**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química**

CATERINA GRUENWALDT CUNHA MARQUES NETTO

**Desenvolvimento de catalisadores e sistemas
enzimáticos para a redução do CO₂**

Versão Corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
01/03/2013

CATERINA GRUENWALDT CUNHA MARQUES NETTO

**Desenvolvimento de catalisadores e sistemas
enzimáticos para a redução do CO₂**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Química*

Orientador: Prof. Dr. Henrique Eisi Toma

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Marques Netto, Caterina Gruenwaldt Cunha
M886d Desenvolvimento de catalisadores e sistemas enzimáticos
para a redução do CO₂ / Caterina Gruenwaldt Cunha Marques
Netto. -- São Paulo, 2013.
326p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Toma, Henrique Eisi

1. Catálise : Química inorgânica 2. Compostos organometálicos :
Catálise I. T. II. Toma, Henrique Eisi, orientador

546.121 CDD

*Aos meus pais e meu irmão:
Manoel, Marília e Érico.*

AGRADECIMENTOS

"A coisa não está nem na partida e
nem na chegada, mas na travessia..."

João Guimarães Rosa

... e a travessia só pôde ser maravilhosa por conta destas pessoas:

Agradeço profundamente aos meus pais Marília e Manoel e meu irmão Érico pelo apoio incondicional que eles me deram durante toda a minha vida e principalmente durante o período em que esta tese foi feita.

Ao Rimantas por ser meu apoio e fonte de risadas até mesmo nos piores momentos e decisões difíceis.

Ao prof. Henrique E. Toma por ter me dado a oportunidade de trabalhar com o meu “emplastro Brás-Cubas”.

Ao prof. Leandro H. Andrade por ter me acolhido em seu laboratório como se eu fizesse parte de seu laboratório.

Ao prof. Benjamin List do laboratório de Organocatálise do Instituto Max-Planck por ter apertado o gatilho na minha mente para as reações com gás carbônico.

Ao prof. Koiti Araki pelas discussões científicas.

À prof. Anamaria Alexiou, Aninha, por me ensinar todas as técnicas espectroscópicas antes mesmo de eu entender o que era um espectro, e também pelas discussões filosófico-científicas.

Agradeço ao Rodrigo Heyder do laboratório do prof. Reinaldo Bazito (IQ-USP) por me ajudar nos experimentos sob alta-pressão.

Aos meus amigos de infância Cegal, Célia, Fabiola, Ito, Lucas, Marina, Marta e Viviane por serem eternos amigos.

Do laboratório LQSN, em especial, ao Vitor por ser uma pessoa tão especial, estar sempre disposto a ajudar e ser um amigo tão querido.

Aos amigos André, Daniel, Paulo e Tiago pela amizade e brincadeiras.

Aos demais colegas do laboratório LQSN, antigos e atuais, Akira, Alceu, Bernardo, Daiana, Delmárcio, Izilda, Manuel, Marcelo, Marcos, Mayara, Rebeca, Roberta, Robson, Rodrigo, Sabrina, Sérgio, Ulisses e Zuin.

Do laboratório LQFB, em especial, à Priscila pelas discussões sintéticas e, sobretudo pela amizade.

Aos colegas do LQFB, Alexandre, Camila, Dayvson, Edna, Joel, Lidiane, Piovan, Thaís e Thiago.

Do laboratório de Organocatálise do Instituto Max-Planck, agradeço aos amigos Guillaume, Kristina, Michael, Nolwenn, Olga e Steffen por tornarem a minha estadia em Mülheim inesquecível.

Do IQ-USP agradeço aos amigos Flávia, Vinicius, Bruno, Daniel R., Layara, Luiza e Mateus por aturarem meus choros e minhas risadas infinitas.

À Central Analítica pela paciência com meus compostos.

À FAPESP pela bolsa de doutorado.

Agradeço a todas as outras pessoas que de alguma maneira me ajudaram a passar pelos obstáculos que a cada dia nos aparecem, principalmente em momento de tese.

RESUMO

Netto, C.G.C.M, **Desenvolvimento de catalisadores e sistemas enzimáticos para a redução do CO₂**. 2013. 310 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O gás carbônico é a fonte primária de carbono ideal para se obter novos compostos, devido principalmente à sua abundância, atoxidade e ao fato de ser renovável. Desta forma, novos métodos de introduzir o CO₂ em rotas sintéticas se fazem necessários. Dentre os possíveis métodos, nesta tese foram estudadas duas rotas diferentes de utilização do gás carbônico: uma, empregando complexos bimetálicos como catalisadores da inserção do CO₂ em alcenos e alcanos e outra utilizando enzimas imobilizadas em partículas magnéticas, atuantes no ciclo de redução do CO₂ ao metanol.

Os complexos bimetálicos foram construídos a partir do ligante de ponte, bis-pirrolidyl-fenil (BPP) incorporando grupos difenilmetanol e difenilfosfino em suas arquiteturas moleculares. Sua inspiração partiu de sistemas biomiméticos para a redução do CO₂, e foi direcionada para a carboxilação de hidrocarbonetos. Nas reações de acoplamento carbono-carbono, observou-se que com o iodeto de metila, os complexos foram capazes de transformar o gás carbônico e produzir acetato de metila. Já nas reações com 1-deceno, isobutano e iso-octano, apenas três complexos se mostraram eficientes: BPP(ONi,ONi), BPP(OZn,OPPh₂Pd) e BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd).

Na rota enzimática, fez-se uso de enzimas imobilizadas do tipo desidrogenase e três tipos de nanopartículas magnéticas (MagNP) como suporte (MagNP-APTS, MagNP@SiO₂-APTS e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose, APTS = aminopropiltrimetoxissilano). Observou-se que para a imobilização da álcool desidrogenase e da formaldeído desidrogenase, o melhor suporte foi a MagNP@SiO₂-APTS, enquanto para a formato desidrogenase, o melhor suporte de imobilização foi a MagNP-APTS. Para a glutamato desidrogenase, um sistema com imobilização via múltiplos pontos, como na MagNP-APTS/Glioxil-Agarose, conduziu a um melhor desempenho. Os melhores sistemas enzima-suporte foram utilizados em uma reação multi-enzimática com CO₂, NADH e glutamato para a obtenção de formaldeído e metanol.

Os dois métodos de redução do gás carbônico se mostraram capazes de realizar o objetivo da tese, que é a transformação do CO₂ em produtos de maior valor agregado.

Palavras-chave: Catálise, CO₂, Complexos bimetálicos, Enzimas, Imobilização

ABSTRACT

Netto, C.G.C.M., **Development of catalysts and enzymatic systems for CO₂ reduction**. 2013. 310p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CO₂ is a primary world carbon source readily available for the production of new compounds, under sustainable conditions due to its great abundance and non-toxic, renewable characteristics. Hence, there is a compulsive interest to develop new methodologies capable of introducing carbon dioxide in the chemical synthetic routes. Among the many possible alternatives, two different strategies were pursued this thesis: one using bimetallic complexes as catalysts, and the other one using enzymes supported on superparamagnetic nanoparticles.

The bimetallic complexes were based on the bridging bis-pyrrolidyl-phenol (BPP) architecture encompassing diphenylmethanol and diphenylphosphino groups. They were inspired in biomimetic systems for the chemical reduction of CO₂ and employed in the carboxylation of hydrocarbons. In such carbon-carbon coupling reactions, the bimetallic complexes were able to catalyse the reaction between CO₂ and methyl iodide in order to obtain methyl acetate. However, in the reaction with 1-decene, isobutene and iso-octane, only three of them were efficient: BPP(ONi,ONi), BPP(OZn,OPPh₂Pd) and BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd).

In the studies focusing on immobilized enzymes, dehydrogenase-like enzymes and three different kind of magnetic particles (MagNP) were employed (MagNP-APTS, MagNP@SiO₂-APTS and MagNP-APTS/Glioxyl-Agarose, APTS = aminopropyltrimethoxysilane). The best immobilization support for alcohol dehydrogenase and formaldehyde dehydrogenase was MagNP@SiO₂-APTS, while for formate dehydrogenase the best immobilization support was MagNP-APTS. For glutamate dehydrogenase a multi-point immobilization was required, turning MagNP-APTS/Glioxyl-Agarose the best catalytic support. These enzyme-support systems were used in a multi-enzymatic reaction using CO₂, NADH and glutamate in order to obtain methanol and formaldehyde.

Both CO₂ reduction methods were successfully explored, and the results fulfilled the major objective of this thesis, which is the conversion of CO₂ into higher value products.

Keywords: Catalysis, CO₂, bimetallic complexes, enzymes, immobilization

Nomes e fórmulas de compostos

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Nome
$[\alpha]_D$	Rotação específica
δ	Deslocamento químico
ε	Absortividade molar
μ_B	Magnéton de Bohr
k_{cat}	Constante de velocidade
ADH	Álcool desidrogenase
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
OAc	Acetato
APTS	Aminopropil-trietóxi-silano
AuNP	Nanopartículas de ouro
C-C	Carbono-Carbono
CMC	Carboxi-metil-celulose
DPV	Voltametria de pulso diferencial
EC(X.Y.Z.W)	Classificação numérica de enzimas ¹
eq.	equivalente
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ESI	Ionização por elétron-spray
eV	Elétron-volt
F_{ext}	Força externa
FDH	Formato desidrogenase
FaIDH	Formaldeído desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GTP	Guanosina trifosfato
HOMO	Orbital ocupado de maior energia
K_c	Constante de comproporcionamento
K_d	Constante de dissociação

K_M	Constante de Michaelis-Menten
LMCT	Transição de carga ligante-metal
LUMO	Orbital desocupado de menor energia
MLCT	Transição de carga metal-ligante
MagNP	Nanopartículas de magnetita
MagNP@SiO₂	Nanopartículas de magnetita recobertas com sílica
MS	Espectroscopia de massas
<i>n</i>	Coeficiente de Hill
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
S_{0.5}	Concentração de substrato em que metade dos sítios enzimáticos estão preenchidos
UV	Ultravioleta

Sumário

1. Introdução.....	19
1.1 O gás carbônico	20
1.2 O aquecimento global	21
1.2.1 Teoria dos gases estufa	22
1.2.2. Teorias suportando outras causas como responsáveis pelo aquecimento global.....	25
1.3 Técnicas de remoção do CO ₂	27
1.3.1 <i>Captura e estoque</i>	27
1.3.2 <i>Aumento dos sorvedouros biológicos</i>	28
1.3.3 <i>Uso do CO₂ como recurso natural</i>	29
2. Objetivos gerais	33
Capítulo 1.	34
Complexos metálicos para a redução do CO ₂	34
3. Introdução.....	35
3.2 Os complexos	36
3.2.1 Modos de coordenação do CO ₂	38
3.2.2 Complexos biológicos capazes de ativar o CO ₂	40
3.2.3 Complexos sintéticos para ativar o CO ₂	43
3.3 Complexos capazes de ativar ligações C-H.....	46
3.4 Complexos bimetálicos para acoplar o CO ₂ em alcanos	47
4. Objetivos específicos	49
5. Parte Experimental.....	50
5.1 Materiais e métodos.....	50
5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho	50
5.1.2 Espectroscopia Uv-Vis	51
5.1.3 Termogravimetria	51
5.1.4 Espectroscopia de fluorescência.....	51
5.1.5 Ressonância Magnética Nuclear	51
5.1.6 Determinação da rotação ótica	52
5.1.7 Espectrometria de massas	52
5.1.8 Voltametria cíclica.....	52
5.1.9 Espectroeletrólise.....	52
5.1.10 Cromatografia Gasosa.....	52
5.1.11 EPR.....	53

5.2 Sínteses	53
5.2.1 Síntese de benzil 2-(hidroxidifenilmetil)pirrolidina-1-carboxilato - composto (4)	53
5.2.2 Síntese de difenil(pirrolidin-2-il)metanol – composto (5)	56
5.2.3 Síntese do composto (6)	57
5.2.4 Síntese do composto (7)	58
5.2.5 Síntese dos compostos (9) e (10)	59
5.2.6 Síntese dos compostos (11) e (12)	61
5.2.7 Síntese dos compostos (13) e (14)	63
5.2.8 Síntese dos complexos (15)-(21)	64
5.2.9 Reações catalíticas	66
6. Resultados e Discussão	71
6.1 Os ligantes	71
6.2 Os complexos	72
6.2.1 BPP(OC _o ,OC _o)	72
6.2.2 BPP(ONi,ONi)	81
6.2.3 BPP(OMn,OMn)	92
6.2.4 BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)	98
6.2.5 BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	106
6.2.6 BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	113
6.2.7 BPP(OC _o ,OPPh ₂ Pd)	119
6.3 Comportamento catalítico	124
6.3.1 Atividades miméticas de enzimas	124
6.3.2 Acoplamento C-C	131
7. Conclusão do capítulo 1	149
Capítulo 2.	152
Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas para a redução do CO ₂	152
8. Introdução	153
8.1 Enzimas	153
8.2 Suportes	155
8.2.1 Nanopartículas Magnéticas	156
8.3 Imobilização	160
8.4 Enzimas a serem imobilizadas	163
8.4.1 Formato desidrogenase (FDH)	164
8.4.2 Formaldeído desidrogenase (FaldH)	165
8.4.3 Álcool desidrogenase (ADH)	166
8.4.4 Glutamato desidrogenase (GDH)	167

9. Objetivos específicos	168
10. Parte experimental.....	169
10.1 Materiais e Métodos	169
10.2 Sínteses das nanopartículas.....	169
10.2.1 Síntese de Nanopartículas de Magnetita.....	169
10.2.2 Recobrimento das nanopartículas com sílica	170
10.2.3 Silanização das nanopartículas.....	170
10.2.4 Síntese da MagNP-Agarose	171
10.2.5 Síntese da MagNP@CMC	172
10.2.6 Ativação da superfície da MagNP@CMC.....	172
10.2.7 Síntese da Glioxil-agarose	172
10.3 Imobilizações	173
10.3.1 Imobilização da álcool desidrogenase de <i>Sacharomyces cerevise</i>	173
10.3.2 Imobilização da formaldeído desidrogenase de <i>Pseudomonas putida</i>	174
10.3.2 Imobilização da formato desidrogenase de <i>Candida boidinii</i>	176
10.3.4 Imobilização da glutamato desidrogenase de fígado bovino	178
10.4 Cinéticas	180
10.4.1 Conversão de etanol a acetaldeído.....	180
10.4.2 Conversão de formaldeído a metanol	180
10.4.3 Conversão de formaldeído a formato	181
10.4.4 Conversão de formato a formaldeído	181
10.4.5 Conversão de formato a CO ₂	181
10.4.6 Conversão de CO ₂ a formato.....	182
10.4.7 Conversão de glutamato a α -ceto-glutarato	182
10.5 Estudos de reciclagem	183
10.5.1 Reciclagem dos sistemas com ADH imobilizada.....	183
10.5.2 Reciclagem dos sistemas com FalDH imobilizada	183
10.5.3 Reciclagem dos sistemas com FDH imobilizada	184
10.6 Estudos termodinâmicos	184
10.6.1 Sistemas com ADH	184
10.6.2 Sistemas com FalDH	185
10.6.3 Sistemas com FDH	185
10.6.3 Sistemas com GDH	185
10.7 Análises de produtos das reações enzimáticas.....	186
10.7.1 Determinação do consumo de formaldeído	186
10.7.2 Determinação do consumo do glutamato.....	186
10.7.3 Determinação da formação de metanol	186

10.8 Ensaio diversos	187
10.8.1 Ensaio Raman com AuNPs	187
10.8.1 Digestão trípica da GDH.....	187
11. Resultados e Discussão	188
11.1 Das nanopartículas	188
11.2 Imobilização da ADH.....	192
11.2.1 Variação da quantidade de nanopartícula adicionada.....	192
11.2.2 Variação da quantidade de glutaraldeído adicionado	194
11.2.3 Variação do tempo de imobilização	194
11.2.4 Imobilização por múltiplos-pontos (MagNP-Agarose)	195
11.2.5 Caracterização dos sistemas	196
11.3 Imobilização da FDH	215
11.3.1 Variação da quantidade de nanopartícula adicionada.....	215
11.3.2 Variação da quantidade de agente acoplante	217
11.3.3 Variação do tempo de imobilização	218
11.3.4 Variação da quantidade de MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH utilizada na catálise	220
11.3.5 Caracterização dos sistemas	221
11.3.6 FDH e catálise	225
11.4 Imobilização da FalDH.....	232
11.4.1 Variação da quantidade de nanopartícula adicionada.....	232
11.4.2 Variação da quantidade de agente acoplante	234
11.4.3 Variação do tempo de imobilização	234
11.4.5 Caracterização dos sistemas	235
11.5 Imobilização da GDH.....	248
11.5.1 Variação da quantidade de nanopartícula adicionada.....	248
11.5.2 Variação da quantidade de agente acoplante utilizado	250
11.5.3 Variação do tempo de imobilização	252
11.5.4 Caracterização dos sistemas	252
11.5.5 GDH e a catálise	260
11.6 Catálise multi-enzimática	273
11.7 Filosofando: o que é o tempo ótimo de imobilização?.....	276
12. Conclusão específica	284
13. Conclusões gerais.....	287
14. Referências	288
15.APENDICE	298
15.1.Ligante simétrico, BPP(OH,OH).....	298

15.2 Ligante simétrico, BPP(OPPh ₂ ,OPPh ₂)	308
15.3 Ligante assimétrico, BPP(OH,OPPh ₂).....	318
15.4 Complexos - espectro de massas	324
Anexos.....	327

Nomes e fórmulas estruturais

Composto	Nome IUPAC	Fórmula estrutural
BPP(OH,OH)	((2S,2'R)-1,1'-((2-hidroxi-5-metil-1,3-fenileno)bis(metileno))bis(pirrolidina-2,1-diil))bis(difenilmetanol)	
BPP(OH,OPPh ₂ Pd)	2-(((R)-2-(((difenilfosfino)oxi)difenilmetil)pirrolidin-1-il)metil)-6-(((S)-2-(hidroxidifenilmetil)pirrolidin-1-il)metil)-4-metilfenol	
BPP(OPPh ₂ ,OPPh ₂)	2-(((R)-2-(((difenilfosfino)oxi)difenilmetil)pirrolidin-1-il)metil)-6-(((S)-2-(((difenilfosfino)oxi)difenilmetil)pirrolidin-1-il)metil)-4-metilfenol	
BPP(ONi,ONi)	$[\text{Ni}-\mu\text{-O}-\text{Ni}(\text{BPP})(\text{OAc})_3]^{2-}$

“Com efeito, um dia de manhã, estando a passear na chácara, pendurou-se-me uma idéia no trapézio que eu tinha no cérebro. Uma vez pendurada, entrou a bracejar, a pernear, a fazer as mais arrojadas cabriolas de volatim, que é possível crer. Eu deixei-me estar a contemplá-la. Súbito, deu um grande salto, estendeu os braços e as pernas, até tomar a forma de um X: decifra-me ou devoro-te”

Machado de Assis, Memórias Póstumas de Brás Cubas.

1. Introdução

Esta primeira parte da introdução possui um caráter informativo quanto à questão ambiental do aquecimento global, caso não haja interesse do leitor sobre este tema, vá para o item 1.3.

O ser humano após se persuadir de que todas as coisas existentes na natureza foram feitas para ele, acabou por agregar importância e valor ao que lhes é útil.¹ Consequentemente gerou-se o conceito de recurso natural definido como qualquer elemento ou aspecto da natureza que esteja em demanda e seja passível de uso ou esteja sendo usado direta ou indiretamente pelo Homem como forma de satisfação de suas necessidades físicas e culturais, em determinado tempo e espaço.²

Os combustíveis fósseis e a biomassa são utilizados pelo Homem de maneira desenfreada para a geração de produtos, energia e espaço físico (na queima de florestas e para plantações), porém, esquecemo-nos da essência subversiva da natureza, na qual, toda *causa* considera um *efeito* e *vice-versa*.¹

A causalidade existente na natureza pode ser considerada como uma regularidade. Ou seja, se A é causa de B, A e B aconteceram e foram subsequentes e sempre que A ocorrer, B ocorrerá também. Porém existe outro conceito, chamado de

causação, o qual considera a causalidade como relação substancial, associando-se ao realismo científico, desta forma, existe uma coisa que passa de A para B e se não ocorresse A, não haveria B.³

Esta maneira de pensar nos remete à possibilidade de descobrirmos a *causa* de um determinado *efeito*, desta forma uma solução plausível para o *efeito* pode ser oferecida. Para isto, inicialmente tem-se que observar qual o efeito de que estamos tratando, para então supor hipóteses de causas, avaliar qual modelo se adéqua melhor para a situação e finalmente seguir para a resolução do problema.

