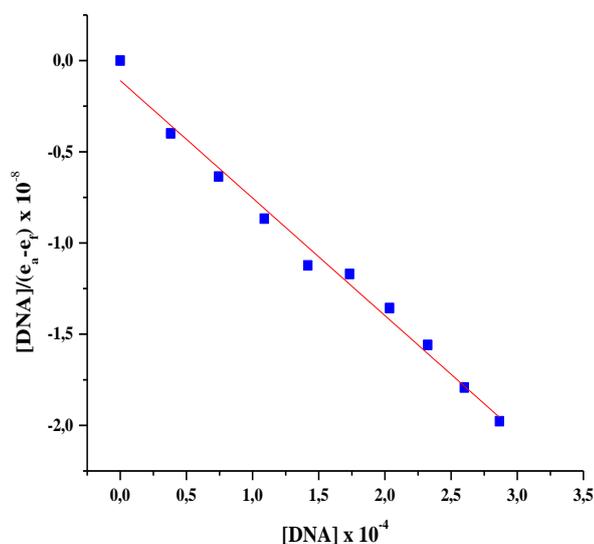


Tabela 3: Dados utilizados na obtenção da constante de afinidade do íon complexo $[Cu(2CP-Bz-SMe)]^{2+}$ com DNA.

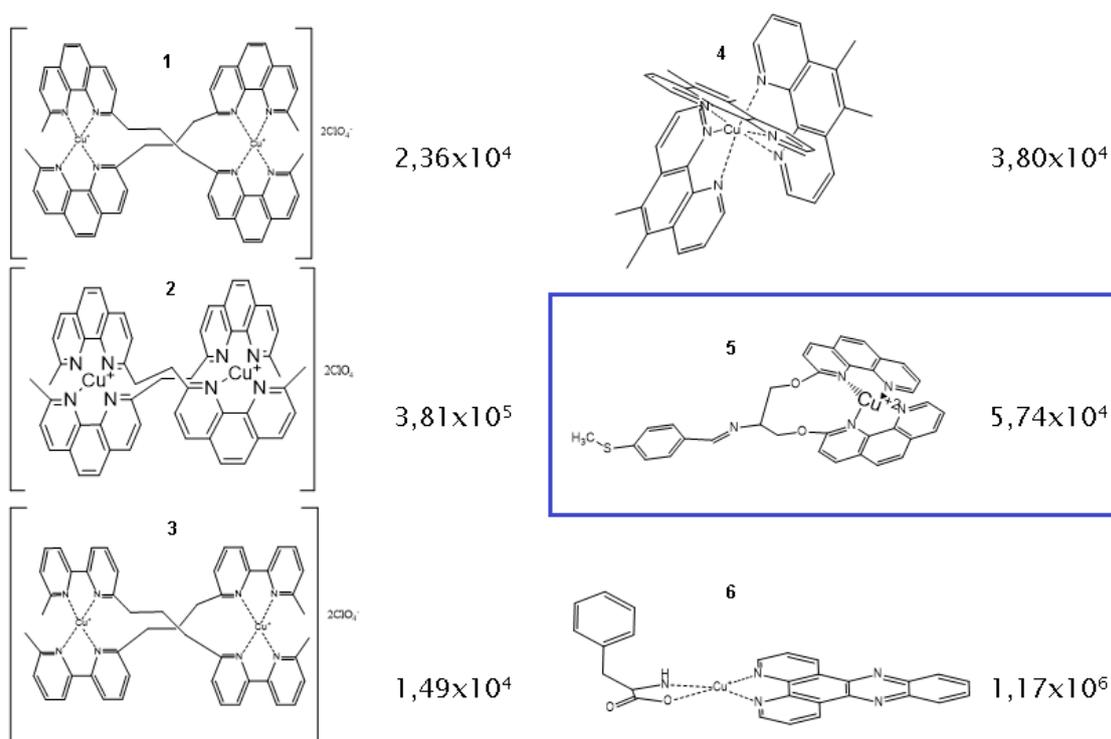
μL DNA	[Complexo]	[DNA]	Abs. Aparente	ϵ_a	ϵ_f	$\epsilon_a - \epsilon_f$	$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$
0	2,047E-05	0	0,8404	41055	41075	-19	0
50	1,997E-05	3,804E-05	0,6298	31536	41075	-9538	-3,988E-09
100	1,949E-05	7,428E-05	0,5729	29386	41075	-11688	-6,355E-09
150	1,904E-05	1,088E-05	0,5431	28521	41075	-12553	-8,669E-09
200	1,860E-05	1,418E-05	0,5294	28448	41075	-12626	-1,123E-08
250	1,819E-05	1,733E-05	0,4778	26259	41075	-14815	-1,169E-08
300	1,781E-05	2,035E-05	0,4642	26078	41075	-14996	-1,356E-08
350	1,742E-05	2,323E-05	0,4559	26169	41075	-14905	-1,558E-08
400	1,705E-05	2,600E-05	0,4533	26573	41075	-14501	-1,792E-08
450	1,671E-05	2,865E-05	0,4442	26582	41075	-14492	-1,977E-08

A constante de afinidade (K_b) é obtida da relação coeficiente angular/ordenada no origem (Equação 18)

$$K_b = \frac{\text{Coeficiente angular}}{\text{Ordenada na origem}} \quad (\text{Eq. 18})$$

O valor obtido para a constante de afinidade (K_b) a partir da Equação 18 é $5,74 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Este valor é consistente com uma interação com DNA do tipo “groove binders”. Na Figura 34 é possível comparar as constantes de afinidade para varios complexos de cobre¹⁵ com diferentes geometrias.

Figura 35: Esquema comparativo de valores de constantes de afinidade (mol L^{-1}) de diferentes tipos e geometrias de complexos de cobre.



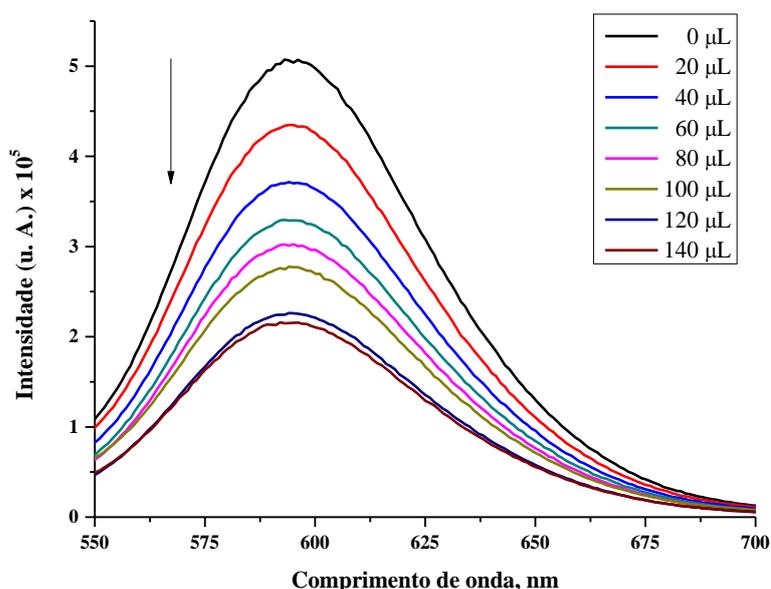
Da Figura 35 pode-se observar que complexos de cobre com geometria planar (Complexo 6) apresentam um constante de afinidade de magnitude 10^6 , observando-se uma intercalação direta no sulco menor do DNA. No entanto, moléculas com geometrias pseudo tetraédricas (Complexos 1, 2, 3 e 4) apresentam constantes de afinidade com ordem de magnitude 10^4 - 10^5 , o que é atribuído a interações com o sulco maior do DNA. Particularmente o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ (Complexo 5), objeto deste estudo, apresenta uma ordem de magnitude de 10^4 , sugerindo que o tipo de interação é no sulco maior do DNA. Entretanto, o efeito batocrômico observado na titulação do complexo com DNA sugere que o complexo também pode possuir intercalação (sulco menor) dentro da dupla fita. Para corroborar se o complexo

apresenta intercalação realizou-se um estudo de competição com o brometo de etídio (EB) que é um conhecido agente intercalador do DNA.