1.1 O gás carbônico

O gás carbônico é uma molécula linear e apolar que nas condições normais de temperatura e pressão se apresenta como um gás incolor e inodoro.⁴

A descoberta do gás carbônico iniciou com Johanu Baptista Van Helmont (1577-1644), o qual percebeu que ao queimar o carvão e substâncias orgânicas, um gás era gerado, a este gás foi dado o nome de *spiritus silvestris*. Van Helmont foi quem introduziu a palavra “gás”, derivada do grego “caos”.⁵ Ao fazer seus experimentos, ele observou que o *spiritus silvestris* não era apenas gerado a partir da combustão, mas também pela fermentação do vinho e da cerveja e pela ação de ácidos nas conchas.⁶

O fato de o gás carbônico estar fixado em algumas substâncias fez com que Joseph Black (1728-1799) o estudasse para solucionar os problemas relativos às substâncias que ora apresentavam-se em seu estado livre, ora em seu estado fixado nos corpos. Joseph Black foi o primeiro a estabelecer a relação entre o CO₂ e os álcalis fracos e fortes.

Na época, a mineração e o transporte eram necessidades econômicas e então James Watt juntamente com J.Black e J. Hutton fizeram o aperfeiçoamento da máquina

a vapor.⁷ As novas máquinas e organizações inovadoras de produção aumentaram dramaticamente a eficiência de produção de mercadorias⁸, fazendo com que os praticantes destas tecnologias revolucionárias vissem vantagens em setores chave da indústria, acumulando rapidamente riqueza.

Com o aumento da demanda por bens, a produção incentivou os pensadores a desenvolver soluções mecânicas e com isso acelerando as melhorias tecnológicas. Desde então, o desenvolvimento de novas tecnologias aumentou acarretando em um modo de vida “moderno” em que o CO₂ é constantemente liberado na atmosfera.

Ironicamente, o gás carbônico e seu descobridor têm um pé no desenvolvimento da humanidade e outro no aquecimento global, já que a máquina a vapor surgiu para substituir as máquinas dependentes da força humana ou animal.

1.2 O aquecimento global

Em ciência sempre existirão teorias opostas como maneira de gerar discussões e melhorar a qualidade científica. Neste quesito, o aquecimento global não foge a esta regra, tendo mudado o conceito de mudanças climáticas ao longo dos anos: em 1896, Arrhenius levantou a questão: “A temperatura na terra sofre influência pela presença de gases que absorvem calor na atmosfera?” a qual ele respondeu fazendo alusão a uma estufa, em que a atmosfera faria o papel do vidro, pois tanto a atmosfera quanto o vidro permitem que os raios solares os atravessem, mas mantém dentro do espaço, os raios refletidos pelo chão. Arrhenius chegou à conclusão de que a Terra sofreria um aumento de 5 a 10°C se a concentração de gás carbônico na atmosfera dobrasse e que para a Terra entrar em um novo período glacial, a concentração de gás carbônico atmosférico deveria diminuir para 0.62 a 0.55 da sua concentração na época.⁹

Passaram-se anos associando o aumento da concentração de gás carbônico na atmosfera com um aquecimento terrestre, porém, na metade da década de 70 diversos artigos surgiram dizendo sobre um resfriamento global, principalmente devido a medidas de temperatura no hemisfério norte em que se verificava uma diminuição da temperatura das últimas três décadas (gwynne, 1975), nestes artigos havia a associação do aumento de CO₂ atmosférico às diminuições de temperatura. (bryson and Dittberner 1979)

Mais a frente, com a inserção da física e da química nos modelos matemáticos a previsão para um aquecimento e não um resfriamento foi reintroduzida na ciência e então verificaram que existem três meios fundamentais para mudar o balanço de radiação da Terra:

- Mudando a quantidade de radiação solar que entra na Terra (pelas mudanças de sua órbita)
- Mudando a fração solar que é refletida, chamado efeito albedo (aumento de nuvens, partículas atmosféricas ou vegetação)
- Mudando a quantidade de radiação de ondas longas que a Terra emite de volta para o espaço (modificando a concentração dos gases estufa)

1.2.1 Teoria dos gases estufa

Na teoria dos gases estufa admite-se um gás estufa aquele que apresenta elevada absorção na região do infravermelho e é transparente à maior parte da radiação solar incidente, porém, é um absorvente efetivo da radiação que está sendo refletida de volta para a atmosfera, ou seja, no comprimento de onda entre 8 e 12 μm . A radiação de corpo negro da Terra possui seu máximo nessa região de comprimento de onda e a água é uma molécula pouco eficiente na absorção desta região espectral. ¹⁰

Dentre os gases estufa que seriam responsáveis pelas mudanças climáticas estão inclusos o óxido nitroso, o metano, os clorofluorcarbonos (CFCs) e o CO_2 . Apesar dos primeiros possuírem um efeito estufa maior que o CO_2 , o último é responsável por aproximadamente 80% das emissões de gases estufa, o que o torna o maior responsável pelas mudanças climáticas.

A molécula de CO_2 absorve a energia que é refletida pela Terra e passa a um estado vibracional de maior energia. Quando o nível energético fundamental é restabelecido, energia em um comprimento de onda maior é liberada e parte desta, volta para a Terra, ajudando no controle da temperatura terrestre e permitindo a existência de vida no Planeta. Este atributo do gás carbônico é essencial à vida, porém também pode acarretar em mudanças evolutivas da vida na Terra.

Apesar dos cálculos de Arrhenius⁹ estarem errados e superestimados, surgiu o pensamento de que o aquecimento global é iminente e tudo o que escutamos a respeito é de que *“O planeta Terra aquecerá 4°C e isto acarretará no degelo das calotas polares, consequentemente desequilibrará as correntes marinhas e os locais quentes serão frios e os locais frios serão quentes. O oceano se acidificará e com isso o ecossistema marinho se modificará, havendo a dissolução de corais e carapaças de animais marinhos. O ecossistema terrestre também se modificará, a agricultura se afetará de maneira a termos de modificar o sistema atualmente utilizado. E tudo isto é culpa do gás carbônico”*.

O gás carbônico é o atual vilão do aquecimento global devido ao seu ciclo biogeoquímico, em que existem diversos reservatórios de gás carbônico: na terra o CO_2 é absorvido pela vegetação e estocado em plantas e húmus, apresentando uma magnitude similar à da atmosfera com tempo de troca de 30 a 40 anos. O oceano proporciona um reservatório bem maior, com um potencial de estoque 60 vezes maior

que o da atmosfera. A transferência do oceano profundo para as camadas mais altas da atmosfera necessita de 5 a 10 anos para ser realizada, sendo, portanto um processo lento, levando séculos antes que os oceanos profundos alcancem o equilíbrio com qualquer novo nível de concentração atmosférica de CO_2 .¹¹

Assim, podemos dizer que o ciclo biogeoquímico é composto de dois ciclos: um rápido e outro lento. O ciclo rápido envolve a associação do CO_2 atmosférico pelas plantas para a formação de açúcares e posterior uso da matéria orgânica vegetal para obtenção de energia, enquanto o ciclo lento envolve a absorção do CO_2 pelos oceanos, transformação em hidrogenocarbonatos e carbonatos.¹² Com a injeção excessiva da reserva de CO_2 do ciclo lento no ciclo rápido há um acúmulo de gás carbônico na atmosfera, já que as plantas não conseguem convertê-lo tão rapidamente quanto nós o liberamos.

A maior pressão parcial atmosférica de CO_2 faz com que haja um aumento da dissolução deste gás nos oceanos, ocasionando na geração de ácido carbônico e consequentemente na acidificação oceânica. Desde a época pré-industrial, os oceanos têm absorvido aproximadamente metade do gás carbônico produzido pela queima de combustíveis fósseis e produção de cimento. Os cálculos são baseados nas medidas da superfície dos oceanos, indicando que houve uma mudança de 0,1 unidade de pH na água do mar, um equivalente a um aumento de 30% na concentração dos íons hidrônio.¹³ Com a acidificação oceânica espera-se a extinção de alguns ecossistemas marinhos, principalmente o dos recifes de coral e outras espécies marinhas que podem ser afetadas em seu crescimento e reprodução e decair em número e/ou tamanho¹³.

Há também o aumento da temperatura global, ocasionando num degelo das calotas polares e como resultado há um aumento do nível do mar. O aumento do nível do mar acarreta na intensificação de desastres naturais. Por outro lado, o aumento da

temperatura global adiciona mais vapor de água na atmosfera, o que resulta em um aumento na quantidade de nuvens, e então, uma quantidade substancial de água condensada estaria disponível. As nuvens tendem a refletir grande quantidade de radiação e tendem a diminuir a temperatura global.¹¹

Como vimos, a natureza é um sistema dinâmico, sempre em busca do equilíbrio e à medida que a atmosfera foi se modificando, com, por exemplo, a geração de oxigênio pela vegetação, houve um *efeito* climático associado a isto. Portanto, devemos ter em mente que as variações climáticas em apenas 1°C possuem uma elevada importância econômica e ecológica¹¹, pois como outras mudanças da natureza já mostraram, invernos rigorosos podem estragar plantações e eliminar espécies de animais da Terra.

1.2.2. Teorias suportando outras causas como responsáveis pelo aquecimento global

Em contrapartida à teoria dos gases estufa, está a teoria de que a Terra e seu ambiente estão sujeitos a influências externas, principalmente da fonte de energia da Terra, o Sol. Desta forma, percebeu-se que o Sol não possui uma radiação constante, apresentando níveis diferentes de bandas do espectro eletromagnético ao longo dos anos.¹⁴ Na década de 1950 uma importante observação para esta teoria foi feita: Forbush¹⁵ descobriu que a intensidade de fluxo de raios cósmicos foi notadamente reduzida durante uma atividade solar elevada. Svensmark & Friis-Christensen¹⁶ e Svensmark¹⁷ correlacionaram a formação de nuvens com uma parte do ciclo solar e, portanto, com os raios cósmicos.¹⁸ Os raios cósmicos afetam a formação de nuvens através do seu efeito nos aerossóis a partir da ionização, favorecendo a recombinação íon-íon. Existem diversas evidências empíricas, teóricas e experimentais que associam os raios cósmicos com o clima na Terra.¹⁹

Shaviv²⁰ em outro experimento correlacionou o nível do mar com a atividade solar e observou que os oceanos absorvem e emitem uma ordem de magnitude a mais de calor que o esperado quando se considera apenas as variações de irradiação total. Ele correlacionou esta diferença de fluxo a uma força externa (F_{ext}) que periodicamente entra e sai dos oceanos sem ser amplificada na atmosfera ou no modo interno dos oceanos. Com esta afirmação ele associou esta força externa (F_{ext}) às nuvens de baixa altitude, sustentando que o fluxo energético total que entra nos oceanos é resposta do ciclo solar, sendo uma ordem de magnitude maior que a média global das variações de irradiação solar.

Com relação a pCO_2 , pesquisadores acreditam que à medida que a Terra esquentar, as rochas de silicato irão reagir mais prontamente com o gás carbônico atmosférico, diminuindo assim as quantidades de CO_2 na atmosfera (por exemplo: $CaSiO_3 + CO_2 \rightleftharpoons SiO_2 + CaCO_3$).^{19,21-23} Em um cenário mais extremo até faltará CO_2 como fonte de energia para as plantas e a cadeia alimentar global será destruída.

Svensmark e Friis-Christensen²⁴ ainda responderam um artigo de Lockwood e Fröhlich²⁵ que negava as correlações entre raios cósmicos e a temperatura global dizendo que existe uma impressionante correlação negativa entre o fluxo de raios cósmicos e a temperatura troposférica, baseando-se principalmente na existência de um platô na temperatura entre os anos de 1990 e 2000, o qual não é correlacionado diretamente com a concentração de CO_2 atmosférico e sim, com a quantidade de *muons* (raios cósmicos) detectados.

A discussão sobre a origem das mudanças climáticas ainda não terminou e é difícil concordar com apenas uma das teorias, já que o Sol é realmente uma grande influência no clima terrestre e o efeito do gás carbônico faz parte das teorias mais bem

aceitas na sociedade científica. Muitos estudos ainda devem ser realizados para garantirmos que as teorias se combinem de maneira a chegar a um consenso.

1.3 Técnicas de remoção do CO₂

Pensando que o gás carbônico é a principal causa das mudanças climáticas, diversas atitudes poderiam ser feitas para a mitigação do CO₂ existente em excesso na atmosfera, como por exemplo, a captura e o estoque, a melhora da eficiência de geração de energia, a troca para combustíveis que contenham menos carbono, o uso de energia nuclear e fontes de energia renovável, o aumento dos sorvedouros biológicos e a conversão do CO₂ em compostos químicos úteis para a sociedade.

1.3.1 Captura e estoque

O processo de captura e estoque consiste na separação do gás carbônico das fontes industriais e de energia, com o objetivo de estocar e mantê-lo por um longo período longe da atmosfera.²⁶ Os métodos técnicos potenciais são: estoque geológico, estoque oceânico e fixação por indústrias para a formação de carbonatos, podendo ser aplicados em grandes pontos de fontes ao comprimir o gás e transportá-lo para seu destino final (formações geológicas, oceano e indústrias).²⁶

Uma planta industrial com o sistema de captura do CO₂ precisa de 10-40% mais energia do que uma sem esta tecnologia, porém, poderia diminuir as suas emissões em 80 a 90% apenas estocando-o, enquanto uma planta industrial que converta o gás em carbonato necessitaria de 180% mais em energia.²⁶

Caso o gás seja injetado em formações salinas ou óleo ou reservas de gás a uma profundidade de 800 m, vários mecanismos geoquímicos e físicos prevenirão o escape

do CO₂ para a atmosfera, como por exemplo, a presença de uma camada de rocha impermeável que capeia reservatórios de gás e ou petróleo. Existem pesquisas na parte de injeção do gás carbônico em fissuras geológicas para a facilitação da extração do óleo existente ²⁷, fazendo-o ocupar o espaço que antes era ocupado pelo óleo. A diferença de propriedades físicas dos materiais nas fissuras geológicas interfere na retirada do óleo e injeção do gás, devido aos efeitos de porosidade e permeabilidade a matriz pode contribuir em maior ou menor escala na recuperação do óleo pela difusão de transferência de massa²⁷.

Potencialmente, o estoque no oceano poderia ser realizado de duas maneiras: pela injeção e dissolução na coluna d'água ou pela deposição no fundo oceânico a profundidades maiores que 3000 m. Nestas profundidades, o CO₂ é mais denso que a água e espera-se que seja formado um “lago” que retardaria a dissolução do gás no ambiente ao seu redor, porém, muita pesquisa sobre os impactos ecológicos destas metodologias ainda está sendo realizada. ²⁶

O maior problema relacionado com a captura do gás carbônico é a possibilidade de vazamentos, já que os reservatórios escolhidos para estocagem possuem tempos característicos de estocagem: oceanos profundos (séculos), reservatórios geológicos (milênios) e minerais termodinamicamente estáveis (mais que milênios). Estas diferenças de velocidade de absorção do CO₂ pelos diferentes reservatórios acabam por tornar apenas os processos que possuem tempos de residência maiores que milênios bons pontos para o investimento. ²⁸

1.3.2 Aumento dos sorvedouros biológicos

As florestas estocam uma grande quantidade de carbono e desempenham um papel dominante no ciclo rápido do carbono e pequenas mudanças no balanço entre

fotossíntese e respirações do ecossistema resultam em grandes diferenças de CO_2 absorvido da atmosfera.²⁹ Acredita-se que o aumento do CO_2 atmosférico potencializa a estimulação da produção primária na ausência de outros fatores limitantes. Em outras palavras, pode-se dizer que há uma “fertilização” por parte do gás carbônico, resultando em um feedback negativo para a atmosfera e em um aumento da acumulação de carbono.³⁰ Fang et al. mostrou que houve um aumento no estoque de carbono na floresta da China durante 1980 e 1990 devido a projetos de arborização e reflorestamento.³¹

Entretanto, a fotossíntese pode ser limitada por diversos fatores, tais como a disponibilidade de nitrogênio, que interfere negativamente no acúmulo de carbono pelas plantas em altas concentrações de gás carbônico.³⁰

O efeito do albedo associado à fertilização oceânica acarretaria em um efeito mais proeminente³⁰. Durante o verão, a fixação do carbono pela fotossíntese é maior do que a saída pela respiração, pois a fotossíntese é limitada pelo grau de difusão do CO_2 até os sítios de carboxilação e pela contribuição enzimática. Esta variação é uma função linear da pressão parcial do CO_2 nas cavidades sub-estomatais do interior da folha.³²

Desta forma reconhece-se que a utilização de florestas possa ser um método de redução da concentração atmosférica de gás carbônico a curto-tempo, como por exemplo, pelo protocolo de Kioto, que desde 1990, permite a países que façam reflorestamento o recebimento de créditos por isto.³³

1.3.3 Uso do CO_2 como recurso natural

O gás carbônico é a fonte de carbono primária ideal para sínteses, devido à sua abundância, baixa toxicidade e devido ao fato de ser uma fonte renovável, assim,

processos que desenvolvam a formação de uma ligação C-C são desafios para a academia e de importância prática.^{34,35}

Neste desafio está a dificuldade de redução do CO₂ devido à elevada energia de ativação em processos monoeletrônicos, pois nesta rota estão envolvidas espécies radicais aniônicas como intermediários. Uma maneira de tentar diminuir a barreira energética seria a utilização de processos multi-eletrônicos na redução do gás carbônico.

36

Outras maneiras de atingir a ativação do CO₂ seriam a utilização de materiais de partida de elevada energia, pois apresentam elevada reatividade em condições amenas que por fim modificam o equilíbrio reacional na direção de produtos de baixa energia contendo oxigênio em sua estrutura.³⁷

A utilização de catalisadores age de maneira a diminuir a barreira termodinâmica da reação durante a colisão das moléculas reagentes. As velocidades e mecanismos reacionais de catalises são determinados pela habilidade do catalisador colocar os reagentes que estão ligados a ele em contato mecânico entre si.³⁸ Dentre os catalisadores, podemos distinguir dois principais tipos: os sintéticos e os naturais, sendo os naturais feitos pela própria natureza.

Diversos catalisadores sintéticos já foram utilizados para a ativação do CO₂ após a descoberta da reação de copolimerização entre gás carbônico e um epóxido por Inoue, Koinuma e Tsuruta em 1969.³⁹ Os sistemas catalíticos descritos para a copolimerização envolvem ambos catalisadores homogêneos e heterogêneos baseados principalmente em complexos metálicos,^{40,41} sendo que a etapa de coordenação do epóxido a dois sítios metálicos é o processo dominante da reação.⁴² Com isto, foi possível obter diversos produtos a partir de epóxidos e aziridinas. Dentre os produtos obtidos, os policarbonatos

e polycarbamatos são plásticos biodegradáveis altamente utilizados em indústrias de materiais.³⁷

Aproveitando-se do fato da molécula de CO₂ possuir elevada afinidade por nucleófilos e reagentes elétron-doadores é possível reagir o gás carbônico com complexos metálicos de valência baixa, os quais, quando coordenados a compostos insaturados levam à formação de metalo-lactonas⁴³. Seguindo esta linha de pensamento, o gás carbônico se mostrou eficiente na substituição do fosgênio na síntese do dimetil carbonato ao reagir com metanol na presença de catalisadores heterogêneos, tornando a rota sintética livre de reagentes tóxicos^{43, 44}.

Outra reação já estudada, que também está inclusa na característica do CO₂ reagir rapidamente com nucleófilos, foi para obtenção de ureia e derivados de ureias, utilizando amônia e aminas primárias como reagentes de partida.^{43,44}

Já na classe de catalisadores naturais, podemos citar as enzimas, as quais são proteínas que participam de processos químicos em organismos vivos. As funções enzimáticas são altamente específicas devido ao fato do sítio catalítico encaixar o substrato/co-enzima de maneira complementar ao seu tamanho, forma, carga e caráter hidrofílico/hidrofóbico. Isto faz com que as enzimas sejam capazes de distinguir seletivamente seus substratos dentre milhares de moléculas.

A conversão bioquímica ou bio-fixação do CO₂ utilizando células inteiras ou enzimas tem chamado bastante atenção devido às altas conversões e seletividades associadas com condições amenas de reação sem poluição, o que eleva o seu potencial de ser aplicado na indústria. Diversas enzimas que utilizam o gás carbônico como matéria prima já foram utilizadas para se obter compostos oxigenados a partir de CO₂, dentre elas estão a anidrase carbônica (EC 4.2.1.1)⁴⁵, a pirrol-2-carboxilato-

decarboxilase (EC 4.1.1.93)⁴⁶, a ácido benzoico carboxilase (EC 4.1.1.46)⁴⁷, a formato desidrogenase (EC 1.2.1.2)⁴⁸, e a metanol desidrogenase (EC 1.1.1.244).⁴⁹

Em todos estes estudos, observa-se que independentemente da classe de catalisadores, se sintéticos ou naturais, a incorporação do gás carbônico em matéria orgânica envolve o estabelecimento de uma ligação covalente entre o carbono do CO₂ e um átomo de carbono ou nitrogênio dos outros compostos, normalmente requerendo um ataque nucleofílico no carbono do CO₂, finalizando com a formação de um grupo carboxílico ou carbonílico no composto final.

Pode-se, portanto dizer que de maneira geral, os catalisadores que utilizam o CO₂ como matéria prima formam produtos contendo oxigênio de baixa energia. Neste trabalho, visou-se a utilização tanto dos catalisadores naturais, quanto de catalisadores sintéticos para a redução do gás carbônico. Os catalisadores sintéticos são complexos metálicos inspirados em enzimas e serão discutidos no capítulo 1 desta tese, enquanto os catalisadores naturais são enzimas imobilizadas em partículas magnéticas e serão discutidas no capítulo 2 desta tese.

2. Objetivos gerais

O principal objetivo deste trabalho foi estudar dois métodos diferentes de ativação do gás carbônico, um via complexos bimetálicos e outro via enzimas imobilizadas, como mostrado no esquema abaixo:

Os complexos bimetálicos foram inspirados em complexos bioquímicos para a redução do CO₂, utilizando-se hidrocarbonetos como substratos para a obtenção de uma reação de carboxilação.

As enzimas imobilizadas foram do tipo desidrogenase em nanopartículas de magnetita para a redução do CO₂ em formaldeído e metanol.

Os dois sistemas, de biofixação e quimiofixação, foram comparados em termos de viabilidade na utilização de gás carbônico como reagente químico.

Capítulo 1.

Complexos metálicos para a redução do CO₂

“A minha idéia, depois de tantas cabriolas, constituiu-se idéia fixa. Deus te livre, leitor, de uma idéia fixa; antes um argueiro, antes uma trave no olho.”

Machado de Assis, Memórias Póstumas de Brás Cubas.

3. Introdução

A simplicidade de moléculas contendo dois, três ou quatro átomos principais como, por exemplo, CO, N₂, H₂O, HCN, C₂H₂ e CO₂, e principalmente sua alta estabilidade, acarretam uma baixa reatividade que nos leva a ter que ativar tais moléculas. A ativação diminui a energia das ligações da molécula devido a um rearranjo eletrônico.⁵⁰

Existem diversas maneiras de se ativar ligações em uma molécula, sendo a principal delas, a utilização de metais de transição, os quais são normalmente utilizados na forma de complexos metálicos, porém, existem reações que envolvem ácidos ou apenas sais de metais.

Com catalisadores ácidos, na reação de Koch⁵¹ o CO se insere em uma olefina formando uma nova ligação C-C. As olefinas são ativadas por ácidos gerando um carbocátion que então é atacado pelo CO, resultando no íon acílio, que finalmente, reage com água para formar ácido carboxílico e liberar próton (catalisador).⁵²

A síntese de Haff e Koch⁵³ obtém ácidos terc-carboxílicos de parafina via transferência de hidreto utilizando ácido fórmico.⁵⁴ Diversos outros estudos foram realizados na presença de diferentes catalisadores ácidos^{54,55} e até com hidrocarbonetos saturados, na presença de super-eletrófilos⁵⁶, levando em consideração que a protólise da ligação C-C devido a sua elevada densidade de elétrons nos carbonos do esqueleto interno é cineticamente favorável.⁵⁶

Já na questão de sais metálicos, alcanos podem ser ativados gerando uma ligação M-H. Tal ligação é facilmente atacada por praticamente qualquer agente oxidante ou eletrofílico⁵⁷, o que suporta a reação entre alcanos e CO₂. Estas reações serão discutidas no item 3.1.

3.1 Ativação por metais

A síntese de ácido acético a partir de metano e gás carbônico foi realizada a partir de um sistema de acetato de Pd e Cu, envolvendo ácido trifluoroacético e K₂S₂O₈ a 80°C de maneira análoga à síntese da Koch.⁵⁸

Seguindo a mesma linha de pensamento de Fujiwara, porém utilizando-se de VO(acac)₂ em K₂S₂O₈ e ácido sulfúrico, Zerella et al.⁵⁹ combateram a argumentação de Wilcox et al.⁶⁰ que o ácido acético formado no processo de Fujiwara viria do solvente (ácido trifluoroacético). Neste trabalho, eles sugerem que a síntese ocorre via radicalar e que o anidrido acético é formado, o qual em presença de água se transforma em ácido acético.

Mais recentemente, Ding et al.⁶¹ utilizaram paládio e ródio suportados em sílica, encontrando uma maior facilidade de inserção do CO₂ na ligação M-CH_x no catalisador de paládio do que no de ródio. Verifica-se, portanto, que a ativação por metais ocorre, porém sem a verificação de nenhuma seletividade e em condições consideradas energéticas.

3.2 Os complexos

Os complexos são moléculas que se situam na intersecção da química orgânica clássica e da química inorgânica clássica nos proporcionando novos conceitos, estruturas e catalisadores para a indústria e processos orgânicos.

A química de coordenação que conhecemos atualmente deriva de Werner⁶² que não acreditava na teoria de Odling que havia proposto que os átomos de hidrogênio da amônia poderiam ser substituídos por metais, como se fosse uma reação radicalar.⁶³ Neste período de desenvolvimento da teoria de radicais ficou a crença de que esta ligação metal-amônia era uma junção de radical, um após outro, como numa cadeia, formando os complexos lineares (Figura 1) e Jorgensen, com inúmeros experimentos tentou basear com segurança e estabelecer esta teoria de cadeias.⁶⁴ Werner também refutou a teoria de Kekulé em que era adotado a rigidez de valência constante⁶⁵ e então propôs colocar o íon metálico no centro da molécula fazendo seis ligações com moléculas diferentes, estas estando nos vértices de um octaedro (Figura 2).

Figura 1. Estruturas lineares do Jorgensen.

Figura 2. Estrutura octaédrica de um complexo, proposta por Werner.

Após analisar molécula por molécula e questionar os seus descobridores, ou estudiosos pela maneira como as apresentavam, Werner disse em seu manuscrito:

“... A noção de que os seis ligantes no radical (MA_6) e que quatro ligantes no radical (MA_4) estão ligados diretamente ao átomo de metal, leva a mudança

de visão que pelo correspondente composto coloca-o em primeiro plano. Com uma revisão que não se deve ser colocada em dúvida.

Você pode tão pouco repelir as consequências lógicas que a levam, que estão de acordo com os fatos experimentais. (...)”

De fato, não podemos repelir seus estudos. Werner tanto iluminou a área em questão como abriu novos caminhos para a pesquisa. Em contraste com a visão convencional, Werner não entendia as forças de ligação de um átomo como sendo divididas em certas unidades de afinidade determinadas em número e direção. Ele considerava a afinidade como uma força que vem do centro do átomo, uniformemente atrativa em todas as direções, na qual a expressão geométrica não é, portanto, um número certo de linhas guia, mas uma superfície esférica.

As interações dos orbitais entre as moléculas e um centro metálico geralmente envolvem os orbitais de fronteira HOMO e LUMO. Estas interações possuem a natureza de doadoras de elétrons e receptoras de elétrons, respectivamente. Os efeitos eletrônicos induzidos pela coordenação refletem a transferência de carga eletrônica da molécula ao metal ou do metal para o ligante dependendo das características dos orbitais interagentes.⁶⁶

3.2.1 Modos de coordenação do CO₂

Antes de discutirmos os complexos capazes de ativar o gás carbônico devemos analisar de que maneira esta molécula pode interagir com compostos de metais de transição. O gás carbônico possui orbitais vazios de baixa energia, o que lhe confere uma elevada afinidade por elétrons (aproximadamente 3.8 eV). Assim, deve-se esperar que nas reações o CO₂ seja um doador fraco e um aceptor forte de elétrons. Com a coordenação, o CO₂ também pode deixar de ser uma molécula linear.⁶⁷

Figura 3. Possíveis modos de coordenação entre CO₂ e metal, pelo átomo de carbono.⁶⁸

Inicialmente pensava-se que o gás carbônico era um ligante fraco, porém foram sintetizados uma variedade de complexos com diversos modos de coordenação como se pode ver na Figura 3. Os complexos do tipo η^1 e η^2 são preparados pela direta reação com complexo metálico e o dióxido de carbono. Os centros metálicos que possuem uma vacância de coordenação devido à presença de ligantes elétron-doadores podem se ligar ao CO₂ pelo carbono.⁶⁸ Nestes complexos, particularmente o η^1 , há uma forte transferência de carga entre um orbital d_z^2 do metal e o orbital π^* do CO₂, enquanto o modo η^2 pode ser comparado ao de uma ligação olefina-metal, com uma ligação σ entre o orbital π do CO₂ e um orbital d_z^2 vazio do metal, juntamente com uma ligação π envolvendo um orbital preenchido d_{xz} do metal e um orbital π^* vazio do ligante.⁶⁸

Os complexos bimetálicos com o CO₂ em ponte envolvem a coordenação de um carbono carboxílico a um metal e uma ligação de um ou os dois oxigênios ao segundo metal. Estes complexos apresentam duas classes: o $\mu_2\text{-}\eta^2$ classe I e o $\mu_2\text{-}\eta^2$ classe II,

sendo que o que os diferencia é a natureza diferente dos comprimentos de ligação O-M₂ na classe II. Os ângulos de ligação O-C-O na classe dois são maiores que os da classe I.

Os outros complexos não são muito estudados devido à dificuldade de obtê-los, portanto serão apenas brevemente comentados. Os complexos do tipo $\mu^3\text{-}\eta^3$ exigem oxigênio como co-reagente e apresentam uma elevada simetria com relação ao CO₂.⁶⁹ Já os complexos $\mu^3\text{-}\eta^4$ possuem um ângulo O-C-O de 134.9°, um ângulo relativamente aberto, possivelmente devido à interação com o cátion K⁺, como visto no complexo de Fachinetti et al.⁷⁰ em que a ativação do gás carbônico é tida como bifuncional devido à combinação de centros metálicos básicos e ácidos.

O tipo $\mu^4\text{-}\eta^4$ consiste em uma montagem de estruturas unidas por ligações de hidrogênio fazendo com que a ligação C-O seja levemente mais longa em relação aos outros complexos. Finalmente, os complexos $\mu^4\text{-}\eta^5$ possuem ligações C-O com tamanhos desiguais (1.29 e 1.32 Å) e há também uma compressão do ângulo O-C-O para 112°. ⁶⁹

3.2.2 Complexos biológicos capazes de ativar o CO₂

Com a complexação do gás carbônico em um composto de metal de transição, uma mudança de reatividade ocorre criando condições estéricas e eletrônicas favoráveis. Esta ativação permite que o ligante em questão possa sofrer inúmeras reações catalíticas sob a influência de um complexo, inclusive processos que antigamente ocorriam apenas em organismos vivos.

Dentre os processos que ocorrem em organismos vivos, os que atraem os cientistas são a fotossíntese e a fixação do nitrogênio. Na fotossíntese, substâncias orgânicas são produzidas a partir de gás carbônico e água sob a influência de luz. Deixando de lado a complexidade deste processo, nós podemos dizer que basicamente

duas etapas distintas são necessárias. Na primeira etapa água serve como um doador de elétron em uma sequência de oxidação-redução, sendo decomposta em oxigênio molecular, e o hidrogênio transferido para uma espécie elétron-aceptora (A) que varia para cada espécie de plantas e algas.⁷¹ Esta espécie (AH₂) é designada como hidrogênio ativo.

Na segunda etapa ocorre a fixação do CO₂, porém não necessita de luz e ocorre nos cloroplastos, onde estão as enzimas responsáveis. O processo passa por várias etapas formando um ciclo de produção de trioses e hexoses fosfato, chamado de ciclo de Calvin. Uma das enzimas responsáveis pela catálise de incorporação do CO₂ ao açúcar ribulose 1,5- bifosfato é a Rubisco (EC 4.1.1.39). Esta enzima possui em seu sítio ativo um íon de Magnésio com uma lisina carbonilada ligada diretamente ao Mg (Figura 4A). O magnésio orienta e aproxima os reagentes no sítio ativo, polarizando o CO₂, o qual sofre um ataque nucleofílico de um intermediário formado na enzima.⁷¹

Outra enzima importante em sistemas biológicos é a Anidrase Carbônica (EC 4.2.1.1), que catalisa a interconversão de CO₂ e HCO₃⁻, especialmente em cianobactérias e plantas superiores em que quase todo o CO₂ que é fixado passa inicialmente pela Anidrase Carbônica, apesar da Rubisco conseguir ativar 10% do CO₂ sem a presença da Anidrase Carbônica.⁷² Em seu sítio ativo estão presentes três resíduos de histidina complexando um Zn²⁺, como pode ser visto na Figura 4B.

O gás carbônico também pode ser fixado pela enzima Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase (EC 4.1.1.32), uma enzima citosólica que catalisa a carboxilação do fosfoenolpiruvato.⁷³ Seu sítio ativo está localizado na região do carbono terminal de uma grande folha beta. A estrutura tridimensional deste sítio possui um cátion divalente, Mg²⁺, o qual está ligado ao grupo carboxílico do glutamato 566 e do aspartato 603. Há

uma arginina próxima ao grupo fosfato para neutralizar parcialmente a carga negativa. O bicarbonato formado a partir do CO_2 se liga aos resíduos de lisina 606 e 762 e à resíduos de arginina 763 e 764⁷⁴ dependendo do organismo, como pode ser visto na Figura 4C. A Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase pode ser ativada substancialmente por Ca^{2+} ou Mn^{2+} ⁷⁵, porém, os metais neste caso ativam o outro substrato e não o gás carbônico.

Figura 4. Complexos enzimáticos em que o gás carbônico está envolvido: (A) Sítio ativo da ribulose 1,5- bifosfato é a Rubisco; (B) sítio ativo da Anidrase Carbônica; (C) sítio ativo da Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase e (D) sítio ativo da Formilmetanofurano desidrogenase.

Existem diversas outras enzimas responsáveis pela ativação do CO_2 para diferentes tipos de reação. Para efeito de comparação, iremos citar por último as enzimas Metanogênicas, que a partir de CO_2 e H_2 produzem metano. Existe uma série de enzimas em cadeia que proporcionam esta reação, porém a enzima que ativa o gás

carbônico é a Formilmetanofurano Desidrogenase (EC 1.2.99.5), uma enzima citoplasmática composta de pelo menos três diferentes subunidades. Nesta enzima o CO_2 é convertido em N-formilmetanofurano ⁷⁶ na subunidade γ em que o sítio ativo é composto por um molibdênio (organismos mesofílicos), ou tungstênio (organismos termofílicos) coordenado à cisteína ou uma seleno-cisteína e também ao MPTppG (grupo prostético de pterino ditioleno) ⁷⁷ como pode ser visto na Figura 4D.

A compreensão destas enzimas nos fará entender os complexos sintéticos utilizados para ativar o CO_2 que já foram realizados.

3.2.3 Complexos sintéticos para ativar o CO_2

Como foi visto no item 3.2.2 os compostos contendo metais de transição nas enzimas e coenzimas são contribuintes essenciais para a fixação biológica do CO_2 . Desta maneira pode-se esperar que complexos metálicos possam ajudar em processos puramente químicos na redução do gás carbônico, transformando-o em compostos orgânicos de maior valor agregado.

Em 1975 Aresta ⁷⁸ descreveu a síntese de um complexo de níquel complexado à fosfinas terciárias e verificou que a estabilidade dos complexos de CO_2 estava relacionada à basicidade das fosfinas. O CO_2 formava um complexo do tipo η^2 (Figura 5A), o qual foi submetido por Yeung e Dong ³⁴ à uma transformação catalítica em que o complexo de Aresta sofre uma transmetalção com reagentes de organozinco. O produto resultante sofre uma eliminação redutiva liberando um carboxilato de zinco que contém uma nova ligação C-C. Este carboxilato de zinco ao ser acidificado resulta na liberação de um ácido carboxílico.

O mecanismo de inserção do CO_2 em uma ligação Mg-N em complexos mono e dinucleares de Magnésio, Figura 5B I e II, foi estudado por Himmel ⁷⁹. Em seus

cálculos, Himmel percebeu que os complexos mononucleares apresentavam o modo de coordenação η^2 , enquanto os dinucleares apresentavam o modo de coordenação $\mu^2-\eta^2$. Verificou-se também que a barreira energética para a complexação do CO_2 aumentava substancialmente quando este se inseria no complexo dinuclear.

Figura 5. Complexos metálicos para a ativação do gás carbônico.

Um complexo capaz de realizar a hidrogenação catalítica do gás carbônico foi descrito por Tanaka et al.³⁵, em que ácido fórmico é produzido. O catalisador em questão é composto de um ligante de Pincer⁸⁰ baseado em uma alquil-fosfina, Figura 5C, o qual se liga fortemente a um sítio metálico, no caso, irídio. Percebeu-se que o uso de uma base fraca como K_3PO_4 no lugar de KOH resulta em menores rendimentos, devido ao papel essencial da base no ciclo catalítico.

Os estudos da reação de hidrogenação tiveram início em 1976⁸¹ em que complexos de paládio, níquel, ródio e irídio foram utilizados como catalisadores na presença de base. Diversos outros complexos metálicos com o objetivo de estudar melhores catalisadores foram testados depois. Com complexos de irídio⁸² conseguiu-se realizar a catálise em meio ácido verificando-se que a etapa determinante era a inserção

do CO₂ no complexo ⁸³; já com os de ródio ⁸⁴⁻⁸⁷ verificou-se que a etapa lenta é a eliminação redutiva, enquanto os complexos de rutênio ⁸⁸ foram utilizados juntamente com álcoois e aminas havendo uma aceleração da reação e formação de alquil formatos e formamidas ^{89,90}.

A reação do gás carbônico com complexos de paládio (0) e níquel (0), Figura 5D, juntamente com compostos insaturados, gera a formação de metalolactonas numa reação de cicloadição oxidativa, havendo a formação de uma ligação C-C ^{43,91}. Este tipo de reação começou a ser bem estudada em meados de 1980 em que se acompanhou a interação por ¹H RMN. ⁹²

O CO₂ também pode ser inserido em um epóxido, formando um carbonato cíclico. Os complexos responsáveis por esta adição são principalmente formados de ligantes do tipo salen e ftalocianinas (por exemplo: ^{93 43}) Dentre os metais utilizados nos complexos para a reação de inserção de CO₂ em epóxidos, o zinco é de longe o mais empregado, sendo que alguns destes complexos são binucleares. A presença de ligantes volumosos faz com que haja uma dissociação dos núcleos metálicos, aumentando a atividade catalítica. Nesta reação é proposto que o ânion do complexo ataca a parte menos impedida de uma oxirana, ocasionando a abertura do anel e na formação de um alcóxido que por sua vez ataca o CO₂ para resultar na formação do ânion carbonato. Este tipo de reação tem sido utilizada para a formação de polímeros biodegradáveis como substituintes do poliestireno.

Analogamente às reações de acoplamento C-C de Suzuki e Stille ⁹⁴ complexos de paládio e ródio são capazes de formar um ácido carboxílico a partir da inserção do CO₂ em ligações C-Sn e C-B. ⁴³ Porém, uma maior economia atômica é feita se a inserção se dá na ligação metal-carbono diretamente com um alcino, alceno ou alceno. Nota-se que os alcinos e alcenos já foram extensivamente estudados ⁹⁵, enquanto o

acoplamento entre CO₂ e alcanos possui poucos artigos, devido à baixa reatividade dos dois reagentes.