4.5.2 Estudo de competição com brometo de etídio (EB). Obtenção da constante de Stern-Volmer (K_{sv})

Um método de determinação do modo de interação de um composto com o DNA, é a través da reação de competição entre este composto e o brometo de etídio que já se encontra previamente coordenado à dupla fita. O brometo de etídio é uma molécula que intercala no sulco menor do DNA por interação eletrostática da carga positiva do EB com os grupos fosfato do DNA e a formação de empilhamentos π entre seus anéis com bases nitrogenadas do DNA, gerando um ambiente hidrofóbico,⁹⁷ fato que aumenta significativamente a emissão (fluorescência) do sistema. O EB livre apresenta uma fluorescência muito fraca em solução, ao contrário do que acontece quando está intercalado ao DNA. A possível intercalação do íon complexo $[Cu(2CP-Bz-SMe)]^{2+}$ deve gerar uma diminuição da intensidade da emissão da solução do fluoróforo (EB-DNA) devido a remoção do EB de seu sitio de intercalação no DNA, fato que foi observado neste estudo, conforme é ilustrado na Figura 36.

Figura 36: Espectro de fluorescência de DNA-ct incubado com EB em proporção de 1:1 de concentração $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em [bp]. Adições de $20 \mu\text{L}$ de uma solução $2 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$ do íon complexo $[Cu(2CP-Bz-SMe)]^{2+}$ em PBS 2mmol L^{-1} e pH 7,4.



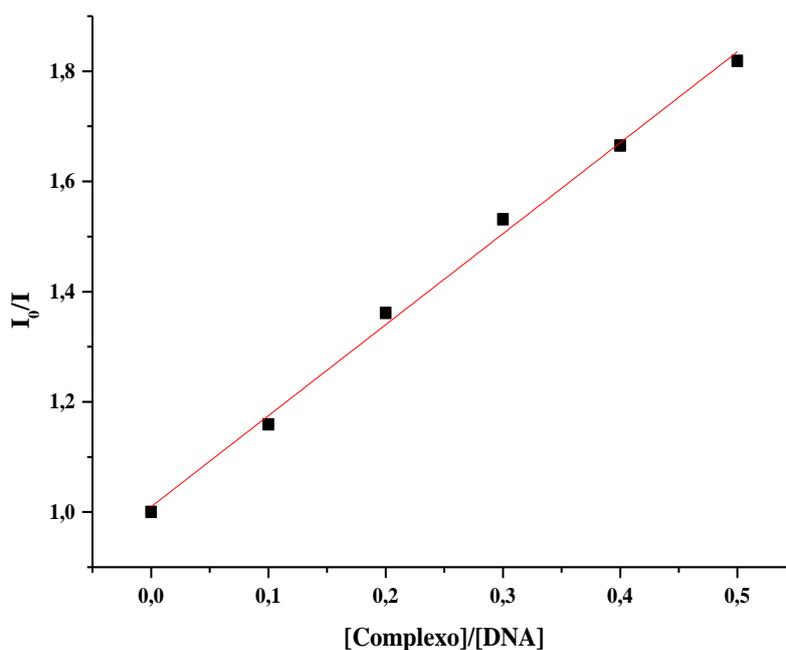
Ao titular a solução de DNA-EB com íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ (Figura 36) se observa uma diminuição da intensidade da banda de emissão do EB ligado ao DNA. Esta diminuição deve-se à remoção do EB do sulco menor do DNA e pode ser quantificado a través da Equação 19 deduzida por Stern-Volmer.⁹⁸

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} * r \quad (\text{Eq. 19})$$

Onde I_0 é a intensidade de emissão correspondente ao fluoróforo EB-DNA, I é a intensidade de emissão em cada adição das alíquotas do complexo, r é a razão $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}]$ em pares de bases (bp) e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer. Representando graficamente I_0/I e a razão $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}]$ (Figura 37) se pode obter K_{sv} a partir da Equação 20.

$$K_{SV} = \frac{\text{Coeficiente angular}}{\text{Ordenada na origem}} \quad (\text{Eq. 20})$$

Figura 37: Aplicação da equação de Stern-Volmer para a interação do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ dentro do intervalo $[\text{complexo}]/[\text{DNA}]$ de 0-6



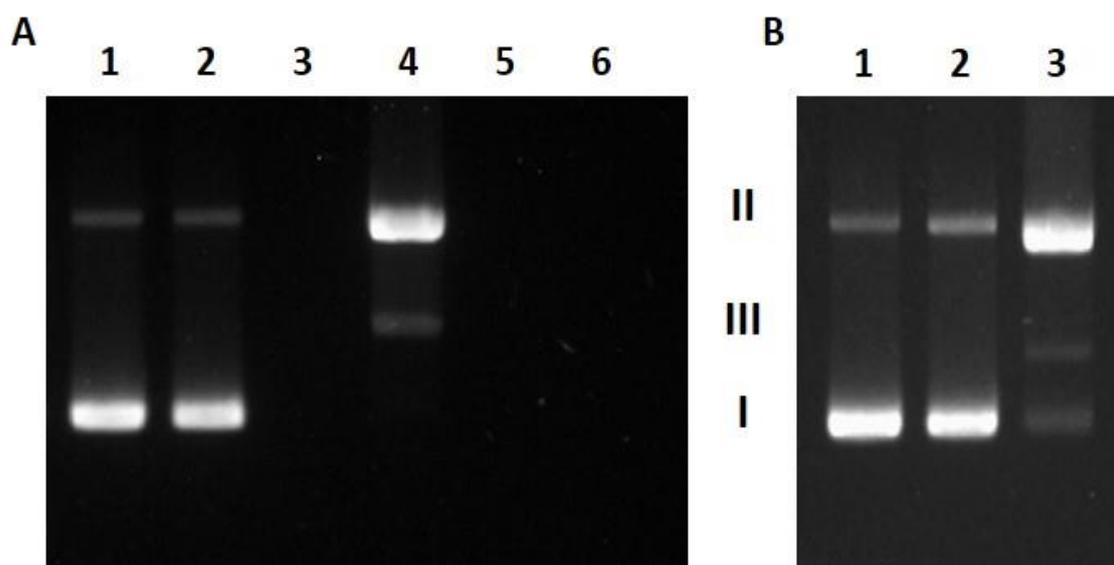
O valor obtido para a constante de Stern-Volmer para o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ foi de 1,65. Este é um valor muito elevado, que se obtém normalmente para compostos intercaladores,⁹¹ corroborando a sugestão anterior (Figura 36). O fato do composto experimentar intercalação e, além disso, apresentar interação com o sulco maior do DNA era esperado tendo por base compostos similares observados para complexos de cobre com ligantes clip-phen. Estudos de DFT reportados na literatura¹⁸ reforçam a capacidade destes compostos de intercalar e interagir com o sulco maior e menor do DNA. (Seção 1.1)

4.6 Estudo de geração de espécies ROS (Reactive Oxygen Species)

4.6.1 Estudo de geração de espécies ROS mediante eletroforeses

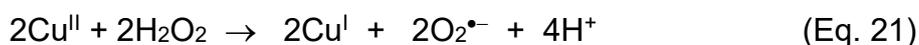
Sabidamente, a clivagem do DNA por complexos de cobre pode ocorrer através de vias hidrolíticas ou oxidativas. A atividade nucleasase do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ foi monitorada pelo relaxamento do plasmídeo circular superenovelado pBR322 de DNA (Forma I), para as formas II (*nicked*)⁹⁹ e III (*linear*) do DNA por meio de eletroforese em gel de agarose. (Figura 38)

Figura 38: Forma circular e clivagem do plasmídeo pBR 322 devido a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Cu}(\text{II})^*$. **A;** (1) controle de DNA; (2) DNA + $\text{Cu}(\text{II})$; (3) DNA + $\text{Cu}(\text{II})$ + $30 \mu\text{mol L}^{-1}$; (4) DNA + $\text{Cu}(\text{II})$ + $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ + $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ catalase; (5) DNA + $\text{Cu}(\text{II})$ + $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ + 50mmol L^{-1} D-manitol; (6) DNA + $\text{Cu}(\text{II})$ + $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ + $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ SOD. **B;** (1) controle de DNA; (2) DNA + 3mmol L^{-1} H_2O_2 ; (3) DNA + 3mmol L^{-1} H_2O_2 + $\text{Cu}(\text{II})$. $\text{Cu}(\text{II})^* = [\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$.

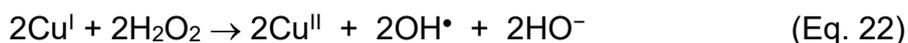


Na Figura 38, quadro A, se pode observar que ao incubar o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ com o DNA (2), ele não gera nenhuma alteração na forma do DNA em relação ao controle (1). Quando ácido ascórbico é adicionado (3) (devido a seu caráter redutor) observou-se uma degradação total do DNA, fato atribuído à geração de ROS que possuem um elevado poder oxidante. Para tentar identificar que espécie está sendo gerada, foram utilizados “scavengers” (agentes de reconhecimento específico para espécies ROS). Na reação (4), foi utilizada catalase,¹⁰⁰ enzima que catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio a oxigênio e água. Como resultado, surgiu uma banda correspondente à forma II (DNA desenovelado). Também é possível observar uma banda mais tênue correspondente a forma III, isto é, DNA linear. Comparando o dano causado na ausência desta enzima, que leva a degradar completamente o DNA, podemos afirmar que a catalase está protegendo parcialmente o DNA, detectando a geração de peróxido de hidrogênio.¹⁰¹⁻¹⁰³ A adição de D-manitol¹⁰⁴ como “scavenger” de radical OH^\bullet (5), não fornece nenhuma proteção adicional. Esta observação pode ser atribuída à ausência deste radical. Entretanto, como o composto tem a possibilidade de intercalar dentro do DNA gerando radicais dentro da dupla fita e este radical não difunde em solução e tem um tempo de vida de 10^{-9} s, a sua formação pode ocorrer sem que seja possível a detecção.^{105,106} A presença do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) por meio de SOD¹⁰⁷ (superoxodismutase) (6) não é sugerida neste experimento, mas pode acontecer que este seja gerado dentro do DNA depois que a molécula intercala à dupla fita.

Na Figura 38, Quadro B, se pode observar que o DNA não sofre nenhuma reação quando o peróxido de hidrogênio é adicionado na ausência do complexo de cobre (2). Quando peróxido de hidrogênio é adicionado a uma solução contendo DNA e o íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$, observa-se o surgimento das formas II e III do DNA. Isso é atribuído a geração de espécies ROS na reação que, neste caso, correspondem a reação Fenton. Equação 21.



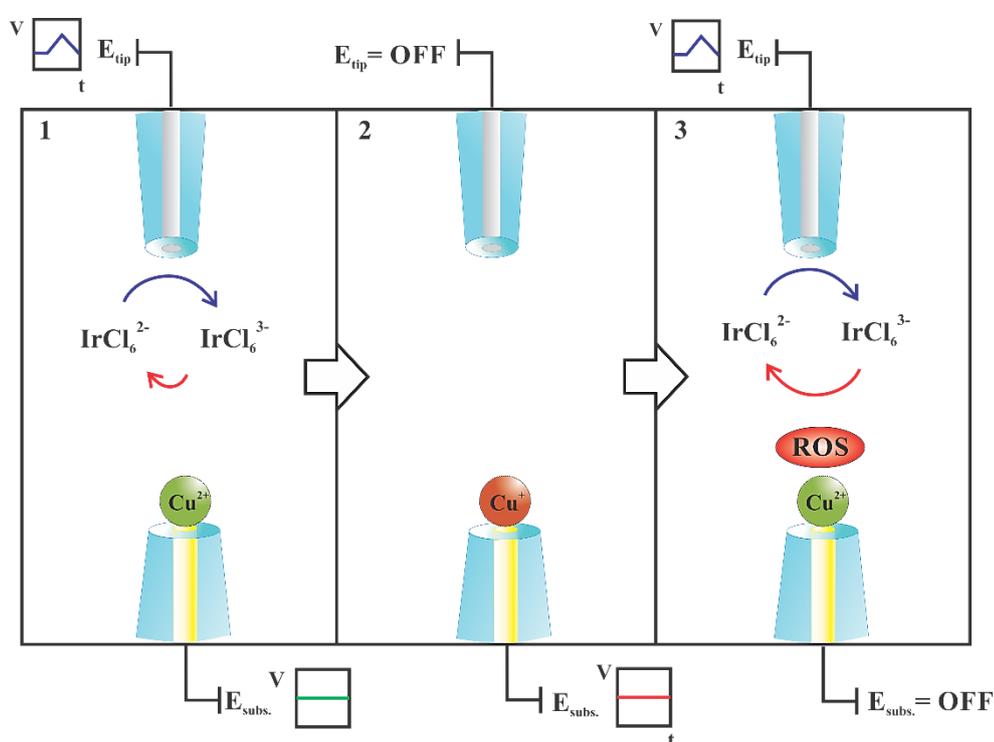
O peróxido de hidrogênio atua reduzindo $\text{Cu}(\text{II})$ a $\text{Cu}(\text{I})$ que, posteriormente, reage com peróxido de hidrogênio para gerar o radical OH^\bullet . Equação 22.



4.6.2 Detecção de espécies reativas de oxigênio por meio de SECM

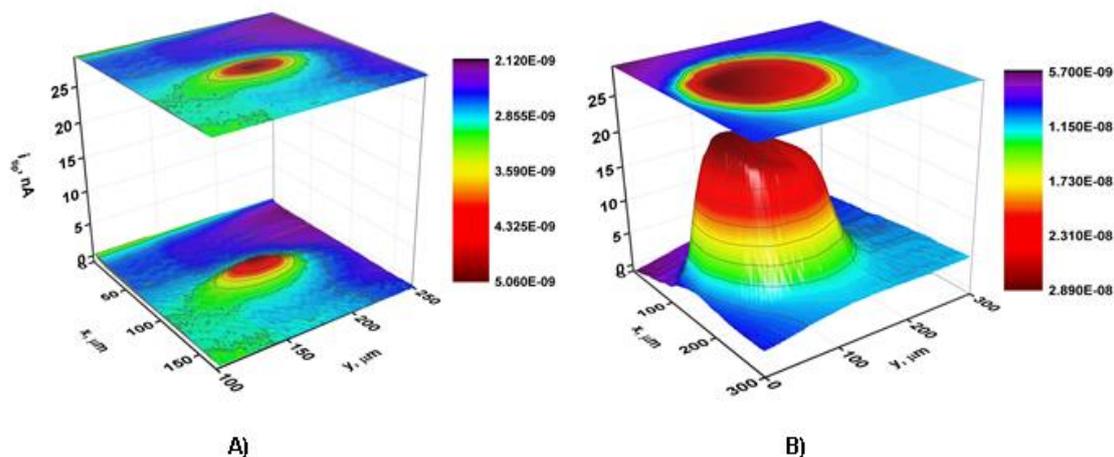
A Figura 39 ilustra o experimento realizado para a detecção de espécies radicais por SECM.