Os estudos existentes com alcano utilizam o metano em uma reação análoga à uma reação de Koch.⁵³

3.3 Complexos capazes de ativar ligações C-H

Como um dos objetivos deste trabalho é a inserção do CO₂ em alcanos e alcenos, também é pertinente observar os complexos já existentes para a ativação da ligação C-H. O paládio é o metal mais extensamente utilizado como ativador da ligação carbono-hidrogênio.⁹⁶

A seletividade de uma reação eletrofílica em um alcano é geralmente bem pequena devido à sua característica inerte e da instabilidade da reação catiônica intermediária, o que gera uma quebra das ligações e rearranjo do esqueleto carbônico.⁵⁶

Verifica-se que na natureza o desenho do catalisador envolve o uso de poços enzimáticos elaborados, limitando a generalização do substrato. Dentre os catalisadores da natureza estão as enzimas heme que permitem a oxidação de ligações C-H seletivamente. Uma maneira de imitar a natureza neste quesito está o uso de porfirinas de Mn, Fe e Ru, como mostrado na Figura 6A, em que há a abstração de -H de substratos com hidrogênio lábil.⁹⁷

Os metais de transição de baixa valência tendem a se inserir numa ligação C-H de alcanos para resultar num hidreto de alquilmetal, sendo que a alquila menos substituída é preferencial.⁹⁸

Na vida da química sintética podemos utilizar catalisadores metálicos volumosos como estratégia de limitação dos substratos e aumento de seletividade.⁹⁹ Um exemplo, é o uso de complexos de ferro por White et al.^{99,100}, Figura 6B, em que a oxidação seletiva de compostos alifáticos é observada.

É importante notar que o spin e o número de coordenação possuem um impacto substancial na habilidade de um complexo ativar uma ligação C-H, sendo que estudos teóricos indicaram que os metais 3d mais pesados possuem uma termodinâmica mais factível de abstração de hidrogênio ¹⁰¹, sendo que complexos de Ni, Co, Cu, Zn, como indicados na Figura 6C, são os melhores.

Figura 6. Complexos metálicos capazes de ativar a ligação C-H.

Outra maneira de ativar uma ligação C-H pode ser por via fotocatalise, já que muitos ciclos catalíticos podem acontecer para cada sítio ativo gerado e, portanto, para cada fóton absorvido pelo complexo. ¹⁰² Desta maneira, Janovicz et al. ⁵⁷ realizou a adição oxidativa em uma única etapa de alcanos em um complexo de irídio, Figura 6D, via irradiação obtendo a ativação da ligação C-H de alcanos, fazendo com que o agente oxidante atue sobre esta ligação.

3.4 Complexos bimetálicos para acoplar o CO₂ em alcanos

Os complexos bimetálicos são interessantes sob o ponto de vista da (a) teoria de ligação, (b) processos de decomposição mononucleares de metal-hidrocarbíl, (c) reatividade de organometálicos e (d) catálise. Quanto à catálise, os complexos

bimetálicos podem não só revelar uma química e reatividade fora do comum devido aos efeitos cooperativos, como também podem prover modelos ainda não bem conhecidos nos processos de catálise.¹⁰³

A vantagem do uso de complexos heteronucleares é o efeito sinérgico de aumento da reatividade em relação à soma das partes do complexo.¹⁰⁴ Por exemplo, em um catalisador contendo paládio e zinco, o paládio se responsabilizaria pela ativação do alceno, enquanto o zinco, ao coordenar-se com o CO₂, o tornaria mais eletropositivo e, portanto, mais suscetível para a formação de uma ligação carbono-carbono com o alceno. Para que haja um reconhecimento molecular, necessita-se de um substrato relativamente rígido que em princípio seja um ligante para pelo menos um dos metais. A partir deste princípio, as forças de coordenação dominantes nesta classe de complexo são do tipo quelato, sendo que primeiramente o metal se liga a um sítio do substrato e então causa uma reação em um sítio adjacente, guiado pelo efeito quelato.¹⁰⁵

Portanto, o catalisador bimetálico obtido será guiado pelo efeito quelato, em que, o CO₂ coordenado ao metal *duro* quando se inserir ao alceno coordenado a um metal *mole*, aumentará a estabilidade do complexo formado no estado de transição, e consequentemente, diminuirá a barreira energética da reação.¹⁰⁵

Os novos catalisadores bimetálicos sintetizados, terão um funcionamento baseado no mecanismo proposto por Johanson et al.,¹⁰⁶ o qual supõe uma reação baseada na inserção do grupo metílico ao paládio por influência *trans* do grupo fenílico. Desta maneira, permite-se que haja um ataque nucleofílico pela densidade de elétrons π da dupla ligação ao CO₂, resultando em um estado de transição cíclico. O estado de transição deve sofrer um rearranjo e então, o CO₂ poderá se inserir na ligação Pd-C.⁹⁴

4. Objetivos específicos

O objetivo desta parte do trabalho foi a síntese de três ligantes correlatos, um contendo principalmente hidroxilas para a complexação, outro contendo dois grupos fosfinito e um terceiro intermediário entre os dois, como mostrado na Figura 7. Estes ligantes foram escolhidos de forma a mimetizar os sítios ativos de enzimas bimetálicas como a Urease e a Fosfotriesterase, mantendo a característica bimetálica em que os dois centros metálicos estão próximos uns aos outros.

Figura 7. Ligantes sintetizados neste trabalho.

Estes ligantes foram utilizados para a síntese de complexos bimetálicos, os quais foram posteriormente utilizados em reações de ativação do gás carbônico para a verificação de suas atividades catalíticas.

“Viva pois a história, a volúvel história que dá
para tudo; e, tomando à ideia fixa, direi que é ela
a que faz os varões fortes e os doidos; a ideia
móbil, vaga ou furta-cor é a que faz os
Cláudios— fórmula Suetônio.”
Machado de Assis, Memórias Póstumas de Brás
Cubas.

5. Parte Experimental

5.1 Materiais e métodos

Todos os reagentes foram de grau analítico e utilizados sem prévia purificação a não ser quando indicado. As reações foram avaliadas a partir de cromatografia em camada delgada em placas de sílica ou alumina, verificando-se a formação dos produtos após a revelação sob luz UV ($\lambda = 265$ nm), com vapores de iodo e/ ou aplicação de solução de vanilina.

5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho

As análises no infravermelho foram realizadas em um espectrofotômetro SHIMADZU, FTIR-8300. Foram utilizadas as técnicas de (a) pastilha de KBr contendo até 10% em massa do composto a ser analisado; (b) filme dos compostos em pastilhas de NaCl e (c) medidas em solução com celas para líquidos (NaCl). Em geral, os espectros foram registrados acumulando-se 50 varreduras sucessivas, com resolução de 2 cm^{-1} .

5.1.2 Espectroscopia Uv-Vis

Os espectros eletrônicos foram obtidos em um espectrofotômetro UV-Vis, HP 8453- Hewlett Packard, com soluções compostas tipicamente por acetonitrila ou diclorometano.

5.1.3 Termogravimetria

As análises termogravimétricas foram realizadas com equipamentos TA-50 WSI e DTA-50 da SHIMADZU. As varreduras foram executadas na faixa de 20°C a 700°C utilizando uma razão de aquecimento de 10°C por minuto, sob atmosfera de nitrogênio.

5.1.4 Espectroscopia de fluorescência

As análises fluorimétricas foram obtidas em um fluorímetro PTI, LS-100 em soluções de acetonitrila previamente deaerada.

5.1.5 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C , ^{31}P , COSY, HETCOR e NOESY foram obtidos em CDCl_3 (a não ser onde indicado outro solvente) utilizando espectrômetros Varian AV-200, Bruker-300 e Bruker-500. Os deslocamentos químicos apresentados (δ ppm) são relativos ao tetrametil silano (TMS) e ao ácido fosfórico (para ^{31}P RMN), tendo sido usada a ressonância do solvente deuterado como padrão interno (CDCl_3 , δ 7.26 ppm para RMN de próton e CDCl_3 , δ 77.0 ppm para RMN de carbono). Os deslocamentos químicos estão sendo dados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (s= singleto, d= dubleto, dd= duplo dubleto, dtd= dubleto de triplo dubleto t, tripleto, q= quarteto, m = multipletto).

5.1.6 Determinação da rotação ótica

Os valores de rotação ótica foram determinados com um polarímetro JASCO DIP-378 com lâmpada de sódio ($\lambda = 589.6$ nm) a 20 °C, após a solubilização das amostras.

5.1.7 Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos na Central Analítica do IQ-USP, a qual é equipada com um equipamento de cromatografia líquida acoplado a um analisador de massas do tipo íon trap (*LC-MS/MS(n) – Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus*). A análise foi feita por injeção direta e análise por electrospray ESI⁺ ou ESI⁻.

5.1.8 Voltametria cíclica

Experimentos de voltametria cíclica e de pulso diferencial foram conduzidos em um sistema modulado da *Princeton Applied Research Corporation*, composto por um potenciostato / galvanostato modelo 283 ou um potenciostato/galvanostato *Autolab*, modelo PGSTAT 30. Diversos estudos voltamográficos foram feitos, incluindo mudanças da velocidade de varredura, porém, aqui nesta tese estão sendo mostrados apenas os estudos realizados a 80 mVs⁻¹.

5.1.9 Espectroeletrorquímica

Experimentos de espectroeletrorquímica eletrônica foram realizados acoplando o espectrofotômetro UV-Vis, HP 8453- Hewlett Packard a um dos potenciostatos existentes no laboratório, utilizando uma cela especialmente projetada no laboratório.

5.1.10 Cromatografia Gasosa

Utilizou-se um cromatógrafo gasoso GC/FID da marca Shimadzu GC-17A com coluna capilar de sílica fundida (25 m x 0,25 mm) como fase estacionária. Condições do

cromatógrafo gasoso: injetor (220 °C), detector (220 °C), pressão de N₂ (75 kPa).
Temperatura da coluna: 30 °C, 1 °C/min até 100 °C.

5.1.11 EPR

As análises de EPR foram realizadas com o auxílio da prof. Ana Maria da Costa Ferreira, em acetonitrila, a 77 K utilizando um espectrômetro Bruker EMX.

5.2 Sínteses

Nesta parte serão apresentados os resultados mais básicos de cada composto, sendo que seus espectros podem ser encontrados no anexo. Os métodos experimentais até a obtenção do composto **(5)** foram baseados na literatura.¹⁰⁷ assim como os de obtenção dos compostos **(9)**, **(10)**, **(11)** e **(12)**.⁴² Os ligantes finais terão a sua caracterização totalmente discutida na seção Resultados e Discussão.

5.2.1 Síntese de benzil 2-(hidroxidifenilmetil)pirrolidina-1-carboxilato - composto (4)

Composto (2): Em um balão flambado adicionou-se 20 mL de metanol seco e deixou-se em banho de gelo a 0°C. Então, adicionou-se 900 µL de SOCl₂ (10 mmol), gota a gota, e logo após, 1,280 g de L-Prolina (10 mmol). Deixou-se a reação à temperatura ambiente por 20 horas. Evaporou-se o produto à vácuo e secou-se em dessecador à vácuo por 5 horas, obtendo-se 1,052 g de um líquido viscoso amarelo (rendimento de 81%).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 2,14 (m, 3H), 2,44 (m, 1H), 3,57 (m, 2H), 3,85 (s, 3H), 4,52 (dd, 1H), 6,08 ppm (s, 1H).

RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3): δ 23,5; 28,6; 45,8; 53,4; 59,1; 169,1 ppm.

MS de baixa resolução (ESI^+) (m/z): [M+H] calculado para $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_2$, 130,09, encontrado: 130,0. MS/MS (m/z): 70,4.

Infravermelho: 3415 cm^{-1} (v N-H), 2956 cm^{-1} (v C-H), 1742 cm^{-1} (v C=O), 1245 cm^{-1} ($\nu_{\text{assim. C-O-C}}$) e 1058 cm^{-1} ($\nu_{\text{sim. C-O-C}}$).

$[\alpha]_{\text{D}}$ (9mg/ mL em clorofórmio): $-1,05^\circ$ (dados da literatura : $[\alpha]_{\text{D}}$ 1 g/ 100 mL em água = $-30,6^\circ$)¹⁰⁸

Composto (3): O produto (2) (8 mmol) foi dissolvido em 20 mL de água destilada e então 8.5 mmol de trietilamina (1.4 mL) e 8 mmol de cloroformiato de benzila (CBz = 1,12mL) foram adicionados. Deixou-se a reação sob agitação e temperatura ambiente por 6 horas. Após extração com diclorometano (3 x 20 mL), a fração orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e evaporada à vacuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica variando o eluente desde 100 % hexano até 20 % acetato de etila em hexano. Obteve-se um óleo viscoso, 1,9 g (98 % de rendimento).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 1,95 (m, 3H), 2,21 (m, 1H), 3,49 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 3,74 (s, 1H), 4,37 (m, 1H), 5,13 (m, 2H), 7,35 ppm (m, 5H).

RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3): δ 24,2; 30,8; 46,7; 59,0; 66,8; 66,8; 127,6; 127,7; 128,3; 136,5; 154,7; 173,1 ppm.

MS de baixa resolução (ESI^+) (m/z): [M+H] calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_2$, 220,13, encontrado: 220,0. MS/MS (m/z): 91,4.

Infravermelho: $3084\text{--}2884\text{ cm}^{-1}$ (v C-H), 1745 cm^{-1} (v C=O), 1710 cm^{-1} (v C=O), 1198 cm^{-1} ($\nu_{\text{assim. C-O-C}}$), 1117 cm^{-1} ($\nu_{\text{sim. C-O-C}}$).

$[\alpha]_D$ (1mg/ mL em clorofórmio): +1,1 ° (dados da literatura : $[\alpha]_D$ 1.34 mg/mL em $\text{CHCl}_3 = -59,3^\circ$)¹⁰⁹

Composto (4): Sob atmosfera inerte, 705 mg de Mg (29 mmol, 2 equivalentes) foram flambados e 30 mL de THF seco foram adicionados juntamente com 10 mg de iodo. Então, sob um banho de gelo, 3,5 mL de bromobenzeno (30 mmol, 2 equivalentes) foram adicionados gota a gota. Esperou-se que o magnésio fosse completamente consumido e então o produto **(3)** (15 mmol, 3.3 g) foi adicionado lentamente. A reação ficou sob agitação durante 12 horas na temperatura ambiente. Após este período, alíquotas de uma solução 5 % de NH_4Cl foram adicionadas à reação até que não houvesse mais sinal de reação. Após a extração com diclorometano (3x 20 mL), a fração orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e evaporada à vacuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando-se 20 % de acetato de etila em hexano como eluente, resultando em um líquido viscoso incolor (2.6 g, 50 % de rendimento).

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 0,84 (m, 1H), 1,28 (m, 1H), 1,50(m, 1H), 1,95 (ddt, $J_1=12,9$, $J_2=8.5$, $J_3= 4.1$, 1H), 2,10 (dq, $J_1=13.3$, $J_2= 8.8$, 1H), 3,00 (s, 1H), 3,47 (m, 1H), 4,95 (dd, $J_1= 8.8$, $J_2, 3.8$, 1H), 5,08 (s, 1H), 5,18 (m, 1H), 7,27 (m, 4H), 7,31 (m, 5H), 7,37 ppm (m, 6H).

RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3): δ 22,9; 29,7; 67,4; 73,4; 99,9; 127,1; 127,2; 127,4; 127,6; 127,7; 127,9; 128,0; 128,0; 128,1; 128,5; 128,8; 128,9; 129,9; 129,3; 129,3; 133,2; 136,5; 149,6; 150,7 ppm.

MS de baixa resolução (ESI+) (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]$ calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NNaO}_3$, 410,17, encontrado: 410,2. MS/MS (m/z): 204, 279, 160, 91.

Infravermelho: 3393 cm^{-1} (ν O-H), 3092-2884 cm^{-1} (ν C-H), 1672 cm^{-1} (ν C=O) e 1031 cm^{-1} (ν C-O).

$[\alpha]_D$ (1 mg/mL em clorofórmio): -17,2° (dados da literatura : $[\alpha]_D$ 0.33g/ 100 mL em etanol = +9,0 °) ¹¹⁰

5.2.2 Síntese de difenil(pirrolidin-2-il)metanol – composto (5)

Em um balão flambado, adicionou-se 1 mmol do composto **(4)** (390 mg) e 150 mg de 10 % (m/m) de paládio suportado em carvão em 400 μL de tolueno seco. Passou-se um fluxo de hidrogênio e então a reação foi deixada sob 1 atm de hidrogênio por uma noite. A purificação do composto foi feita filtrando-se em coluna de celite e usando tolueno como eluente. O produto foi evaporado à vácuo obtendo-se 70 % de rendimento (177,3 mg).

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 1,04 (dtd, $J_1=12.5$, $J_2=10.8$, $J_3=8.8$, 1H), 1,63 (dddd, $J_1=12.6$, $J_2=7.1$, $J_3=5.5$, $J_4=1.8$, 1H), 1,78 (m, 1H), 1,88 (m, 1H), 2,49 (s, 1H), 3,16 (ddd, $J_1=11.4$, $J_2=9.5$, $J_3=3.7$, 1H), 3,64 (dt, $J_1=11.4$, $J_2=8.2$, 1H), 4,46 (dd, $J_1=10.5$, $J_2=5.6$, 1H), 4,60 (s, 1H), 7,25 (m, 3H), 7,27 (m, 3H), 7,29 (m, 2H), 7,43 ppm (m, 2H).

RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3):

δ 24,8; 25,8; 46,9; 65,1; 69,2; 85,9; 125,2; 125,4; 125,9; 126,8; 127,0; 127,6; 128,2; 128,5; 140,1; 143,2 ppm.

MS de baixa resolução (ESI+) (m/z): $[M+]$ calculado para $C_{17}H_{19}NO$, 253,17, encontrado: 252,8. MS (-OH) calculado para $C_{17}H_{19}N$, 237,1, encontrado: 237,7.

Infravermelho: 3505 cm^{-1} (ν O-H), $3092\text{-}2884\text{ cm}^{-1}$ (ν C-H), 1552 cm^{-1} (ν N-H) e 1065 cm^{-1} (ν O-H).

$[\alpha]_D$ (3 mg/mL em clorofórmio): $+0,2^\circ$ (dados da literatura : $[\alpha]_D$ 2 g/ 100 mL em metanol= $+59^\circ$)¹¹¹

5.2.3 Síntese do composto (6)

Sob atmosfera de nitrogênio, 2,6 g do composto (4) (7.5 mmol, 1 eq.) foi dissolvido em 12 mL de tolueno seco. A esta solução, 1,15 mL de trietilamina (8.2 mmol, 1,1 eq.) foi adicionado gota a gota. Deixou-se a reação sob agitação por 15 minutos e então sob um banho de gelo, clorodifenilfosfina foi adicionada (3x 0.5 mL, 8.3 mmol, 1 eq.). Após 2 horas de reação a temperatura ambiente, S_8 (1.95g, 1eq.) foi adicionado para a oxidação do fosfinito. A reação prosseguiu por mais 12 horas a temperatura ambiente. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de alumina neutra sob atmosfera de N_2 , utilizando diclorometano seco como eluente. Obteve-se 0,9 g de um sólido amarelo como produto e rendimento de 35%.

RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$): δ 0,76 m, 1H), 1,43 (m, 1H), 1,96 (m, 2H), 2,93 (m, 1H), 3,39 (m, 1H), 4,89 (dd, 1H), 5,05 (m, 2H), 7,12 (m, 2H), 7,21 (m, 4H), 7,30 (m, 11H), 7,44 (m, 4H), 7,86 ppm (m, 4H).

RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3): δ 22,9; 29,6; 47,8; 67,4; 75,5; 81,6; 127,1; 127,4; 127,5; 127,7; 127,8; 128,0; 128,1; 128,2; 128,2; 128,4; 128,7; 130,8; 131,1; 131,3; 131,8; 131,8; 132,3; 132,4; 132,5; 136,4; 158,2 ppm.

RMN de ^{31}P (300 MHz, CDCl_3): 80,81 ppm.

MS/MS ESI^+ (m/z): 266, 160, 91.