Figura 39: Imagem ilustrativa esquemática do experimento de SECM usando os modos de interrogação de superfície (SI – *Surface Interrogation*) e detecção de corrente gerada na tip (SG/TC – *Surface Generated Tip Collection*), com o íon complexo $[\text{IrCl}_6]^{2-}$ como mediador.



De acordo com o método de interrogação de superfícies (SI)⁴⁹, enquanto o potencial aplicado à tip SECM é mantido constante para gerar a forma reduzida do mediador (IrCl_6^{3-}) (Figura 39, Quadro 1), o potencial aplicado ao substrato modificado foi $-0,2 \text{ V}$ durante 60 s (Figura 39, Quadro 2) o que foi suficiente para gerar espécies ROS que, após retornar para a condição de potencial de circuito aberto reagiu com as espécies reduzidas (primeira etapa) do mediador oxidando-as de IrCl_6^{3-} a IrCl_6^{2-} (Figura 39, Quadro 3). A corrente resultante medida na tip permite inferir à respeito da espécie ROS comprovando a sua formação. (Figura 40)

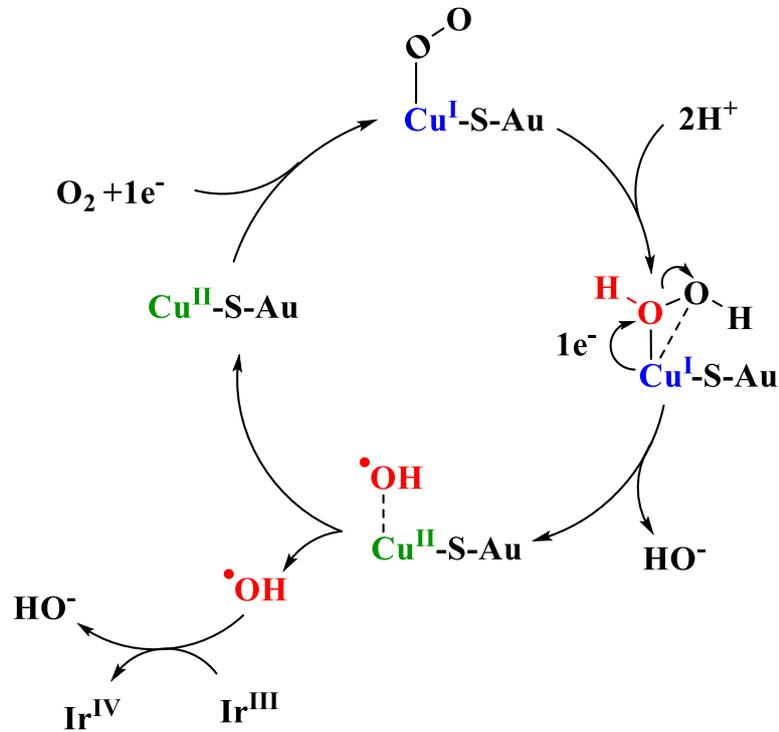
Figura 40: Imagens de SECM SG-SI/TC mostrando a corrente na tip de SECM atribuída à detecção de espécies ROS geradas sobre o substrato de ouro modificado com o complexo $[\text{Cu}(\text{2CPBzSMe})]^{2+}$. Condições de obtenção das imagens: SECM tip a 0,5 V em solução aerada de KCl 0,1 mol L⁻¹ e substrato de ouro em OCP após 60 s a (A) 0,40 V e (B) -0,20 V. Distância tip-substrato = 12 μm e velocidade de varredura da tip (direção eixo-y) = 200 μm/s. Referência: Ag/AgCl/Cl⁻ (KCl saturado).



As imagens de SECM (Figura 40) mostram a retrodoação positiva de corrente (zona vermelha do gráfico tridimensional) esta zona evidencia a formação de espécies reativas de oxigênio devido a reoxidação do centro metálico do complexo adsorvido.

Após a redução do complexo metálico de cobre (II) a cobre (I) numa solução aerada, a oxidação do complexo de cobre (I) devido ao oxigênio presente na solução resulta na formação de intermediários contendo O_2 ou ^-OOH . Em meio levemente ácido ($\text{pH} = 5$) e em condições de OCP os intermediários gerados durante o primeiro processo tornam o processo de reoxidação de Cu (I) a Cu (II) favorável, gerando nesta etapa uma espécie de elevado poder oxidante sendo o radical peróxil (HOO^\bullet) ou provavelmente o radical OH^\bullet , que prontamente reage com o mediador na forma reduzida Ir(III) oxidando a sua forma anterior Ir (IV) gerando então uma corrente de retroalimentação positiva. (Figura 41)

Figura 41: Mecanismo sugerido para a formação de radical hidroxila durante a reoxidação do complexo de cobre (I) por médio de SECM.



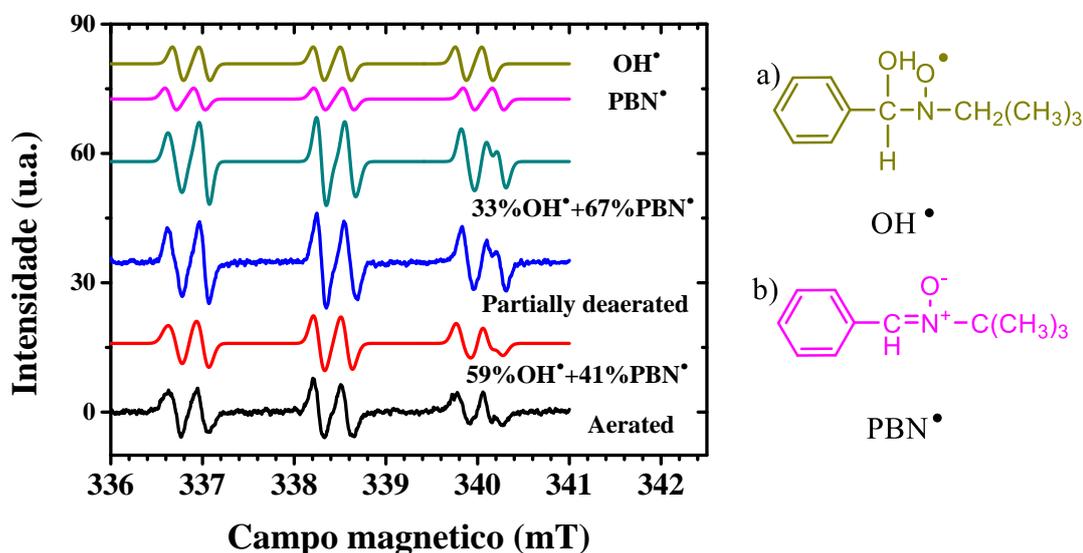
Pode-se dizer, portanto, que em solução aerada, a redução monoeletrônica do complexo de Cu(II) adsorvido é seguida por uma reação com moléculas de O_2 difundido na solução,^{83,84} resultando provavelmente na formação do radical OH^\bullet que, por sua vez, reage com as moléculas reduzidas do mediador de irídio reoxidando-as a Ir (IV). O mediador reoxidado volta então a ser reduzido na interface da tip. Este processo resulta então na observação da corrente de retrodoação positiva.

4.6.3 Determinação do radical OH• por meio de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Utilizou-se a técnica de EPR¹⁰⁸ para a investigação da natureza da espécie ROS produzida pelo íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$. Para facilitar a detecção da espécie radicalar, utilizou-se um “spin trap”¹⁰⁹ chamado PBN (N-*tert*-butil- α -fenilnitrona) Seção 1.3) já que ele possui um tempo de vida longo permitindo, dessa forma, a detecção do aduto gerado pelo radical ligado à nitrona.

O experimento foi realizado seguindo os processos sugeridos pela “Fenton-reaction”, onde foi adicionado PBN, junto com uma solução que continha o complexo de cobre (II) e peróxido de hidrogênio. (Figura 42)

Figura 42: Espectros de EPR do íon complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em soluções aeradas e parcialmente desareadas que contêm H_2O_2 e PBN. Espectro simulado obtido usando o programa EasySpin⁴⁶. a) Aduto PBN-OH•; b) Radical PBN•.



Observou-se a formação de dois radicais, um correspondente ao radical PBN e o outro foi identificado através do valor do acoplamento hiperfino ($a^{\text{N}}:15,53 \text{ G}$) como o radical hidroxil¹¹⁰ ($a^{\text{N}}:15,3 \text{ G}$). Para a reação do complexo $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$ com H_2O_2 é favorecida a geração do radical OH• sobre o PBN• com um 59% e 41% respectivamente⁴⁶ em solução areada (preto). Na solução parcialmente desareada

(azul) apresenta uma importante diminuição na porcentagem do radical OH^\bullet gerado sobre o PBN^\bullet de acordo com os percentuais de 33% e 67% respectivamente. O fato de se observar a diminuição da quantidade de ROS gerado quando diminui a presença de oxigênio, é um indicativo importante que este desempenha um papel muito importante na geração dos radicais deste composto de cobre, atuando como um intermediário entre dois complexos gerando o dímero^{83,84} sugerido em meio homogêneo pela voltametria em solução do composto a diferentes pH e em meio heterogêneo mediante o SPR. Provavelmente, a diminuição da quantidade de oxigênio disponível gera uma diminuição na produção de H_2O_2 . A possibilidade de formação do aduto PBN-OOH devida na presença do radical peroxil e descartada devido a que o acoplamento hiperfino para esta espécie é $a^{\text{N}}: 14,8 \text{ G}$

5 CONCLUSÃO

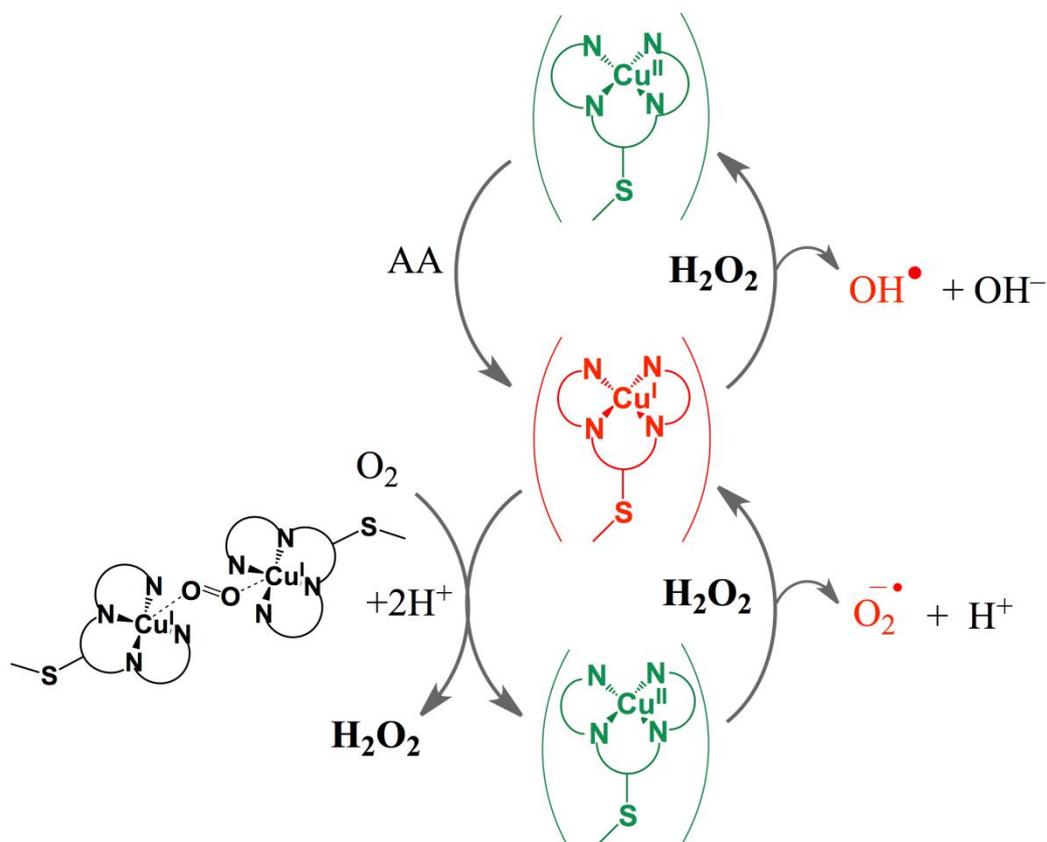
O ligante 2CP-Bz-SMe foi sintetizado e caracterizado por $^1\text{H-RMN}$. A partir destes, os respectivos complexos de cobre $[\text{Cu}(2\text{CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ e $[\text{Cu}(2\text{CP-Bz-SMe})]\text{ClO}_4$, foram obtidos. As caracterizações de espectroscopia eletrônica UV-Vis e eletroquímica mostraram que o complexo $[\text{Cu}(2\text{CP-Bz-SMe})]\text{ClO}_4$ não é estável em soluções formando, provavelmente, espécies diméricas. Por esta razão o mesmo não foi usado nos estudos de adsorção. O complexo $[\text{Cu}(2\text{CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ foi caracterizado por EPR, UV-Vis, Raman, infravermelho e eletroquimicamente, sendo consistentes com as formulações propostas. Mas, condutimetria demonstrou que um dos contra íons nitrato está coordenado no cobre, gerando uma espécie pentacoordinada, fato que foi observado ao compara os valores do g_{\perp} e g_{\parallel} do espectro (EPR – *Electron Paramagnetic Resonance*) com os valores de g do complexo $[\text{Cu}(2\text{CP})]\text{Cl}_2$, além das diferenças eletroquímicas que o complexo $[\text{Cu}(2\text{CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$ apresenta frente ao complexo $[\text{Cu}(2\text{CP-Bz-SMe})]\text{ClO}_4$.

A adsorção do complexo de cobre(II) sobre superfície de ouro foi realizada de forma espontânea por simples imersão do substrato metálico em solução aquosa do complexo. A caracterização do eletrodo de ouro modificado foi feita por eletroquímica e espectroscopia Raman de superfície (SERS – *Surface Enhanced Raman Scattering*) As técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada possibilito-nos evidenciar a adsorção do íon complexo $[\text{Cu}(2\text{CP-Bz-SMe})]^{2+}$ sobre ouro, mas também calcular a quantidade de material adsorvido, assim como também por (QCM – *Quartz Crystal Microbalance*).