Infravermelho: 3081-2880 cm^{-1} (ν C-H), 1669 cm^{-1} (ν C=O), 1193 cm^{-1} ($\nu_{\text{assim.}}$ P-O- C_6H_5), 995 cm^{-1} ($\nu_{\text{sim.}}$ P-O- C_6H_5)

$[\alpha]_{\text{D}}$ (1.5 mg/mL em clorofórmio): -15,8°

5.2.4 Síntese do composto (7)

A 0.90 g (3.6 mmol) do composto (6), 500 mg de Pd/C (10% (m/m) de paládio suportado em carvão) e 20 mL de tolueno seco foram adicionados. Passou-se um fluxo de hidrogênio e então a reação foi deixada sob 1 atm de hidrogênio por uma noite. A purificação do composto foi feita filtrando-se em coluna de celite e usando tolueno como eluente. O produto foi então evaporado à vácuo, obtendo-se 1.6 g de um sólido laranja (94% de rendimento).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): 1,42 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 2,92 (m, 1H), 3,41 (m, 1H), 4,92 (dd, $J_1 = 8.8$, $J_2 = 4$, 1H), 5,00 (s, 1H), 5,13 (m, 1H), 7,10 (m, 5H), 7,21 (m, 4H), 7,26 (m, 5H), 7,35 ppm (m, 6H).

RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3): 22,9; 29,6; 47,8; 67,4; 81,6; 125,7; 126,9; 127,1; 127,1; 127,4; 127,5; 127,7; 127,8; 128,0; 128,1; 128,1; 128,4; 128,4; 128,7; 130,8; 142,3; 143,5 ppm.

RMN de ^{31}P (300 MHz, CDCl_3): 83,08 ppm.

MS/MS ESI^+ (m/z): 391, 288, 235.

$[\alpha]_{\text{D}}$ (0.9 mg/mL em clorofórmio): -18,2°

5.2.5 Síntese dos compostos (9) e (10)

Os compostos (9) e (10) foram obtidos a partir da mesma rota sintética. Em um balão previamente flambado, sob banho de gelo, adicionou-se 1 equivalente do composto (8) (204 mg, 1 mmol), 3 equivalentes de K_2CO_3 (414 mg, 3 mmol), 10 mL de DMF seco e

2 equivalentes do composto **(4)** (= 506 mg, 2 mmol) ou **(7)** (= 938 mg, 2 mmol). A reação prosseguiu por 12 horas a temperatura ambiente.

Para o composto **(9)**, após este período, adicionou-se 10 mL de água deionizada e 10 mL de éter etílico. A fase orgânica foi separada da aquosa e extraída com éter etílico (3x 20 mL). As frações orgânicas foram combinadas, secas sob Na₂SO₄, filtradas e evaporadas à vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel usando 20% de acetato de etila em hexano. Obtendo-se 30% de rendimento.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): 1,21 (s, 3H), 1,52 (m, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 2,02 (m, 2H), 2,15 (s, 2H), 2,39 (m, 2H), 2,81 (m, 2H), 3,23 (s, 1H), 3,31 (m, 4H), 3,96 (dd, J₁=9.1, J₂= 4.7, 2H), 6,59 (s, 2H), 7,17 (m, 4H), 7,31 (m, 8H), 7,57 (m, 4H), 7,70 ppm (m, 4H).

RMN de ¹³C (200 MHz, CDCl₃): 20,7; 24,4; 27,3; 30,0 , 49,8, 53,8 , 55,4, 58,1 , 71,8, 76,9, 79,2, 124,4, 126,3, 126,3, 126,8, 127,0, 127,5, 128,3, 128,6, 129,2, 146,8 147,4 ppm.

MS de baixa resolução (ESI+) m/z: calculado para C₄₃H₄₇N₂O₃ (m/z= 639), encontrado: 639.35.

Infravermelho: 3088-3000 cm⁻¹ (ν C-H), 1249 cm⁻¹ (ν C-O, fenólico), 1060 cm⁻¹ (ν C-N).

[α]_D (0.6 mg/mL em clorofórmio): -12,5°

Para o composto **(10)**, o solvente foi evaporado à vácuo e o sólido foi purificado em coluna cromatográfica de alumina neutra sob atmosfera de nitrogênio, utilizando diclorometano seco como eluente. Obtendo-se 25% de rendimento.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): 1,62 (m, 5H), 1,80 (m, 2H), 1,94 (m, 2H), 3,35 (m, 2H), 2,92 (m, 2H), 3,03 (m, 2H), 3,22 (m, 2H), 3,94 (dd, 2H), 4,95 (s, 1H), 7,01 (m,

2H), 7,05 (m, 2H), 7,11 (m, 3H), 7,17 (m, 3H), 7,21 (m, 4H), 7,23 (m, 3H), 7,26 (m, 5H), 7,32 (m, 5H), 7,45 (m, 2H), 7,55 (m, 3H), 7,61 (m, 2H), 7,75 ppm (m, 5H).

RMN de ^{13}C (200 MHz, acetona- d_6): 24,5; 30,5; 36,6; 49,2; 67,2; 67,9; 82,8; 126,7; 127,1; 127,2; 127,6; 128,0; 128,2; 128,7; 128,8; 128,9; 129,1; 129,4; 129,6; 129,7; 129,9; 130,8; 146,3; 148,1; 163,2 ppm

RMN de ^{31}P (300 MHz, acetonitrila- d_3): 80,7 e 80,9 ppm.

MS/MS ESI^+ (m/z): 829, 798, 641, 600, 370, 326, 236

$[\alpha]_D$ (1 mg/mL em clorofórmio): -15,6°

5.2.6 Síntese dos compostos (11) e (12)

A síntese do composto (11) prosseguiu como descrito a seguir: em um balão previamente flambado, adicionou-se 2,6 mmol de composto (8) (0,538 g, 1 eq.), 1 mmol

de composto (**4**) (0.625 g, 0.5 eq.), 0,02 mol de K_2CO_3 (3 g, 8 eq.) e então, 5 mL de DMF seco foram adicionados sob banho de gelo. A reação prosseguiu por 6 horas. Extraíu-se com éter etílico (3x 10 mL) e água (1x 10 mL). Fez-se coluna de sílica gel, com diclorometano como eluente. Obteve-se um sólido laranja. Rendimento: 59%

RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$): 7,68-7,62 (m, 2H), 7,54-7,48 (m, 2H), 7,27-7,17 (m, 6H), 7,0-6,9 (m, 2H), 4,87 (s, 2H), 3,93 (quarteto, 1H, $J_1=4.687$, $J_2=9.37$), 3,19-2,92 (quarteto, 1H, $J_1=12.88$, $J_2=40.61$), 2,9-2,81 (m, 1H), 2,23-2,22 (m, 1H), 2,01-1,5 (m, 3H).

Para obter o composto (**12**), a 1,4 mmol de composto (**11**) (600 mg, 1eq.), adicionou-se 1,4 mmol do composto (**7**) (660 mg, 1eq.) e 4,3 mmol de K_2CO_3 (600 mg, 3eq.). Então adicionou-se 10 mL de DMF seco sob banho de gelo. Deixou-se reagindo por 18 horas. Retirou-se o solvente da reação sob vácuo e purificou-se por coluna cromatográfica de alumina neutra e atmosfera de nitrogênio, utilizando diclorometano seco como eluente. Obteve-se em um sólido amarelo. Rendimento: 90%

RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$): 7,75-7,58 (m, 4H), 7,52-7,45 (m, 5H), 7,24-6,93 (m, 23H), 4,82 (s, 1H), 3,88 (m, 2H), 3,12 (quarteto, 2H, $J_1=12.49$, $J_2=29.29$), 2,81 (s, 4H), 2,77 (s, 3H), 2,30-2,14 (m, 2H), 2,05-1,46 (m, 7H), 1,18 (s, 1H).

RMN de ^{13}C (200 MHz, $CDCl_3$): 147,9; 146,6; 139,5; 128,5; 128,0; 128,0; 127,9; 126,7; 126,3; 126,1; 125,5; 125,5; 125,1; 77,8; 70,5; 60,5; 55,4; 29,7; 25,3; 24,0 ppm.

RMN de ^{31}P (300 MHz, $CDCl_3$): 83,04 ppm (P(V)= $PSPH_2$).

$[\alpha]_D$ (0.6 mg/mL em clorofórmio): -8,1°

5.2.7 Síntese dos compostos (13) e (14)

Primeiramente, 1 g de níquel de Raney foi lavado duas vezes com acetonitrila seca e deaerada. Então, 0.1 mmol do precursor do ligante (para o composto **(12)** = 90 mg, 1 eq., para o composto **(10)** = 155.5 mg, 1 eq.), foi solubilizado em 3 mL de acetonitrila seca e deaerada, para assim, adicionar 1 g de Raney Ni (100 eq.) Deixou-se a reação por 7 horas sob N_2 e a temperatura ambiente. O sobrenadante mudou de coloração de amarelo para róseo. Por serem instáveis em atmosfera ambiente, os compostos **(13)** e **(14)** foram imediatamente empregados na etapa de complexação.

5.2.8 Síntese dos complexos (15)-(21)

Os complexos (15), (16) e (17) foram sintetizados adicionando-se 0.02 mmol de composto (9) (125 mg, 1eq.), 10 mL de acetonitrila HPLC e 100 μL de trietilamina em um balão e então adicionando-se as quantidades necessárias de $M^{2+}\text{L}$ para cada reação. As quantidades de $M^{2+}\text{L}$ utilizadas estão mostradas na Tabela 1. A estrutura dos complexos foi determinada a partir da análise conjunta de CHN e espectro de massas.

Tabela 1.Quantidades de sal com relação ao complexo BPP(OM,OM) formado.

Composto	Quantidade	C/H/N	
		(teórico/experimental)	
(15) – BPP(ONi,ONi)	97.3mg, 0.04mmol	Para	C ₄₉ H ₅₃ N ₂ Ni ₂ O ₉ : 63.06/62.3, 5.71/6.58, 4.33/4.4
(16) - BPP(OCu,OCu)	69.2mg, 0.04mmol	Para	C ₄₉ H ₅₂ Co ₂ N ₂ O ₉ : 63.23/63.72, 5.63/5.98, 3.01/ 3.30
(17) – BPP(OMn,OMn)	95.8mg, 0.04mmol	Para	C ₄₅ H ₆₀ Mn ₂ N ₂ O ₁₂ : 58.06/58.00, 6.50/6.20, 3.01/2.86

Os complexos (18), (19) e (20) foram sintetizados adicionando-se o sobrenadante da síntese do composto (13) com uma seringa deaerada com N₂ em um funil de placa sinterizada e celite (o sistema foi previamente flambado). O funil estava conectado a um balão que já continha os sais sólidos desejados e 200 µL de trietilamina (quantidades mostradas na Tabela 2).

Após 2 dias de reação, adicionou-se éter etílico gelado à reação e centrifugou-se. A fração solúvel foi separada e evaporada à vácuo. A estrutura dos complexos foi determinada a partir da análise conjunta de CHN e espectro de massas.

Para o complexo (21) adicionou-se 0.3 mmol do precursor do ligante simétrico (311 mg, 1eq.), 5 mL de acetonitrila seca e deaerada e 3 g de Raney Ni previamente tratado com acetonitrila seca e deaerada em um balão previamente flambado. A reação prosseguiu por 7 horas e então, adicionou-se 106 mg de PdCl₂ (0.59 mmol) e deixou-se

reagir por 1 noite. A purificação se deu pela lavagem do complexo com éter etílico frio e centrifugação, separando-se a parte orgânica, a qual foi evaporada à vácuo.

% C,H,N,Cl,Pd (teórico /experimental), calculado para $C_{67}H_{69}Cl_3N_2O_3P_2Pd_2$:

C (60.4/59.8), H (5.2/ 5.4), N (2.1/ 2.2), Cl (7.99/ 10.11), Pd (16/ 14).

Tabela 2. Quantidades de sais de metal utilizadas na complexação.

Composto	Quantidade de $M^{2+}L$	Quantidade de $PdCl_2$	C/H/N Teórico/experimental
(18)-BPP(OCo,OPPh ₂ Pd)	26.6mg,0.15 mmol	27mg, 0.15mmol	Para $C_{57}H_{57}ClCoN_2O_5PPd$: 63.28/62.52, 5.32/6.01, 2.69/4.51
(19)- BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	14.6mg, 0.1mmol	19mg, 0.1mmol	Para $C_{55}H_{53}Cl_4N_2O_3PPdZn$: 58.20/58.14, 5.04/5.21, 5.56/5.53
(20)-BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	9mg, 0.1mmol	18mg, 0.1mmol	Para $C_{50}H_{48}ClMgN_2O_6PPd$: 61.9/61.5, 5.1/5.5, 4.8/6.8

5.2.9 Reações catalíticas

5.2.9.1 Atividade nitrilo hidratase

A uma cubeta contendo 1 mg de BPP(OCo,OCo) adicionou-se 1 mL de DMF e 100 μ L de uma solução 0.1 molL⁻¹ de aminobenzonitrila e deixou-se reagindo por 30 minutos. Após este período, adicionou-se uma determinada quantidade de água (5, 10 ou 15 μ L)

e mediu-se a formação a aminobenzamida a partir do aumento da banda em 219 nm durante 10 minutos a 25°C.

5.2.9.2 Atividade urease

A 1 mg de BPP(ONi,ONi), adicionou-se 1 mL de DMF e 100 µL de uma solução de uréia 0.1 molL⁻¹ e deixou-se reagindo por 30 minutos. Após este período, adicionou-se 10 µL de uma solução de NaOH 0.1 molL⁻¹ e deixou-se reagindo por 5 horas. Após este período, fez-se o teste de liberação de gás amônia com papel de tornasol vermelho, pelas propriedades organolépticas e pela passagem do gás em um tubo em U para observar o aparecimento de uma colocação rosa em uma solução de fenolftaleína.

5.2.9.3 Atividade catalase

A 1 mg de BPP(OMn,OMn) (≈ 0.95 µ mol) (variações desta quantidade : 2, 3 e 4 mg) adicionou-se 500 µL de DMF e 100 µL de H₂O₂ 30 volumes (variações deste volume: 50, 125, 150 e 200 µL). A formação de oxigênio foi observada a partir da medição do volume de água deslocado de uma proveta emborcada em uma cuba de vidro com água.

5.2.9.4 Acoplamento entre CO₂ e iodeto de metila

Dissolveu-se 2 mg dos complexos (≈ 1.2 mol%) em diclorometano e borbulhou-se CO_2 por 10 minutos. Retirou-se uma alíquota para análise de infravermelho de filme. Prosseguiu-se a reação com a adição de 10 μL de iodeto de metila (0.16 mmol) e deixou-se reagindo por mais 30 minutos. A reação foi analisada por cromatografia gasosa, detectando-se a formação ou não de acetato de metila.

5.2.9.5 Acoplamento entre CO_2 e deceno

As reações de acoplamento entre deceno e gás carbônico foram feitas de duas maneiras distintas:

- Em um balão, adicionou-se 2.5 mg de complexo (≈ 2 μmol) e 3 mL de um solvente (THF ou hexano). Então, ambientou-se a reação com a purga de um gás por 15 minutos (N_2 ou H_2) e adicionou-se 1 mL de deceno. A reação iniciou com o fluxo de gás carbônico (0.5 kgf/cm²) e durou entre 4 e 7 horas. A algumas das reações utilizou-se de luz UV (lâmpada de Hg) como ativador. Extraíu-se a reação adicionando-se base (3x de 0.5 mL de NaOH 0.1 molL⁻¹). A fração básica foi então acidificada com HCl para pH 1, a qual foi re-extraída com diclorometano (3x 0.5 mL). A fração orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e rotoevaporada. As condições específicas estão listadas na Tabela 5, na seção Resultados e Discussão.
- Em uma autoclave, adicionou-se 2.5 mg de complexo (≈ 2 μmol), 1 mL de deceno e fez-se pressão de gás carbônico (de 20 a 50 bar). Deixou-se a reação prosseguir por um período de 4 a 48 horas. A algumas das reações foram adicionados aditivos como HCl (100 μL), $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (30 mg), CF_3COOH (100 μL),

H₂O (100 µL), (NH₄)₃PO₄ (100 mg) e NH₄Cl (100 mg). O autoclave foi despressurizado e extraiu-se a reação adicionando-se base (3x de 0.5 mL de NaOH 0.1 molL⁻¹). A fração básica foi então acidificada com HCl para pH 1, a qual foi re-extraída com diclorometano (3x 0.5 mL). A fração orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e evaporada à vácuo. As condições específicas estão listadas na Tabela 5, na seção Resultados e Discussão.

5.2.9.6 Acoplamento entre CO₂ e isobutano

As reações de acoplamento entre gás carbônico e isobutano foram feitas de duas maneiras distintas:

- Em um autoclave, adicionou-se 2.5 mg de complexo (≈ 2 µmol) e deixou-se a reação sob pressão de uma mistura gasosa 1:1 (mol:mol) de CO₂ e isobutano (de 20 a 50 bar) a uma determinada temperatura (de 60 a 200°C) por um certo tempo (de 4 horas a 48 horas). A algumas das reações foram adicionados aditivos como DMF (100 µL), K₃PO₄ (100 mg) e plaquinhas de TLC impregnadas com NaOH. O autoclave foi despressurizado e extraiu-se os produtos de reação adicionando-se base (3x de 0.5 mL de NaOH 0.1 molL⁻¹). A fração básica foi então acidificada com HCl para pH 1, a qual foi re-extraída com diclorometano (3x 0.5 mL). A fração orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e evaporada à vácuo. As condições específicas estão listadas na Tabela 6.

NOTA: Para garantir que a mistura gasosa fosse realmente composta da proporção 1:1, aqueceu-se o capilar de transferência e o autoclave estoque

contendo CO_2 e isobutano a $180\text{ }^\circ\text{C}$ (temperaturas críticas: $\text{CO}_2=31\text{ }^\circ\text{C}$ e isobutano $136\text{ }^\circ\text{C}$).

- b) Um frasco de quartzo contendo 2.5 mg de complexo ($\approx 2\text{ }\mu\text{mol}$) foi inserido em um banho de gelo seco e acetona ($-70\text{ }^\circ\text{C}$) e então, iniciou-se um fluxo contínuo de gás carbônico (0.5 kgf/cm^2) (ponto de ebulição : $-57\text{ }^\circ\text{C}$ e ponto de fusão: -78°C) e isobutano (1 psi) (ponto de ebulição : $-11.7\text{ }^\circ\text{C}$ e ponto de fusão : -159.6°C). Ligou-se uma lâmpada UV no interior o frasco e deixou-se a reação prosseguir por 6 horas. Analisou-se o produto solúvel em éter etílico.

5.2.9.7 Acoplamento entre CO_2 e iso-octano

Em uma cubeta, adicionou-se 2.5 mg de complexo ($\text{BPP}(\text{OPh}_2\text{Pd}, \text{OPh}_2\text{Pd})$ ou $\text{BPP}(\text{OZn}, \text{OPh}_2\text{Pd}) \approx 2\text{ }\mu\text{mol}$) e 3 mL de iso-octano. Ligou-se a luz UV e iniciou-se a purga de CO_2 (0.5 kgf/cm^2), deixando a reação ocorrer por 7 horas. Extraíu-se a reação adicionando-se base (3x de 0.5 mL de $\text{NaOH } 0.1\text{ molL}^{-1}$). A fração básica foi então acidificada com HCl para $\text{pH } 1$, a qual foi re-extraída com diclorometano (3x 0.5 mL). A fração orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e evaporada à vácuo.

“Um grande futuro! Enquanto esta palavra me batia no ouvido, devolvia eu os olhos, ao longe, no horizonte misterioso e vago.”

Machado de Assis, Memórias Póstumas de Brás Cubas.

6. Resultados e Discussão

Neste trabalho, complexos bimetálicos foram sintetizados e caracterizados compreendendo ligantes simétricos e assimétricos. A propriedade catalítica destes complexos com respeito ao acoplamento de gás carbônico em moléculas orgânicas foi avaliada. Aqui serão discutidos os complexos e suas atividades catalíticas.

6.1 Os ligantes

Objetivou-se a síntese de complexos bimetálicos para verificar a atividade catalítica deles quanto às reações de acoplamento C-C entre CO₂ e alcenos e/ou alcanos. A ideia principal de se ter um complexo bimetálico está baseada na existência de um possível sinergismo entre os sítios metálicos, como ocorre nas enzimas Urease e Fosfotriesterase, de maneira a diminuir a barreira energética das reações. A catálise em uma enzima é possível, pois a enzima se ancora e orienta o substrato por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e estaqueamento π , fazendo com que o sítio reativo do substrato se aproxime do catalisador, facilitando a catálise.¹¹²

Como dito anteriormente, nos complexos desta tese, o efeito dominante para direcionar a catálise seria o efeito quelato. Tal efeito baseia-se na formação de ligações entre dois ou mais sítios ligantes presentes no mesmo ligante e um metal central. Tanto a entropia quanto a entalpia favorecem a formação do complexo quelato, independente da configuração do metal *d*.¹¹³ As contribuições de entropia translacional, rotacional e

vibracional são de extrema importância no efeito quelato, porém, em muitos casos, a entalpia favorável é que rege a formação de um complexo do tipo quelato.^{114,115}

A análise detalhada dos ligantes tais como RMN de ^1H , ^{13}C , ^{31}P , COSY, HETCOR, NOESY e infravermelho encontra-se no apêndice.