Os resultados obtidos em superfície e em solução foram reunidos a fim de obter informações sobre as espécie reativa de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) geradas pelo íon complexo $[\text{Cu}(2\text{CPBzSMe})]^{2+}$. Enquanto os resultados de ressonância de plásmons de superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*) e eletroquímica sugeriram a formação de um intermediário dimérico de Cu(I) contendo oxigênio molecular como ligante ponte $[(2\text{CP-Bz-SMe})\text{Cu}]^+-\text{O}-\text{O}-^+[\text{Cu}(2\text{CP-Bz-SMe})]$. Imagens de microscopia de varredura eletroquímica (SECM – *Scanning Electrochemical Microscopy*) indicaram a geração do radical hidroxil, OH^{\bullet} . Os experimentos de captura de spin por ressonância paramagnética de elétrons (EPR –

Electron Paramagnetic Resonance) e ensaios de nuclease de DNA, os quais envolveram a utilização de inibidores de ROS, reforçaram tais conclusões mostrando que a geração do radical depende da quantidade de oxigênio e H_2O_2 . Assim, é razoável admitir um mecanismo catalítico envolvendo reações do tipo Fenton onde o complexo de cobre(II) é, inicialmente, reduzido a cobre(I). Na presença de oxigênio e em meio ácido, o composto reduzido é oxidado por H_2O_2 resultando na regeneração do complexo de partida e na formação do radical OH^\bullet que, por sua vez, deve ser a espécie ROS responsável pela clivagem do DNA. Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste projeto são resumidos na Figura 43.

Figura 43: Proposição mecanística para a geração do radical OH^\bullet a partir do processo redox do composto $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})](\text{NO}_3)_2$.



REFERENCIAS

- [1] HANNON, M. J. Supramolecular DNA recognition. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 2, p. 280-295, 2007.
- [2] TAKAHARA, P. M. et al. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. **Nature**, v. 377, n. 6550, p. 649-652, 1995.
- [3] HALL, M. D. et al. Basis for Design and Development of Platinum(IV) Anticancer Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 15, p. 3403-3411, 2007.
- [4] HARTINGER, C. G. et al. From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 5–6, p. 891-904, 2006.
- [5] WOODS, K. C. et al. Quasi-equivalence in site-specific recombinase structure and function: crystal structure and activity of trimeric cre recombinase bound to a three-way lox DNA junction1. **Journal of Molecular Biology**, v. 313, n. 1, p. 49-69, 2001.
- [6] LEMUS, L. et al. Resolution and characterization of helicate dimer and trimer complexes of 1,3-bis(9-methyl-1,10-phenanthroline-2-yl)propane with copper(I). **Dalton Transactions**, v. 42, n. 32, p. 11426-11435, 2013.
- [7] LEMUS, L. et al. Unfolding of the [Cu₂(1,3-bis(9-methyl-1,10-phenanthroline-2-yl)propane)₂]²⁺ Helicate. Coupling of the Chlorocarbon Dehalogenation to the Unfolding Process. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4023-4035, 2010.
- [8] TARDITO, S.; MARCHIO, L. Copper Compounds in Anticancer Strategies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 1325-1348, 2009.
- [9] JARA, D. H. et al. Spectroscopic Evidence in Solid and Solution of a Discrete Copper(I) Tetrahedral Complex Dimer Supported by Supramolecular Interactions. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2012, n. 10, p. 1579-1583, 2012.
- [10] HEALY, P. C. et al. Synthesis and Structural Studies of Tetrahedral [M(Ph₂P(CH=CH)PPh₂)₂]BPh₄ and [M(Ph₂P(CH₂)_nPPh₂)₂]BPh₄ (n = 2, 3) Complexes for M = Copper(I), Silver(I), and Gold(I). **Australian Journal of Chemistry**, v. 65, n. 7, p. 811-818, 2012.
- [11] PITIÉ, M. et al. Preparation of the New Bis(phenanthroline) Ligand “Clip-Phen” and Evaluation of the Nuclease Activity of the Corresponding Copper Complex. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 14, p. 3486-3489, 1998.
- [12] CHEN, J.; STUBBE, J. Bleomycins: towards better therapeutics. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 2, p. 102-112, 2005.

- [13] INCLÁN, M. et al. Modulation of DNA Binding by Reversible Metal-Controlled Molecular Reorganizations of Scorpion-like Ligands. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 23, p. 9644-9656, 2012.
- [14] LIU, F. et al. DNA-binding studies of $\text{Cu}(\text{bcp})_2^+$ and $\text{Cu}(\text{dmp})_2^+$: DNA elongation without intercalation of $\text{Cu}(\text{bcp})_2^+$. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 15, p. 6699-6704, 1993.
- [15] Baraone, G. et al. DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes structure-affinity relationships. **Coordination Chemical Reviews**. doi:10.1016/j.ccr.2013.02.023 (in press).
- [16] PITIÉ, M.; MEUNIER, B. Preparation of a Spermine Conjugate of the Bisphenanthroline Ligand Clip-Phen and Evaluation of the Corresponding Copper Complex. **Bioconjugate Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 604-611, 1998.
- [17] PITIÉ, M. et al. Targeting the DNA Cleavage Activity of Copper Phenanthroline and Clip-Phen to A·T Tracts via Linkage to a Poly-N-methylpyrrole. **Bioconjugate Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 892-900, 2000.
- [18] ROBERTAZZI, A. et al. Density Functional Theory Studies on Copper Phenanthroline Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 15, p. 5873-5881, 2007.
- [19] JAMES, B. R.; WILLIAMS, R. J. P. 383. The oxidation-reduction potentials of some copper complexes. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 2007, 1961.
- [20] PRATVIEL, G. et al. Carbon-Hydrogen Bonds of DNA Sugar Units as Targets for Chemical Nucleases and Drugs. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 34, n. 7, p. 746-769, 1995.
- [21] SIGMAN, D. S. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion. **Accounts of Chemical Research**, v. 19, n. 6, p. 180-186, 1986.
- [22] SIGMAN, D. S. et al. Chemical nucleases. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 6, p. 2295-2316, 1993.
- [23] M. PITIÉ, C. BOLDRON, G. PRATVIEL. DNA Oxidation by Copper and Manganese Complexes, in *Advances in Inorganic Chemistry*, **Elsevier Academic Press**. v. 58, 2006.
- [24] ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.
- [25] SELLERS, H. et al. Structure and binding of alkanethiolates on gold and silver surfaces: implications for self-assembled monolayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 21, p. 9389-9401, 1993.

- [26] LOVE, J. C. et al. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103-1170, 2005.
- [27] SCHWARTZ, D. K. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 107-137, 2001.
- [28] GRÖNBECK, H. et al. Thiols and Disulfides on the Au(111) Surface: The Headgroup–Gold Interaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 16, p. 3839-3842, 2000.
- [29] NOH, J. et al. High-Resolution STM and XPS Studies of Thiophene Self-Assembled Monolayers on Au(111). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 29, p. 7139-7141, 2002.
- [30] TACHIBANA, M. et al. Sulfur–Gold Orbital Interactions which Determine the Structure of Alkanethiolate/Au(111) Self-Assembled Monolayer Systems. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 49, p. 12727-12736, 2002.
- [31] DEL CARMEN GIMENEZ-LOPEZ, M. et al. Functionalized Fullerenes in Self-Assembled Monolayers. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 10977-10985, 2011.
- [32] LEI, Y.; ANSON, F. C. Mechanistic aspects of the electroreduction of dioxygen as catalyzed by copper-phenanthroline complexes adsorbed on graphite electrodes. **Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 22, p. 5003-5009, 1994.
- [33] NIMPTSCH, A. et al. Characterization of the quantitative relationship between signal-to-noise (S/N) ratio and sample amount on-target by MALDI-TOF MS: Determination of chondroitin sulfate subsequent to enzymatic digestion. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 2, p. 175-182, 2009.
- [34] UJIHARA, M. et al. Massive-exfoliation of magnetic graphene from acceptor-type GIC by long-chain alkyl amine. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 12, p. 4244-4250, 2014.
- [35] CHEN, C. H. B. et al. Artificial Nucleases. **ChemBioChem**, v. 2, n. 10, p. 735-740, 2001.
- [36] PRASAD, A. K.; MISHRA, P. C. Study of scavenging action of zingerone towards the OH radical: formation of vanillin and ferulic acid. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 18-26, 2014.
- [37] BRUNER, S. D. et al. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 859-66, 2000.

- [38] GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, n. 1–2, p. 147-163, 2003.
- [39] SHEN, H.-M. et al. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 2, p. 139-146, 1996.
- [40] VEAL, J. M.; RILL, R. L. Noncovalent DNA binding of bis(1,10-phenanthroline)copper(I) and related compounds. **Biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1132-1140, 1991.
- [41] GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. Mechanisms of the reactions of some copper complexes in the presence of DNA with superoxide, hydrogen peroxide, and molecular oxygen. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 9, p. 2244-50, 1986.
- [42] MARSHALL, L. E. et al. Cleavage of deoxyribonucleic acid by the 1,10-phenanthroline-cuprous complex. Hydrogen peroxide requirement and primary and secondary structure specificity. **Biochemistry**, v. 20, n. 2, p. 244-250, 1981.
- [43] KUWABARA, M. et al. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion: reaction with CGCGAATTCGCG and its complexes with netropsin and EcoRI. **Biochemistry**, v. 25, n. 23, p. 7401-7408, 1986.
- [44] FORMAN, H. J. et al. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 78, p. 233-235, 2015.
- [45] HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 708-721, 2014.
- [46] STOLL, S.; SCHWEIGER, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 178, n. 1, p. 42-55, 2006.
- [47] BUETTNER, G. R. Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts 1474-1528V. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 3, n. 4, p. 259-303, 1987.
- [48] AMEMIYA, S. et al. Scanning electrochemical microscopy. **Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)**, v. 1, p. 95-131, 2008.
- [49] RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. et al. Interrogation of Surfaces for the Quantification of Adsorbed Species on Electrodes: Oxygen on Gold and Platinum in Neutral Media†. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 50, p. 16985-16995, 2008.
- [50] BEAULIEU, I. et al. Biological Scanning Electrochemical Microscopy and

- Its Application to Live Cell Studies. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 5, p. 1485-1492, 2011.
- [51] ZHANG, J. et al. Interfacial electrochemical electron transfer in biology – Towards the level of the single molecule. **FEBS Letters**, v. 586, n. 5, p. 526-535, 2012.
- [52] ALIZADEH, V. et al. Electron transfer kinetics of cytochrome c immobilized on a phenolic terminated thiol self assembled monolayer determined by scanning electrochemical microscopy. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 17, p. 6224-6229, 2011.
- [53] LIANG, H.-C. et al. Dioxygen-Binding Kinetics and Thermodynamics of a Series of Dicopper(I) Complexes with Bis[2-(2-pyridyl)ethyl]amine Tridendate Chelators Forming Side-On Peroxo-Bridged Dicopper(II) Adducts. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 26, p. 5884-5894, 2000.
- [54] BOLDRON, C. et al. Acridine Conjugates of 3-Clip-Phen: Influence of the Linker on the Synthesis and the DNA Cleavage Activity of Their Copper Complexes. **Bioconjugate Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1013-1020, 2002.
- [55] HALCROW, B. E.; KERMAK, W. O. 43. Attempts to find new antimalarials. Part XXIV. Derivatives of o-phenanthroline (7 : 8 : 3? : 2?-pyridoquinoline). **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 155, 1946.
- [56] GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L. et al. A Dinuclear Copper(II) Complex with Adeninate Bridge Ligands and Prominent DNA Cleavage Activity. Structural and Spectroscopic Characterization and Magnetic Properties. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 17, p. 7178-7188, 2007.
- [57] YAO, Y. et al. Structures and properties of copper(II) and copper(I) complexes containing an ethane-bridged dimeric phenanthroline ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 31, n. 19, p. 3956-3962, 1992.
- [58] Garribba, E. e Giovanni, M. The Determination of the geometry of Cu(II) complexes: an EPR spectroscopy experimente. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 8, p. 1229-1232, 2006.
- [59] Hathaway, B. e Tomlinson, A. Copper(II) ammonia complexes. **Coordination Chemical Revivs**, v. 5, p.1, 1970.
- [60] Nakai, H. e Noda, Y. The Crystal Structure of Monoaquabis(1,10-phenanthroline)copper(II) Tetrafluoroborate [Cu(H₂O)(phen)₂](BF₄)₂ Bulletin of the Chemical Society of Japan, v. 51, n. 5, p. 1386-1390. 1978.
- [61] PITIÉ, M. et al. DNA Cleavage by Copper Complexes of 2- and 3-Clip-Phen Derivatives. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2003, n. 3, p. 528-540, 2003.
- [62] Pitié, M. et al. Preparation of the New Bis(phenanthroline) Ligand “Clip-

- Phen” and Evaluation of the Nuclease Activity of the Corresponding Copper complex. **Inorganic Chemistry**, v.37, p. 3486-3489, 1998.
- [63] Yao, Y. et al. Structures and properties of copper(II) and copper(I) complexes containing an ethane-bridged dimeric phenanthroline ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 31, p. 3956-3962, 1992.
- [64] LEVER A. B. P. Studies in physical and theoretical chemistry, 33. **Amsterdam ; New York : Elsevier**, p. 209, 1984.
- [65] ICHINAGA, A. K. et al. Charge-transfer absorption and emission of $\text{Cu}(\text{NN})^{2+}$ systems. **Inorganic Chemistry**, v. 26, n. 25, p. 4290-4292, 1987.
- [66] RADER, R. A. et al. Photostudies of 2,2'-bipyridine bis(triphenyl phosphine)copper(1+), 1,10-phenanthroline bis(triphenyl phosphine)copper(1+), and 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline bis(triphenyl phosphine)copper(1+) in solution and in rigid, low-temperature glasses. Simultaneous multiple emissions from intraligand and charge-transfer states. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, n. 19, p. 5906-5912, 1981.
- [67] HOUSECROFT C. E.; Sharpe, A. G. In **Inorganic Chemistry**; **Pearson Education Limited**, 2^o Ed.; v. 3, p 572, 2008.
- [68] PITIÉ, M. et al. DNA Cleavage by Copper Complexes of 2- and 3-Clip-Phen Derivatives. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2003, n. 3, p. 528-540, 2003.
- [69] ZHOU, L.; NICHOLAS, K. M. Imidazole Substituent Effects on Oxidative Reactivity of Tripodal(imid)₂(thioether)CuI Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4356-4367, 2008.
- [70] POWERS, E. T.; KELLY, J. W. Medium-Dependent Self-Assembly of an Amphiphilic Peptide: Direct Observation of Peptide Phase Domains at the Air–Water Interface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 4, p. 775-776, 2001.
- [71] MARTINEZ-ALANIS, P. R. et al. Copper versus thioether-centered oxidation: mechanistic insights into the non-innocent redox behavior of tripodal benzimidazolylaminothioether ligands. **Chemistry**, v. 19, n. 19, p. 6067-79, 2013.
- [72] HOPPE, T. et al. An Approach to Model the Active Site of Peptidglycine- α -hydroxylating monooxygenase (PHM). **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 639, n. 8-9, p. 1504-1511, 2013.
- [73] GIROLAMI, G. S. et al. In **Synthesis and technique in inorganic chemistry: a laboratory manual**; **University Science Books**. pp 272, 1999.
- [74] HOWELL, S. L.; GORDON, K. C. Spectroscopic and Density Functional Theory Studies of 1,10-Phenanthroline, Its Radical Anion, and