6.2 Os complexos

Com os ligantes em mãos, pôde-se seguir para a síntese dos complexos bimetalícos. Esta parte da tese está dividida de acordo com os complexos obtidos para cada tipo de ligante. Nesta seção também caracterizamos os complexos bimetalícos após a interação com o gás carbônico.

6.2.1 BPP(OC_o,OC_o)

O complexo bimetalíco de cobalto foi obtido na forma de um sólido marrom escuro. A forma mais estável deste complexo é com os dois centros metálicos oxidados: $\text{Co}^{3+}/\text{Co}^{3+}$. Analisando-se a estabilidade térmica do BPP(OC_o,OC_o) por termogravimetria (Figura 8) é possível observar que há um pequeno pico exotérmico em 38 °C, temperatura tal que ainda não houve perda de massa, ou seja, este processo exotérmico é provavelmente resultado de uma mudança de estrutura do complexo, como é observado para Dey et al.¹¹⁶ em experimentos de mudanças conformacionais de adutos álcool-calixpirrol. A partir de 45 °C são observados picos endotérmicos até 170 °C com uma porcentagem de perda de massa de 9.5%, o que é igual à saída de dois acetatos. A partir desta temperatura, o complexo inicia a sua decomposição com processos exotérmicos. Sendo um dos processos exotérmicos em 505 °C, possivelmente devido à transição de estado de oxidação +3 a +8/3.¹¹⁷

Figura 8. Termogravimetria do complexo BPP(OCo,OCo) (linha preta) de 20 °C a 700 °C em ar sintético e sua primeira derivada (linha vermelha). Abaixo: Termoanálise diferencial do complexo BPP(OCo,OCo).

Quando submetido à análise de massas por eletrospray (Figura 9), observa-se que não é possível detectar o complexo intacto, justamente pela sua baixa estabilidade térmica, já que em 45 °C já se inicia a sua decomposição. Em contrapartida, o pico em m/z 845,2144 é resultado da perda de um acetato e uma metila e o pico em m/z 799,2065 é devido à perda de dois acetatos e uma metila, indicando a formação do composto. Massas maiores indicam a coordenação de um terceiro acetato, que possivelmente também perde a metila na análise.

Figura 9. Espectro de Massas do complexo BPP(OCo,OCo).

Quando dissolvido em diclorometano, BPP(OCo,OCo) apresenta duas bandas principais e um pequeno ombro (Figura 10). A primeira banda apresenta absorvância máxima em 249 nm ($\epsilon = 2.11 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) possivelmente devido à transição $\pi-\pi^*$ do ligante e a segunda banda está situada em 318 nm ($\epsilon = 1890 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que pode ser devido à transferência de carga ligante-metal. Esta última transição foi atribuída a partir da otimização da geometria em HyperChem pelo método MM+ e posterior cálculo do espectro eletrônico por ZINDO/S, o qual resultou em uma tabela de orbitais moleculares. Esta tabela foi analisada para a transição em 318 nm (3.89 eV) e verificou-se que se trata da transição do orbital molecular 166 para o orbital 168. O orbital 166 está 99% centrado no ligante, enquanto o orbital 168 está 65% centrado no ligante.

Seguindo na análise eletrônica do complexo BPP(OCo,OCo), verifica-se em 404 nm ($\epsilon = 800 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) um pequeno ombro, provavelmente devido à transição $d\pi-\sigma^*$.¹¹⁸ Após a complexação com CO₂ há um deslocamento de 8 nm para o azul da banda em 249 nm e a banda em 318 nm fica difícil de observar. Este deslocamento para maiores energias ocorre devido ao caráter π -aceptor do CO₂. Isto também se traduz nos orbitais HOMO⁻³ e LUMO antes e depois da interação com o gás carbônico (para a

transição eletrônica 249 nm), em que a troca de um acetato por um CO_2 , faz com que LUMO seja centrado no ligante e não mais nos metais, como mostrado na Figura 10.

Figura 10. Espectro eletrônico do complexo BPP(OCo,OCo) antes (linha sólida) e depois (linha tracejada) de borbulhar CO_2 em diclorometano com *inset* de um esquema dos orbitais HOMO⁻³ e LUMO⁺ dos respectivos complexos.

O complexo BPP(OCo,OCo) ao ser submetido a uma voltametria no sentido anódico em DMF, apresenta um processo de oxidação situado em 1.09 V. Como pode ser visto na Figura 11 este processo está associado com o aumento da banda em 264 nm ($\pi-\pi^*$) e com o deslocamento para o azul, em 5 nm, da banda de transferência de carga ligante-metal situada em 322 nm devido à oxidação do fenol.¹¹⁹ Este processo, pela voltametria de pulso diferencial (DPV), possui uma área correspondente a dois elétrons. Ao prosseguir com a oxidação, há um decaimento da banda em 264 nm, juntamente com um aumento de um ombro situado em 410 nm, que pelo DPV indica um processo

possivelmente do solvente que influencia no espectro eletrônico do complexo, devido à complexação do DMF oxidado ao $\text{BPP}(\text{OCo}, \text{OCo})$.

Figura 11. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo $\text{BPP}(\text{OCo}, \text{OCo})$ em DMF TBAClO_4 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletróquímica respectiva ao processo de oxidação em evidência do complexo $\text{BPP}(\text{OCo}, \text{OCo})$.

Quando no sentido catódico, Figura 12, observa-se um processo em -0.65 V que está associado a um aumento das bandas em 264 nm e 322 nm, sendo que a última sofre um deslocamento de 2 nm para o azul, devido à redução de um cobalto(III) para cobalto (II).¹²⁰ O aumento de bandas do tipo LMCT com a redução do Co(III) para Co(II) já foi observado anteriormente por Nguyen et al.¹²¹ Um segundo processo de redução ocorre em -1.05 V e está associado ao decaimento conjunto das bandas em 264, 320 e 410 nm, devido à redução do segundo cobalto(III). Ambos os processos são correspondentes a

uma redução monoeletrônica, indicando a existência de um intermediário $\text{Co}^{3+}/\text{Co}^{2+}$ durante o processo de redução, como observado também na literatura para o segundo processo de redução ¹²². Pôde-se então calcular a constante de comproporcionamento (K_c), encontrando-se um valor de $1,79 \cdot 10^6$, indicando um forte acoplamento entre os dois sítios metálicos. Valores mais altos de K_c já foram encontrados para complexos bimetálicos de cobalto, sugerindo uma forte deslocalização eletrônica em diferentes tipos de complexo. ¹²³

Figura 12. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo $\text{BPP}(\text{OCo}, \text{OCo})$ em DMF TBAClO_4 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletróquímica respectiva ao processo de redução em evidência do complexo $\text{BPP}(\text{OCo}, \text{OCo})$.

Após a complexação do CO_2 no $\text{BPP}(\text{OCo}, \text{OCo})$ o processo de oxidação permanece, enquanto os processos de redução se tornam reversíveis e se juntam em um único processo com integral igual a dois elétrons, como mostrado na Figura 13. Isto se

deve a perda de conexão entre os centros metálicos com a inserção do CO_2 no complexo. Pela espectroeletroquímica do complexo de CO_2 em $\text{BPP}(\text{OCo},\text{OCo})$ no sentido anódico (Figura 13) verificam-se poucas mudanças espectrais, observando-se um decaimento tímido da banda em 400 nm.

Figura 13. Voltametria cíclica anódica em DMF do $\text{BPP}(\text{OCo},\text{OCo})$ após a complexação com CO_2 (linha preta) e seu respectivo DPV (linha cinza).

Já na espectroeletroquímica do $\text{BPP}(\text{OCo},\text{OCo})$ complexado com CO_2 no sentido catódico (Figura 14), verifica-se primeiramente um discreto aumento da banda em 258 nm no processo situado entre 0,5 V e -0,7 V. Um segundo processo está associado a um decaimento das bandas de transferência de carga em 258 nm, e das bandas d-d em 329 nm e 420 nm. Este comportamento está de acordo com o observado para o $\text{BPP}(\text{OCo},\text{OCo})$ sozinho, porém, como não há mais uma interação forte entre os centros de cobalto devido à troca da ponte *-oxo* pelo gás carbônico, as mudanças espectrais são menores.

Figura 14. Voltametria cíclica catódica em DMF do BPP(OCo,OCo) após a complexação com CO_2 (linha preta) e seu respectivo DPV (linha cinza).

Para verificar como que o CO_2 está coordenado, avaliamos o espectro no infravermelho antes e depois da interação com gás carbônico. Pela análise de infravermelho verifica-se a presença de bandas de estiramento C-H saturado e insaturado na região A de 3090 a 2850 cm^{-1} (anexo 52). Em 1686 cm^{-1} (Figura 15 B) e 1544 cm^{-1} (Figura 15 D) há a banda de estiramento C=O dos grupos acetato nos modos assimétrico e simétrico, respectivamente. Outra banda característica está presente em 1433 cm^{-1} (Figura 15 E), devido ao estiramento C-O dos acetatos. Estas bandas podem nos dizer o modo em que o acetato está coordenado aos metais, pois o carboxilato pode ser coordenar de três maneiras distintas em complexos bimetálicos: a monodentada, a bidentada em modo quelato e a bidentada como ponte entre dois centros metálicos. A espectroscopia de infravermelho pode distinguir entre os três modos de coordenação verificando os estiramentos referentes à carbonilas. Quando se tem o modo

monodentado a banda do grupamento - COOH se situa próxima a 1690 cm^{-1} , porém, quando forma-se o carboxilato na forma quelato esta banda desaparece e duas novas bandas surgem próximas a 1590 e 1455 cm^{-1} , enquanto para a forma bidentada em ponte uma banda em 1611 cm^{-1} aparece. No complexo BPP(OCo,OCo) as três bandas de carbonila observadas indicam uma mistura de modos coordenação do acetato, sendo eles monodentado e na forma quelato.

O que mais caracteriza a complexação do gás carbônico são as bandas de estiramento C=O e C-O, desta forma, citaremos apenas as bandas mais características de tais complexos após a complexação do gás carbônico no complexo inicial: observa-se bandas em 1657 cm^{-1} , 1598 cm^{-1} e 1365 cm^{-1} (Figura 15, A,C e F) características do modo η^2 e $\mu_2\text{-}\eta^2$ de complexação do CO_2 , havendo portanto uma mistura destes modos no complexo resultante.

Figura 15. Espectro no infravermelho do complexo BPP(OCo,OCo) antes (linha preta) e depois (linha cinza) de interagir com CO_2 . Ao lado estão representações dos possíveis modos de coordenação do CO_2 no complexo BPP(OCo,OCo) vistas pelo espectro em cinza.

Observa-se que apesar do modo de coordenação $\mu_2\text{-}\eta^2$ apresentar uma conexão entre os dois centros de cobalto, como visto pela voltametria cíclica, a distância r entre os centros aumentou de maneira a não haver um acoplamento essencial entre os orbitais moleculares dos cobaltos para que haja um composto de valência mista.¹²⁴

6.2.2 BPP(ONi,ONi)

O complexo dinuclear de níquel possui uma aparência cristalina de coloração verde esmeralda. A estabilidade térmica do BPP(ONi,ONi) foi avaliada por termogravimetria e termoanálise diferencial (Figura 16). Observa-se um processo exotérmico ao redor de 42 °C devido a mudanças estruturais do complexo. Uma perda gradual de massa de 20 % até 270 °C está associada a processos levemente endotérmicos, ou seja, com baixa entalpia, e também a alguns processos exotérmicos, provavelmente devido à saída de três acetatos. Praticamente toda a parte orgânica é decomposta em 300 °C por um processo endotérmico e então a decomposição segue com processos exotérmicos, sendo o maior deles em 615 °C, provavelmente para a formação de óxidos de níquel.¹²⁵

Figura 16. Termogravimetria do complexo BPP(ONi,ONi) (linha preta) de 20°C a 700°C em ar sintético e sua primeira derivada (linha vermelha). Abaixo: Termoanálise diferencial do complexo BPP(ONi,ONi).

Assim como para o complexo BPP(OCO,OCO), o espectro de massas obtido para o BPP(ONi,ONi) é resultado da sua decomposição, devido à sua baixa estabilidade térmica e está mostrado no apêndice.

Quando dissolvido em acetonitrila, o complexo apresenta um espectro eletrônico com quatro bandas principais como mostrado na Figura 17. Sendo uma em 295 nm característica do ligante ($\pi-\pi^*$), outra em 374 nm ($\epsilon = 23.4 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) devido à transferência de carga ligante-metal e bandas em 489 nm ($\epsilon = 3.1 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 730 nm ($\epsilon = 3.2 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 795 nm ($\epsilon = 2.8 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) referentes à transição d-d.

É observado ainda, o início de uma banda com máximo próximo de 1100 nm ($\epsilon = 3.8 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para uma análise detalhada do ambiente em que os Ni^{2+} se

encontram no complexo fez-se um estudo das possíveis geometrias dos centros metálicos comparando-se as transições obtidas com as transições características de determinadas geometrias. Em ambiente octaédrico, Ni^{2+} , d^8 , apresenta transições devidas a ${}^3\text{A}_{2g} \rightarrow {}^3\text{T}_{2g}$ (entre 769 nm e 1250 nm), ${}^3\text{A}_{2g} \rightarrow {}^3\text{T}_{1g}(\text{F})$ (entre 666 nm e 526 nm) e ${}^3\text{A}_{2g} \rightarrow {}^3\text{T}_{1g}(\text{P})$ (entre 400 nm e 333 nm). As absorptividades molares destas bandas geralmente são menores que 20, o que indica que os átomos de níquel do complexo $\text{BPP}(\text{ONi}, \text{ONi})$ estão provavelmente em ambiente octaédrico.

Figura 17. Espectro eletrônico do complexo $\text{BPP}(\text{ONi}, \text{ONi})$ em diclorometano.

Quando complexado com gás carbônico e em solução mais diluída que a utilizada para tirar o espectro da Figura 39 observa-se na Figura 18, que o $\text{BPP}(\text{ONi}, \text{ONi})$ apresenta banda em 291 nm da transição $\pi-\pi^*$ do ligante. Em 336 nm está situada a banda de transição de carga ligante-metal e em 375 nm está uma das bandas de transição LMCT. Este deslocamento para maior energia está provavelmente associado com a mudança do ligante para um ligante de campo forte receptor π .

Figura 18. Espectro eletrônico do complexo BPP(ONi,ONi) antes (linha contínua) e depois (linha tracejada) de complexar com gás carbônico.

Para avaliar o comportamento magnético do complexo BPP(ONi,ONi), foi feita uma análise de momento efetivo da molécula com relação à temperatura. Observa-se que com o aumento da temperatura há um aumento do momento efetivo do complexo, encontrando-se um máximo em $4.6 \mu_B$, como observado na Figura 19A. O próximo passo seria o encontrar um valor de g válido para a molécula para colocar na fórmula $\mu_{\text{eff}} = g (J(J+1))^{1/2}$ para que assim fosse possível verificar quantos spins estão desemparelhados no complexo. Encontra-se valores de g (fator g , ou momento magnético adimensional) através da fórmula abaixo:

$$g = 1 + \{S(S+1) - L(L+1) + J(J+1)/2J(J+1)\} \quad \text{Equação 1}$$

Variando-se os valores de S encontramos diferentes valores de μ_{eff} , os quais estão listados na Tabela 3. Desta maneira, verifica-se que para o valor de μ_{eff} igual a $4.6 \mu_B$ o spin total tem que ser igual a 1. Porém no BPP(ONi,ONi) existem dois átomos de

níquel, o que resultaria num spin total igual a 2 e não 1. Este resultado indica que os centros metálicos estão próximos o suficiente para interagirem entre si.

Tabela 3. Valores de μ_{eff} para cada valor de S.

S	L	J	g	μ_{eff}
0	2	2	1.00	2.45
$\frac{1}{2}$	2	$\frac{5}{2}$	1.24	3.66
1	2	3	1.33	4.60
$\frac{3}{2}$	2	$\frac{7}{2}$	1.42	5.63
2	2	4	1.50	6.70

Este tipo de interação entre orbitais metálicos é chamado de *supertroca*, devido à grande distância (3-5 Å) entre os íons metálicos. Na ausência de interações metal-metal fortes devido a sobreposição direta dos orbitais d, os níveis dos orbitais moleculares do dímero são parecidos com os níveis de campo ligante de cada monômero, porém os níveis do par de monômeros serão levemente divididos, devido à perturbação do átomo metálico. A interação de *supertroca* está diretamente relacionada com o ângulo entre metal-ligante-metal, sendo esperado um elevado acoplamento antiferromagnético para ângulos de 180° quando o orbital metálico interage com um orbital ligante de mesma simetria. Acoplamentos ferromagnéticos são esperados para ângulos de 90° entre o orbital metálico e um orbital ortogonal do ligante.¹²⁶

Pela análise da susceptibilidade magnética com relação à temperatura, Figura 19B, verifica-se que o complexo binuclear de níquel é paramagnético, exibindo paramagnetismo de Curie, ou seja, verifica-se que há uma interação que tenta alinhar os momentos magnéticos nos átomos com o campo magnético. A dependência com a

temperatura é resultado da competição entre a tendência que alinha os momentos paralelos ao campo e a tendência da agitação térmica em romper este alinhamento, então, quando há uma pequena interação entre os momentos de diferentes átomos tem-se o paramagnetismo de Currie-Weiss. Esta interação pode alinhá-los ou acoplá-los, porém, como o complexo BPP(ONi,ONi) ainda exibe paramagnetismo, a interação antiferromagnética é pequena.

Figura 19. Relação entre o momento efetivo do BPP(ONi,ONi) e a temperatura (A) e relação entre a susceptibilidade magnética e a temperatura (B).

Sabendo-se que os centros de níquel estão acoplando, espera-se que isto também seja observado na voltametria cíclica. Com isto, submeteu-se o complexo BPP(ONi,ONi) à voltametria cíclica em DMF seco. No sentido anódico, verifica-se dois processos de oxidação difíceis de separar até mesmo por DPV, sendo cada um deles, um processo bieletrônico, como mostrado na Figura 20. O primeiro processo em 0.98 V está associado com o aumento das bandas em 269 nm, 285 nm, 354 nm e 421 nm, devido à oxidação do fenol. Este processo de oxidação faz com que as bandas de transferência de carga ligante-metal centradas em 354 nm e 421 nm sejam intensificadas

devido à mudança de geometria do complexo de octaédrico para pirâmide quadrangular. No segundo processo de oxidação, que ocorre em 1.24 V, há uma diminuição das bandas $\pi-\pi^*$ e das bandas LMCT da geometria octaédrica de Ni^{2+} juntamente com o aumento de uma banda centrada em 396 nm, banda tal, devido à oxidação dos centros metálicos à Ni^{3+} , sendo caracterizada como transferência de carga ligante-metal. Isto se dá devido ao fato da banda de transferência de carga aumentar sua intensidade com o aumento do número de oxidação do centro metálico e ¹²⁷ em complexos de Ni^{3+} , as bandas LMCT situam-se próximas a 380 nm, como encontrado para o BPP(ONi,ONi).

128 129

Figura 20. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo BPP(ONi,ONi) em DMF TBAClO₄ 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletróquímica respectiva ao processo de oxidação em evidência do complexo BPP(ONi,ONi).

A interação não pode ser vista no sentido da oxidação devido ao fato da oxidação do fenol, que ocorre antes da oxidação do níquel, retirar a ponte *-oxo* entre os dois Ni^{2+} , porém, como vimos no estudo de magnetismo, no $\text{BPP}(\text{ONi}, \text{ONi})$ há uma interação eletrônica entre os dois centros metálicos. Esta interação deve ser manifestada pela separação de seus potenciais redox, sendo que em potenciais intermediários, o complexo existe na sua forma de valência mista ¹³⁰ e é exatamente isto o que é observado na voltametria cíclica no sentido catódico (Figura 21). Verifica-se a existência de dois processos monoeletrônicos de redução: um situado em -0.36 V e o outro em -0.88 V, os quais são devido à redução de cada níquel a Ni^{1+} . Associado ao primeiro processo de redução está o aumento das bandas em 266 nm, 292 nm e 384 nm, sendo que estas duas últimas sofrem um deslocamento batocrômico de 20 e 30 nm, respectivamente. Estas bandas são de difícil atribuição, podendo ser transferência de carga metal-ligante ou bandas de transferência eletrônica interna ligante-ligante. A segunda redução está associada com um leve decaimento destas bandas. Sabendo-se que são de dois processos de redução separados dos centros metálicos, podemos calcular a constante de comproporcionamento, encontrando um valor de 6×10^8 , característicos de sistemas fortemente acoplados.