- [Cu(Phen)(PPh₃)₂]⁺. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 13, p. 2536-2544, 2004.
- [75] SZAFRANSKI, C. A. et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Aromatic Thiols and Disulfides on Gold Electrodes. **Langmuir**, v. 14, n. 13, p. 3570-3579, 1998.
- [76] PODSTAWKA E. Part II: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Investigation of Methionine Containing Heterodipeptides Adsorbed on Colloidal Silver. **Appl. Spectrosc.** V 58, p. 581-90, 2004.
- [77] HOLZE, R. The adsorption of thiophenol on gold - a spectroelectrochemical study. **Phys Chem Chem Phys**, 2015.
- [78] DIÓGENES, I. C. N. et al. A study of pyridinethiolate derivative complexes adsorbed on gold by surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 605, n. 1, p. 1-7, 2007.
- [79] ANSORENA, P. et al. Comparative analysis of QCM and SPR techniques for the optimization of immobilization sequences. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, n. 2, p. 667-672, 2011.
- [80] SAUERBREY, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. **Zeitschrift für Physik**, v. 155, n. 2, p. 206-222, 1959.
- [81] STENBERG, E. et al. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 143, n. 2, p. 513-526, 1991.
- [82] KIM, S. et al. Amine Oxidative N-Dealkylation via Cupric Hydroperoxide Cu-OOH Homolytic Cleavage Followed by Site-Specific Fenton Chemistry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 8, p. 2867-2874, 2015.
- [83] KIM, S. et al. A N₃S(thioether)-Ligated CuII-Superoxo with Enhanced Reactivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 8, p. 2796-2799, 2015.
- [84] PRIGGE, S. T. et al. Dioxygen Binds End-On to Mononuclear Copper in a Precatalytic Enzyme Complex. **Science**, v. 304, n. 5672, p. 864-867, 2004.
- [85] CHEN, P.; SOLOMON, E. I. Oxygen Activation by the Noncoupled Binuclear Copper Site in Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase. Reaction Mechanism and Role of the Noncoupled Nature of the Active Site. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 15, p. 4991-5000, 2004.
- [86] CHEN, P. et al. Oxygen Activation by the Noncoupled Binuclear Copper Site in Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase. Spectroscopic

Definition of the Resting Sites and the Putative Cu(II)-OOH Intermediate. **Biochemistry**, v. 43, n. 19, p. 5735-5747, 2004.

- [87] DE SOUSA, J. R. et al. Characterization of a 1,4-dithiane gold self-assembled monolayer: an electrochemical sensor for the cyt-c redox process. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 543, n. 1, p. 93-99, 2003.
- [88] DE SOUSA, J. R. et al. Synthesis, characterization, and SAMs electroactivity of ruthenium complexes with sulfur containing ligands. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 692, n. 17, p. 3691-3699, 2007.
- [89] DE F. PAULO, T. et al. Thermodynamic, Kinetic, Surface pKa, and Structural Aspects of Self-Assembled Monolayers of Thio Compounds on Gold. **Langmuir**, v. 28, n. 51, p. 17825-17831, 2012.
- [90] RUBIM, J. C. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) on silver electrodes as a technical tool in the study of the electrochemical reduction of cyanopyridines and in quantitative analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 220, n. 2, p. 339-350, 1987.
- [91] KUMAR, R. S. et al. Surfactant-cobalt(III) complexes: Synthesis, critical micelle concentration (CMC) determination, DNA binding, antimicrobial and cytotoxicity studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 1, p. 117-127, 2009.
- [92] 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.
- [93] SELVAKUMAR, B. et al. Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: The novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 3, p. 316-330, 2006.
- [94] SHAHABADI, N. et al. DNA Binding and Gel Electrophoresis Studies of a New Silver(I) Complex Containing 2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthroline Ligands. **DNA and Cell Biology**, v. 30, n. 3, p. 187-194, 2010.
- [95] CUSUMANO, M. et al. DNA Interaction of Platinum(II) Complexes with 1,10-Phenanthroline and Extended Phenanthrolines. **Inorganic Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 230-235, 2006.
- [96] SCHMECHEL, D. E. V.; CROTHERS, D. M. Kinetic and hydrodynamic studies of the complex of proflavine with poly A·poly U. **Biopolymers**, v. 10, n. 3, p. 465-480, 1971.

- [97] IZUMRUDOV, V. A. et al. Ethidium Bromide as a Promising Probe for Studying DNA Interaction with Cationic Amphiphiles and Stability of the Resulting Complexes. **Langmuir**, v. 18, n. 26, p. 10348-10356, 2002.
- [98] LAKOWICZ, J. R.; WEBER, G. Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules. **Biochemistry**, v. 12, n. 21, p. 4161-4170, 1973.
- [99] ACETO, S. et al. Nicking activity on pBR322 DNA of ribosome inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L. leaves. **Biol Chem**, v. 386, n. 4, p. 307-17, 2005.
- [100] MANCINI, S.; IMLAY, J. A. The induction of two biosynthetic enzymes helps *Escherichia coli* sustain heme synthesis and activate catalase during hydrogen peroxide stress. **Molecular Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 744-763, 2015.
- [101] ARUOMA, O. I. et al. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 22, p. 13024-13028, 1989.
- [102] ARUOMA, O. I. et al. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 34, p. 20509-20512, 1989.
- [103] DIZDAROGLU, M. et al. Modification of bases in DNA by copper ion-1,10-phenanthroline complexes. **Biochemistry**, v. 29, n. 36, p. 8447-8451, 1990.
- [104] LAI, X. et al. HMME combined with green light-emitting diode irradiation results in efficient apoptosis on human tongue squamous cell carcinoma. **Lasers in Medical Science**, p. 1-8, 2015.
- [105] ARUOMA, O. I. et al. **Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide.** **Biochemical Journal**, v. 273, p. 601-604, 1991.
- [106] HALLIWELL, B.; Gutteridge, J., **Free Radicals in Biology and Medicine.** p 888, 2007.
- [107] JEYALAKSHMI, K. et al. DNA/protein binding, DNA cleavage, cytotoxicity, superoxide radical scavenging and molecular docking studies of copper(ii) complexes containing N-benzyl-N[prime or minute]-aryl-N[prime or minute][prime or minute]-benzoylguanidine ligands. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 2, n. 8, p. 780-798, 2015.
- [108] BARRIGA-GONZALEZ, G. et al. Spin Trapping: An Essential Tool for the Study of Diseases Caused by Oxidative Stress. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 484-495, 2015.

- [109] EATON, S. S.; EATON, G. R. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. In: (Ed.). **Characterization of Materials**: John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [110] MOTTLEY, C. et al. [¹⁷O]oxygen hyperfine structure for the hydroxyl and superoxide radical adducts of the spin traps DMPO, PBN and 4-POBN. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 141, n. 2, p. 622-628, 1986.