Após a complexação do gás carbônico no $\text{BPP}(\text{ONi}, \text{ONi})$ verifica-se que na oxidação do complexo resultante, o processo em 0.98 V devido à oxidação do fenol à quinona ainda está presente, estando associado com o aumento das bandas em 261 nm, 288 nm e 342 nm, processo já escrito anteriormente, como mostrado na Figura 22.

Pela análise do DPV, verifica-se que a proporcionalidade entre o processo de oxidação e o de redução é de 2:1, sendo $2e^-$ da oxidação do fenol e $2e^-$ da oxidação dos dois centros de Ni^{2+} a Ni^{3+} e $2e^-$ na redução de Ni^{2+} para Ni^{1+} ($1e^-$ por cada redução). Pode-se afirmar isto devido ao fato da espectroeletroquímica ser uma soma do aumento

da banda $\pi-\pi^*$ com o aumento da banda centrada em 342 nm, banda tal, devido à oxidação dos centros metálicos à Ni^{3+} , sendo caracterizada como transferência de carga ligante-metal, com maior energia que para o complexo BPP(ONi,ONi) (situada em 396 nm) por termos agora um ligante π doador forte no lugar de um acetato.

Figura 21. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo BPP(ONi,ONi) em DMF TBAClO_4 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletróquímica respectiva ao processo de redução em evidência do complexo BPP(ONi,ONi).

Figura 22. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo BPP(ONi,ONi) após borbulhar CO_2 por 30 minutos em DMF TBAClO_4 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletróquímica respectiva ao processo de redução em evidência.

Já no sentido da redução, Figura 23, observa-se o surgimento de um processo quase reversível em -0.41 V, o qual faz uso de $2e^-$ para fazer a redução dos dois centros de Ni^{2+} para Ni^{1+} , como mostrado anteriormente. Este processo está associado com a diminuição discreta das bandas em 296 nm e 343 nm.

Figura 23. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo BPP(ONi,ONi) após borbulhar CO_2 por 30 minutos em DMF TBAClO_4 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletróquímica respectiva ao processo de redução em evidência.

Analisando-se o espectro no infravermelho do complexo BPP(ONi,ONi) vemos um conjunto de sinais na região entre 3200-2800 cm^{-1} devido à absorbância C-H saturado e insaturado (Anexo 54). Na Figura 24, vê-se que há uma banda não muito intensa em 1719 cm^{-1} e duas bandas intensas em 1671 cm^{-1} e 1579 cm^{-1} , referentes às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do acetato, respectivamente. Como no espectro é observada uma banda em 1682 cm^{-1} (Figura 24, linha preta, A), existe a hipótese de coordenação monodentada no complexo. Porém, as bandas da forma quelato também são observadas em 1565 cm^{-1} e 1426 cm^{-1} (Figura 24, linha preta, B e C). Além disso, pode-se observar que a banda em 1682 cm^{-1} possui um ombro em números de onda menores, o que pode indicar a presença do complexo em ponte também. Assim, como as bandas características de tanto de complexo quelato, complexo monodentado quanto de complexo em ponte são observadas no espectro, admite-se que existe os três modos no BPP(ONi,ONi). Isto vem a confirmar a geometria observada no espectro eletrônico, havendo um equilíbrio entre os modos de coordenação.

Após borbulharmos CO_2 , a maior diferença que observamos entre os espectros de infravermelho antes e depois é aparecimento de uma banda em 1366 cm^{-1} (Figura 24, linha cinza, D) e outras três em 1215, 1186 e 1148 cm^{-1} (Figura 24, linha cinza, E,F e G), referentes à formação de uma mistura de complexos do tipo $\mu_2\text{-}\eta^3$, classe I e II do gás carbônico.

Figura 24. Espectro no infravermelho do complexo BPP(ONi,ONi) antes (linha preta) e depois (linha cinza) de complexar com CO₂. Ao lado estão representações dos possíveis modos de coordenação do CO₂ no complexo BPP(ONi,ONi) vistas pelo espectro em cinza.

6.2.3 BPP(OMn,OMn)

O complexo bimetalico de manganês foi obtido como um sólido marrom claro que não é estável à temperatura ambiente, como pode ser visto na Figura 25 com a análise térmica do complexo. Verifica-se uma perda de 7 % de massa de 20 °C a 100 °C a qual está associada a um processo exotérmico situado em 45 °C e dois processos endotérmicos situados em 62 °C e 80 °C. Esta perda de massa possivelmente é devido à perda de água coordenada ao manganês. Entre 100 °C e 290 °C pequenos processos exotérmicos ocorrem com uma perda de 24 % da massa do complexo sem as águas coordenadas. Este processo está provavelmente relacionado à perda dos acetatos. Em

290 °C há a perda de 37 % de massa. A partir desta temperatura, a decomposição da maior parte orgânica se inicia com processos exotérmicos até 700 °C.

Figura 25. Termogravimetria do complexo BPP(OMn,OMn) (linha preta) de 20°C a 700°C em ar sintético e sua primeira derivada (linha vermelha). Abaixo: Termoanálise diferencial do complexo BPP(OMn,OMn).

Assim como para o complexo BPP(ONi,ONi), o espectro de massas do complexo BPP(OMn,OMn) está discutido no apêndice.

Quando dissolvido em DMF, o complexo BPP(OMn,OMn) apresenta cinco bandas principais. Na Figura 26, a banda em 268 nm ($\epsilon = 5410 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) é centrada no ligante, provavelmente devido à transição $\pi-\pi^*$. A banda em 281 nm ($\epsilon = 4742 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) também está centrada no ligante. As bandas em 343 nm ($\epsilon = 1132 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e em 489 nm ($\epsilon = 362 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) possivelmente são correspondentes à transferência de carga metal-ligante. O fato de não haver uma banda intensa na região

de 600 nm pode indicar que o estado Mn(II)-Mn(II) é o preferencial no complexo BPP(OMn,OMn) .¹³¹

Após a complexação com CO_2 , a banda em 281 nm diminui em sua intensidade e a banda em 343 nm se desloca para 330 nm, como observado na Figura 26. Há também o surgimento de uma banda larga entre 800 e 1100 nm, que pode ser correspondente a uma banda de intervalência.¹³²

Figura 26. Espectro eletrônico do complexo BPP(OMn,OMn) antes (linha contínua) e depois (linha pontilhada) da complexação com CO_2 .

Analisando-se a voltametria cíclica realizada em DMF, Figura 27, verifica-se que no sentido anódico existem dois processos de oxidação. O primeiro está situado em 1.05 V e já foi amplamente discutido como sendo da oxidação do fenol, envolvendo dois elétrons e associado com o aumento das bandas em 263 nm, 281 nm e um leve decaimento da banda em 418 nm devido ao aumento da contribuição da transição $\pi-\pi^*$ e da diminuição da transição de transferência de carga metal-ligante. O segundo processo está situado em 1.28 V e de acordo com a análise de DPV (linha cinza, Figura 27) está relacionado com um processo monoeletrônico sendo associado com o aumento das bandas em 263, 281, 336 e 418 nm, possivelmente devido à formação de Mn^{3+} e

consequente mudança de geometria para que haja um aumento das transições de transferência de carga e $\pi-\pi^*$.^{131 133}

Figura 27. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMn,OMn) e suas respectivas espectroeletróquímicas anódicas.

No sentido catódico, Figura 28, o complexo BPP(OMn,OMn) apresenta um processo de redução em -0,8 V que envolve a presença de quatro elétrons, ou seja, os dois centros de manganês são reduzidos ao mesmo tempo a Mn^0 .¹³⁴ A redução faz com que haja um aumento das bandas em 263, 281, 336 e 418 nm, chamado efeito hipercrômico. Foi descrito na literatura, um complexo de $Mn(0)$ que sofria fotólise em solução, podendo ser uma das razões para que haja um efeito hipercrômico do complexo BPP(OMn,OMn) quando reduzido.¹³⁵

Figura 28. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMn,OMn) e sua respectiva espectroeletródica no sentido catódico.

Com a complexação do gás carbônico, o segundo processo de oxidação desaparece, havendo somente a oxidação do fenol juntamente com o aumento de todas as bandas presentes no espectro eletrônico, como observado na Figura 29. Já no sentido da redução, há a redução monoeletrônica de um dos centros metálicos. Como pôde ser visto no espectro eletrônico (Figura 29), a interação do gás carbônico com o complexo BPP(OMn,OMn) gera uma banda de intervalência, provavelmente $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$, sendo então possível que o CO_2 se insira via adição oxidativa e a redução *quasi*-reversível centrada em -0.67 V seja devido à existência deste novo estado de oxidação, transformando Mn^{3+} em Mn^{2+} . Isto faz com que as bandas existentes no espectro eletrônico decaiam a medida que aplicamos potenciais negativos (Figura 29, D) na espectroeletródica, de maneira inversa à redução tetraeletrônica observada para o BPP(OMn,OMn) antes de interagir com CO_2 .

Figura 29. (A) Voltametria cíclica do complexo BPP(OMn,OMn) após a complexação com gás carbônico e sua respectiva espectroeletroquímica no sentido anódico (C) e (B) Voltametria cíclica do complexo BPP(OMn,OMn) após a complexação com gás carbônico e sua respectiva espectroeletroquímica no sentido catódico (D).

O espectro no infravermelho do complexo BPP(OMn,OMn) apresenta bandas de estiramento C-H encontram-se na região de 3054 a 2859 cm^{-1} , como pode ser visto em anexo (Anexo 56).¹³⁶ Bandas de estiramento de carbonila assimétrico e simétrico estão presentes em 1698 cm^{-1} e 1658 cm^{-1} , respectivamente (Figura 30 A e B) indicando a presença de acetato no complexo. É possível ver a banda de estiramento O-H em 3500 cm^{-1} .

Avaliando-se como que o gás carbônico está complexado no BPP(OMn,OMn), verificou-se o espectro no infravermelho após a sua complexação e observou-se bandas características do modo de complexação $\mu_2\text{-}\eta^2$, presentes em 1409 cm^{-1} e 1098 cm^{-1} (Figura 30 C e D).

Figura 30. Espectro no infravermelho do complexo BPP(OMn,OMn) antes (linha preta) e depois (linha cinza) de complexar com CO₂. Ao lado está indicado um possível modo de coordenação do CO₂ ao BPP(OMn,OMn), deduzido a partir do espectro em cinza.

6.2.4 BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd)

O complexo bimetálico de paládio foi obtido como um sólido laranja, o qual quando submetido a uma análise térmica, até 95 °C não apresenta perda de massa, porém, sofre uma mudança conformacional, pois há um pico exotérmico com fim em 55 °C (Figura 31). Entre 95 °C e 135 °C há uma perda de 7 % de massa, possivelmente correspondendo à perda dos cloretos. Entre 135 °C e 400 °C, 65 % da massa é perdida como decomposição do ligante. Associado a estas perdas estão processos endotérmicos. Após 650 °C há um processo exotérmico possivelmente devido à formação de óxido de paládio.

Figura 31. Análise termogravimétrica do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) (linha preta) e sua derivada (linha vermelha). Abaixo: Análise térmica diferencial do complexo.

Pela voltametria cíclica no sentido anódico em acetonitrila observa-se três processos de oxidação situados em 1.03, 1.33 e 1.73 V, que pela análise de DPV possuem a proporcionalidade de 2:1:1 elétrons. O primeiro processo está associado com um decaimento da banda de transferência de carga ligante-metal em 225 nm e um aumento da banda em 254 nm devido à transição $\pi-\pi^*$, como mostrado na Figura 32 B. O segundo processo, Figura 32 C, está associado com um aumento da absorção em 225 nm e 250 nm juntamente com o surgimento de uma banda com máximo de absorção em 325 nm. Estas mudanças espectroscópicas são devido à oxidação monoelétrica de Pd(II)-Pd(II) a Pd(II)-Pd(III), resultando em um aumento da banda LMCT.¹³⁷ A existência de um complexo com valência mista é possível devido a formação eletroquímica de uma ligação Pd-Pd, que resulta em um sistema Pd^{II}-Pd^{III} fortemente

acoplado com uma constante K_c de 1.48×10^6 . Finalmente, o terceiro processo é devido à oxidação Pd(II)-Pd(III) para Pd(III)-Pd(III), evidenciada pelo aumento das bandas de absorção em 250 e 285 nm, juntamente com um deslocamento hipsocrômico da banda em 325 nm para 316 nm.¹³⁸

Figura 32. Voltametria cíclica do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) em acetonitrila e 0.1 M de TBAClO₄ como eletrólito e sua respectiva análise voltamétrica de pulso diferencial (A). Espectroeletroquímica do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) entre 0.5 e 1.2 V (B). Espectroeletroquímica do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) entre 1.2 e 1.46 V (B). Espectroeletroquímica do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) entre 1.46 e 1.8 V (B).

O terceiro processo está também associado com a formação de Pd(0) devido ao desproporcionamento do Pd(III) em Pd(0) e Pd(IV).^{139,140} Na presença de ácido perclórico o complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd)Cl é oxidado para Pd(II)-Pd(III), já que

apenas o terceiro processo de oxidação é observado nos estudos voltamétricos (Anexo 60). A formação do Pd(III) paramagnético na presença de ácido perclórico é evidenciada pela medida de EPR, em que observa-se um sinal isotrópico com $g=2.075$ e com acoplamento hiperfino do ^{105}Pd (22.8% de abundância, $I=5/2$) de $A_{\perp}=48\text{ G}$. (Anexo 61)

O borbulhamento de CO_2 em uma solução de $\text{BPP}(\text{OPh}_2\text{Pd}, \text{OPh}_2\text{Pd})\text{Cl}$ em acetonitrila resulta no aparecimento de duas novas bandas: uma em 313 nm e outra em 360 nm, como pode ser observado na Figura 33. Estas bandas são características de transições do tipo LMCT de Pd(III), como observado anteriormente na espectroeletroquímica. Desta forma, pensou-se que o gás carbônico se inseriu no complexo via adição oxidativa.

Figura 33. Espectro eletrônico do complexo $\text{BPP}(\text{OPh}_2\text{Pd}, \text{OPh}_2\text{Pd})\text{Cl}$ antes (linha contínua) e depois (linha pontilhada) de interagir com gás carbônico.

Para analisar se realmente o gás carbônico se inseriu no complexo via adição oxidativa, fez-se uma análise de EPR a 77K para o complexo

BPP(OPPh₂PdCO₂OPPh₂Pd) em acetonitrila e observou-se um sinal paramagnético de Pd³⁺ com g=2.065, como pode ser visto na Figura 34, assim como já observado antes por outros grupos. (REFERENCIA)

Figura 34. Espectro EPR do complexo BPP(OPPh₂Pd,CO₂,OPPh₂Pd) em acetonitrila e 77K.

Partindo-se então do princípio que ao menos um dos paládios está na forma de Pd(III) após a complexação com CO₂, a análise voltamétrica nos ajudaria a ver quantos sítios foram oxidados. Verificou-se que existem apenas dois processos de oxidação, um situado em 1.08 V e outro em 1.33 V com a proporcionalidade de 1:1, como pode ser visto no espectro de DPV (Figura 35 A). Como o primeiro processo ainda é devido à oxidação do ligante e envolve dois elétrons, o segundo processo também deve envolver dois elétrons. Desta maneira, quando a espectroeletroquímica de 1.1 V a 1.5 V é analisada, é possível verificar o surgimento de transições d-d de Pd(IV). Havendo um ombro em 353 nm (possivelmente ¹A_{1g} → ¹T_{2g}) e uma banda com baixa absortividade em 424 nm (possivelmente ¹A_{1g} → ¹T_{1g}). Quando vamos para potenciais de oxidação maiores há um aumento da absorção em 250 nm e um deslocamento para o vermelho da banda 323 nm para 353 nm, correspondendo a um aumento desta transição. Conclui-se que com a inserção do gás carbônico, há a oxidação dos dois centros de paládio.

Figura 35. Voltametria cíclica do complexo BPP(OPPh₂Pd,CO₂,OPPh₂Pd) em acetonitrila e 0.1 M de TBAClO₄ como eletrólito e sua respectiva análise voltamétrica de pulso diferencial (A). Espectroeletroquímica do complexo BPP(OPPh₂Pd,CO₂,OPPh₂Pd) entre 0.5 e 1.2 V (B). Espectroeletroquímica do complexo BPP(OPPh₂Pd,CO₂,OPPh₂Pd) entre 1.2 e 1.46 V (B). Espectroeletroquímica do complexo BPP(OPPh₂Pd,CO₂,OPPh₂Pd) entre 1.46 e 1.8 V (B).

No sentido catódico, observa-se dois processos de redução, um em -0.49 V e outro em -0.95 V (Figura 36). O primeiro processo se dá pela redução Pd(II)-Pd(II) para Pd(I)-Pd(II) e está associado com o decaimento das bandas em 204 nm e 223 nm. O segundo processo está associado com o aumento das bandas em 204, 223 e 253 nm e se dá pela redução da espécie Pd(I)-Pd(II) para Pd(I)-Pd(I). Paládio no estado de oxidação 1+ apresenta a formação de ligações Pd-Pd.¹⁴¹ Um leve aumento de bandas em 336 nm possivelmente resulta da transição de carga metal-metal, creditando a formação de Pd(I)-Pd(I) e consequentemente da ligação Pd-Pd.

Figura 36. Voltametria cíclica do complexo BPP(PPH₂Pd,OPPh₂Pd) em acetonitrila e 0.1 M de TBAClO₄ e suas respectivas espectroeletroquímicas (de -0.25V a -0.7 V e de -0.75 V a 1.2 V).

Ao complexar com gás carbônico, os processos de redução antes observados não existem devido a formação da espécie Pd(III)-Pd(III) via adição oxidativa do CO₂. Por outro lado, observa-se um processo de redução em -0.18 V possivelmente correspondente à redução Pd(III)-Pd(III) a Pd(II)-Pd(II), o qual está associado ao aumento das bandas em 223 e 260 nm, como pode ser visto na Figura 37.

Figura 37. Voltametria cíclica do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) após a interação com gás carbônico em acetonitrila e TBAClO₄ 0.1 M. Na esquerda a respectiva espectroeletroquímica entre 0.2 V a -0.25 V.

O espectro no infravermelho do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd)Cl apresenta bandas de estiramento C-H na região de 3083 a 2857 cm⁻¹ (espectro total no anexo 62).¹³⁶ A vibração de estiramento P-C₆H₅ é encontrada em 1492 cm⁻¹ (Figura 38 D), enquanto a de estiramento P-O-C encontra-se em 1159 cm⁻¹ (Figura 38 G), juntamente com a banda em 840 cm⁻¹ devido ao estiramento P-O.¹³⁶ Já quando o gás carbônico se insere no complexo binuclear de paládio, verifica-se a formação de diversos complexos de CO₂ evidenciados pelo aparecimento de uma banda em 1730 cm⁻¹, correspondente ao complexo do tipo η^2 e bandas de um complexo tipo $\mu_2-\eta^2$ aparecem em 1696 e 1505 cm⁻¹, juntamente com bandas em 1455 e 1261 cm⁻¹, características dos modos $\mu_2-\eta^3$ classe II. Uma maneira de avaliar qual complexo está em maior proporção é através da análise da intensidade relativa das bandas citadas. Como bandas de carbonila tendem a ser muito intensas e elas estão na mesma intensidade ou em menor intensidade que as outras bandas, conclui-se que o complexo que não possui o grupo carbonila foi formado em maior proporção, neste caso, o complexo do tipo $\mu_2-\eta^3$, classe II.

Figura 38. Espectro no infravermelho do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd)Cl antes (linha preta) e depois (linha cinza) de complexar com gás carbônico. Ao lado: representação dos complexos de CO₂ formados.

6.2.5 BPP(OMg,OPPh₂Pd)

Obteve-se o complexo misto de magnésio e paládio a partir do ligante BPP(OH,OPPh₂). O complexo obtido apresentou uma coloração marrom claro, sendo solúvel na maior parte dos solventes orgânicos. A análise termogravimétrica, Figura 39, mostra um processo exotérmico centrado em 58 °C sem perda de massa, provavelmente devido a mudanças estruturais do complexo. Entre 58 °C e 140 °C há um leve aumento de massa de aproximadamente 2% associado a um processo endotérmico que possivelmente se dá pela oxidação da amostra. Após esta temperatura o complexo perde 70 % de sua massa até 305 °C em um processo endotérmico, sendo equivalente à perda de quase todo conteúdo orgânico do ligante. Em 555 °C inicia-se mais uma perda de

massa, associada a um processo exotérmico, possivelmente sendo resultado da formação de óxidos metálicos.

Figura 39. Análise térmica do complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd) e sua derivada. Abaixo: Termoanálise diferencial do complexo BPP(OMg,PPPh₂Pd).

Pela análise de espectroscopia UV-Vis, Figura 40, verifica-se a presença de uma banda em 240 nm ($\epsilon = 211 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) provavelmente devido a transição $\pi-\pi^*$, outra banda em 314 nm ($\epsilon = 222 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) possivelmente devido um resultado de uma transição $d-\pi^*$ localizada no ligante¹⁴² e por último, um ombro em 368 nm ($\epsilon = 106 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que pode ser devido à transferência de carga ligante-metal.¹⁴³

Com a complexação do CO₂ no complexo bimetalico de Mg e Pd há um deslocamento de 5 nm para o azul da banda em 243 nm, como mostrado na Figura 40. O CO₂ ligado pelo carbono atua como um ligante de campo forte e receptor π e a

complexação com o gás carbônico faz com que haja um aumento da energia de transição como foi observado.

Figura 40. Espectro eletrônico do complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd) antes (linha contínua) e após a complexação do gás carbônico (linha pontilhada).

Quando dissolvido em DMF, o complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd) apresenta dois processos de oxidação, que pela análise de DPV, indica que ambos são bieletrônicos como pode ser observado na Figura 41. O primeiro processo, como observado anteriormente, é devido à oxidação do fenol e está centrado em 0.96 V, estando associado com o aumento das bandas em 258 nm e 287 nm, justamente devido ao aumento das transições $\pi-\pi^*$. O segundo processo, em 1.18 V, se trata da oxidação do Pd²⁺ para Pd⁴⁺ e está associado a um leve aumento das bandas em 258 nm e 317 nm. A banda em 317 nm está deslocada em 36 nm da banda de Pd(IV) observada no complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd)Cl (Figura 33), isto se deve devido ao fato do ligante assimétrico ser um ligante receptor π melhor que o complexo simétrico devido à menor polarizabilidade.

Figura 41. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd) e suas respectivas espectroeletroquímicas no sentido anódico.

Já no sentido catódico, Figura 42, um processo monoeletrônico em -0,30 V está associado com o aumento da banda situada em 258 nm na espectroeletroquímica, provavelmente devido à redução do Pd²⁺ a Pd¹⁺ o que acarreta no aumento da banda de transferência de carga. O segundo processo, em -0,80 V, apesar de não poder se afirmar como redução Mg(II)/Mg(0), a atribuição de uma redução bieletrônica do Mg é mais sensata do que atribuições de redução do ligante ¹⁴⁴, já que este processo não está associado a mudanças espectrais na espectroeletroquímica e não é observado nos outros complexos.

Figura 42. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd) e sua respectiva espectroeletroquímica no sentido catódico.

Com o borbulhamento de gás carbônico na solução de BPP(OMg,OPPh₂Pd) há um deslocamento do processo em 0,96 V para 0,93 V e o processo em 1,14 V é devido a oxidação do paládio (Figura 43), como já citado anteriormente.

Figura 43. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd) após a interação com gás carbônico e a respectiva espectroeletroquímica no sentido anódico.

No sentido catódico (Figura 44) um processo monoeletrônico está situado em -0.18 V, enquanto um processo bieletrônico em -0.64 V, ambos os processos já foram descritos anteriormente, porém, verifica-se uma diminuição de aproximadamente 200 mV para que os processos de redução ocorram, com relação ao complexo sem gás carbônico.

Na espectroeletroquímica (Figura 44), no sentido catódico, há um aumento das bandas em 258 e 315 nm no processo de redução do paládio, devido ao aumento da banda de transferência de carga, enquanto no segundo processo de redução, de Mg^{2+} para Mg^0 , há uma diminuição destas bandas, pois o centro coordenante duro não aceita tão bem o metal na forma reduzida.

Figura 44. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd) após a interação com gás carbônico e suas respectivas espectroeletroquímicas no sentido catódico.

Analisando-se o espectro infravermelho do complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd) (anexo 64) verifica-se a presença de bandas de estiramento C-H de aromáticos em torno de 3060 cm⁻¹ e bandas de C-H alifáticos ao redor de 2960 cm⁻¹. A banda devido ao estiramento P-O-C está situada em 1480 cm⁻¹ (Figura 45, A). Em 1452 cm⁻¹ está a banda do carbonato (Figura 45, B) e em 1165 cm⁻¹ (Figura 45, E) está situada a banda de estiramento P-C₆H₅.¹³⁶ Tais bandas indicam a presença dos grupos funcionais do ligante e da esfera de coordenação do magnésio. Ao compararmos os espectros de infravermelho antes e depois da interação com gás carbônico (Figura 45, linhas preto e cinza, respectivamente) verificamos que houve o aparecimento de bandas em 1316 cm⁻¹ e 1266 cm⁻¹ (Figura 45, C e D) características de CO₂ complexado pelo modo $\mu_2-\eta^3$, classe I.

Figura 45. Infravermelho do complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd) antes (linha preta) e depois de interagir com gás carbônico (linha cinza). Em evidência: modo preferencial de coordenação do CO₂.

6.2.6 BPP(OZn,OPPh₂Pd)

O complexo bimetálico de zinco e paládio obtido apresentou uma coloração amarelo clara. Quando submetido a uma análise termogravimétrica, Figura 46, sofre um processo exotérmico ao redor de 38°C sem perda de massa, o que se deve a uma mudança estrutural. Dois processos endotérmicos são observados em torno de 105°C com uma perda de 5% de massa, correspondendo à perda de dois cloretos. Segue-se então, uma série de processos endotérmicos com a perda de 75% de massa do complexo até 415°C, correspondendo a quase toda a parte orgânica do complexo. O processo endotérmico em 535°C associado a uma perda de 9.4% se deve a perda do restante da parte orgânica.

Figura 46. Análise térmica do complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd) (linha preta) e sua primeira derivada (linha vermelha) e a análise térmica diferencial (abaixo) de 20 °C até 700 °C.

Quando dissolvido em dimetilformamida, o complexo apresenta um espectro eletrônico com uma banda em 268 nm ($\epsilon=560 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e um ombro em 285 nm ($\epsilon= 780 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Em 330 nm ($\epsilon=135 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) existem transições $\pi-\pi^*$ no ligante¹⁴² e por último, a banda em 389 nm ($\epsilon= 21 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) é devido a transição de carga ligante-metal.¹⁴⁵ Quando o CO_2 é borbulhado no complexo de Zn e Pd, há um deslocamento de 3 nm para o vermelho da banda de 268 nm como é observado na Figura 47. A maior diferença entre os espectros é o surgimento ou aumento de uma banda em 320 nm, a qual pode estar associada à formação de Pd^{3+} , como já foi observado anteriormente.

Figura 47. Espectro eletrônico do complexo $\text{BPP}(\text{OZn}, \text{OPPh}_2\text{Pd})$ em DMF antes (linha contínua) e depois de complexar com gás carbônico (linha pontilhada).

Uma maneira de analisar se houve a formação de paládio (III) com a complexação de gás carbônico é observar a voltametria cíclica deste composto, porém, antes, teremos que analisar a voltametria do complexo anterior, $\text{BPP}(\text{OZn}, \text{OPPh}_2\text{Pd})$.

Desta forma, na análise de voltametria cíclica, o complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd) apresenta na oxidação, um processo bieletrônico em 0.99 V devido à oxidação do fenol. Esta oxidação está associada com o decaimento conjunto da absorvidade das bandas centradas em 264, 284, 343 e 427 nm na espectroeletroquímica como pode ser visto na Figura 48. Este decaimento é possivelmente devido à baixa estabilidade do Pd(III) em solução, e portanto, disproporcionamento em Pd(II) e Pd(0).

Figura 48. Voltametria cíclica do complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd) e sua respectiva espectroeletroquímica no sentido anódico.

Já no sentido catódico, Figura 49, há um processo monoeletrônico em -0.17 V devido à redução do Pd²⁺ a Pd¹⁺, acarretando na diminuição das bandas centradas em 264, 284, 343 e 427 nm na espectroeletroquímica, como observado anteriormente para o complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd). O segundo processo de redução ocorre em -0.85 V e possivelmente se trata de um processo bieletrônico devido à redução do Zn²⁺ para Zn⁰, justamente por não acarretar em mudanças espectroscópicas grandes, com um leve decaimento da banda em 264 nm e um aumento tímido da banda em 343 nm.

Ao complexarmos o BPP(OZn,OPPh₂Pd) com gás carbônico, a voltametria no sentido anódico permanece parecida com o complexo inicial, porém, diferentemente da espectroeletroquímica no sentido anódico pro complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd), as bandas

em 260, 282 e 320 nm sofrem um aumento de suas intensidades devido à oxidação do fenol, causando um aumento das transições $\pi-\pi^*$ e $\sigma-\pi^*$. (Figura 50).

Figura 49. Voltametria cíclica do complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd) e suas respectivas espectroeletroquímicas catódicas (de +0,5 V a -0,5 V e de -0,5 V a -1,0 V).

Figura 50. Voltametria cíclica e sua respectiva espectroeletroquímica no sentido anódico (de + 0,5 V a + 1,5 V).

No sentido catódico, Figura 51, um processo que antes era monoeletrônico e agora é bieletrônico está situado em -0.16 V está e é associado com o aumento das bandas em 282 nm e 320 nm, possivelmente devido a redução Pd(III)/Pd(I) , como foi observado para o $\text{BPP(OPPh}_2\text{Pd,OPPh}_2\text{Pd)}$. Entre -0.5 V e -1.0 V observa-se na espectroeletroquímica um leve decaimento das bandas em 282 nm e 320 nm, devido à formação de Zn^0 .

Figura 51. Voltametria cíclica do complexo $\text{BPP(OZn,OPPh}_2\text{Pd)}$. Em evidência estão os processos catódicos e suas respectivas espectroeletroquímicas.

Analisando-se o espectro no infravermelho do complexo $\text{BPP(OZn,OPPh}_2\text{Pd)}$, (anexo 66), verifica-se bandas pouco intensas ao redor de 3000 e 3960 cm^{-1} correspondentes a vibração de estiramento C-H em alcenos e alcanos. Duas bandas

pequenas presentes em 1615 cm^{-1} (Figura 52, A) e 1639 cm^{-1} (Figura 52, B), possivelmente são devido à vibrações do anel aromático. A banda em 1490 cm^{-1} (Figura 52, C) é referente ao estiramento P-C₆H₅, enquanto uma banda em 1130 cm^{-1} (Figura 52, E) se deve a presença de estiramento P-O-C (aromático).¹³⁶ Uma banda em 479 cm^{-1} pode ser resultado do estiramento Zn-CN.

Após complexar o gás carbônico, pelo infravermelho, Figura 52, a única banda a aparecer foi em 1337 cm^{-1} (Figura 52, D). A interpretação deste espectro é inconclusiva, porém nos leva provavelmente a crer na formação de um complexo com modo de coordenação $\mu_2-\eta^3$.⁶⁸

Figura 52. Espectro infravermelho do complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd) antes (linha preta) e depois de interagir com CO₂ (linha cinza).

6.2.7 BPP(OC_o,OPPh₂Pd)

O complexo BPP(OC_o,OPPh₂Pd) foi obtido com 50% de rendimento como um sólido verde musgo. A estabilidade do composto BPP(OC_o,OPPh₂Pd) é verificada até 92°C, 17 graus a mais que o complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd) como pode ser visto na Figura 53. Em 35°C está um pico exotérmico associado a nenhuma perda de massa devido à transição de fase ou conformação do complexo. A partir disto, surge um leve pico endotérmico em 103°C com uma perda de 3% de massa, devido à perda do contra íon, cloreto. Segue-se a decomposição até 450°C com processos endotérmicos e uma grande perda de 85% de massa.

Um processo endotérmico é observado em 620°C com uma perda negligente de massa, provavelmente estando associado à formação de estruturas inorgânicas como óxidos de cobalto e paládio.

Figura 53. Análise térmica do complexo BPP(OC_o,OPPh₂Pd) (linha preta) e sua primeira derivada (linha vermelha) e a análise térmica diferencial (abaixo) de 20 °C até 700 °C.

Quando dissolvido em DMF, o complexo BPP(OCo,OPPh₂Pd) apresenta em seu o espectro eletrônico (Figura 54, linha preta), quatro bandas encavaladas, com máximos aparentes em 231 nm ($\epsilon=1104 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 252 nm ($\epsilon=89 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 287 nm ($\epsilon=36 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 336 nm ($\epsilon=12 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) provavelmente devido à transição $\pi-\pi^*$ localizada no ligante, d- π e transição d-d^{143,145,146}, respectivamente. Após a complexação com gás carbônico, (Figura 54, linha cinza), há um deslocamento da banda em 231 nm para 229 nm e uma diminuição da absortividade das bandas em 229 nm e 252 nm, devido à presença de um ligante π receptor que desloca a energia destas bandas para maior energia, como já descrito anteriormente.

Figura 54. Espectro eletrônico do complexo BPP(OCo,OPPh₂Pd) em DMF, antes (linha preta) e depois (linha cinza) de complexar gás carbônico.

A voltametria deste complexo indica que no sentido anódico existe apenas um processo de oxidação bieletrônico situado em 0.99 V devido à oxidação do fenol e não está associado a mudanças espectrais significativas, como mostrado na Figura 55. Já no sentido catódico, existem três processos monoeletrônicos, situados em -0.30, -0.65 e -0.88 V. Estes processos na espectroeletroquímica aparecem como um único processo

em que ocorre o decaimento das bandas 252 nm, 287 nm e 336 nm. Analisando-se os potenciais de redução dos complexos anteriores, verifica-se que a redução Pd(II)/Pd(I) do complexo BPP(OPPH₂Pd,OPPhd₂Pd) ocorre em -0.49 V e para o BPP(OMg,OPPh₂Pd) em -0.30 V, portanto esta primeira redução pode ser devido a redução Pd(II)/Pd(I). O segundo potencial de redução, -0.65 V, também é encontrado no complexo BPP(OC₆H₅,OC₆H₅) e é devido a redução Co(III)/Co(II). Para o terceiro processo não podemos associar a nenhum complexo anterior, podendo tanto ser Co(II)/Co(I) quanto Pd(I)/Pd(0). com os processos derivados da redução de paládio.

Figura 55. Voltametria cíclica do complexo BPP(OC₆H₅,OPPh₂Pd) em DMF e 0.1 M TBAClO₄. Acima: voltametria anódica e a sua respectiva espectroeletroquímica. Abaixo: voltametria catódica e a sua respectiva espectroeletroquímica.

Uma maneira de verificar de que par redox é este terceiro processo, é avaliar a voltametria/espectroeletroquímica do BPP(OC₆H₅,OPPh₂Pd) após a complexação do gás

carbônico, já que o CO_2 oxida o paládio e o processo Pd(III)/Pd(II) deve aparecer ao redor de -0.18 V , sumindo com os processos derivados da redução do paládio.

Com isto, ao complexarmos gás carbônico, Figura 56, observa-se que o processo de oxidação desloca para 1.1 V e está associado a um leve decaimento da banda em 231 nm . Já na redução, observa-se um processo monoeletrônico em -0.18 V , devido a redução de Pd(III) a Pd(II) , seguida de uma redução bieletrônica em -0.66 V , possivelmente de Co(III)/Co(I) . Estes processos catódicos estão relacionados com o aumento da banda em 229 nm e um leve decaimento da banda em 336 nm . Portanto, o processo em -0.88 V observado para o $\text{BPP(OCo,OPPh}_2\text{Pd)}$ deve ser do par redox Pd(I)/Pd(0) , já que houve o desaparecimento deste processo após a complexação do gás carbônico.

Figura 56. Voltametria cíclica do complexo $\text{BPP(OCo,OPPh}_2\text{Pd)}$ após a complexação com gás carbônico em DMF e 0.1 M TBAClO_4 . Acima: voltametria anódica e a sua respectiva espectroeletroquímica. Abaixo: voltametria catódica e a sua respectiva espectroeletroquímica.

Na análise do espectro no infravermelho, anexo 69, verifica-se a presença de bandas entre 3030 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} referentes ao estiramento C-H de aromáticos e alifáticos, respectivamente. As bandas em 1645 e 1620 cm^{-1} (Figura 57, B e C) são correspondentes ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo acetato, respectivamente.¹³⁶

Com relação ao ligante, as bandas em 1490 cm^{-1} e 1130 cm^{-1} (Figura 57, D e H) são devidas ao estiramento P-C₆H₅ e estiramento P-O-C (aromático), respectivamente. Já a banda em 750 cm^{-1} está ligada a presença de grupamentos aromáticos mono substituídos, juntamente com a banda em 700 cm^{-1} (Figura 57, I e J).¹³⁶

Após a complexação com gás carbônico, verifica-se a presença de bandas em 1699 , 1372 , 1363 e 1217 cm^{-1} (Figura 57, A, E, F e G). A primeira é característica do modo η^2 de complexação, enquanto as outras são correspondentes ao modo $\mu_2-\eta^3$, classe I.

Figura 57. Espectro no infravermelho do complexo BPP(OCo,OPPh₂Pd) antes (linha preta) e depois (linha cinza) de complexar com gás carbônico.

6.3 Comportamento catalítico

Após a caracterização dos complexos foi verificado o comportamento catalítico de cada um deles. As reações de acoplamento C-C serão discutidas em conjunto com todos os complexos mostrados nesta tese, porém antes iremos mostrar o comportamento biomimético dos complexos BPP(OC_o,OC_o), BPP(ONi,ONi) e BPP(OMn,OMn).

6.3.1 Atividades miméticas de enzimas

Os complexos BPP(OC_o,OC_o), BPP(ONi,ONi) e BPP(OMn,OMn) foram analisados quanto a sua capacidade de mimetizar sítios ativos de enzimas. O complexo binuclear de cobalto foi avaliado quanto à sua capacidade catalítica na hidrólise de o-amino benzonitrila. Já o complexo binuclear de níquel teve a sua atividade biomimética avaliada relativa à Urease e o complexo binuclear de manganês foi avaliado quanto a sua atividade biomimética de enzimas do tipo Catalase. Estes testes são de extrema importância para a caracterização dos complexos, pois, como uma enzima, os complexos devem possuir a estrutura desejada e mostrada anteriormente para que tenham uma atividade biomimética.

6.3.1.1 BPP(OC_o,OC_o)

Dentre as enzimas contendo cobalto em sua estrutura estão as Nitrilo Hidratases que são responsáveis pela formação de amidas a partir de nitrilas. Em seu mecanismo, a nitrila coordena com o metal que por sua vez é atacada por uma água que está ligada a aminoácidos do sítio ativo.¹⁴⁷ Para o complexo, observamos que com a adição progressiva de água no meio reacional, o qual era composto de aminobenzonitrila, DMF e BPP(OC_o,OC_o), há um aumento do κ_{cat} inicial e da concentração de produto, aminobenzamida, formada (Figura 58). Os κ_{cat} foram calculados para as adições de 5,

10 e 15 μL de água e obteve-se um valor de $2.2 \times 10^{-9} \text{ mol}^{-1}\text{Ls}^{-1}$, $6.4 \times 10^{-9} \text{ mol}^{-1}\text{Ls}^{-1}$ e $18.5 \times 10^{-9} \text{ mol}^{-1}\text{Ls}^{-1}$, respectivamente. Pode-se afirmar que a catálise realizada pelo $\text{BPP}(\text{OCo}, \text{OCo})$ ocorre lentamente a 22°C em comparação com a enzima.

Figura 58. Formação de aminobenzamida ao longo do tempo: ($\square$) para 5 μL , ($\circ$) para 10 μL e ($\triangle$) para 15 μL de água adicionada.

Esta reação é importante devido à dificuldade de realização da conversão de amidas no laboratório sem a geração de diversos subprodutos. Vale lembrar que as reações realizadas pela enzima Nitrilo Hidratase são feitas em meio de tampão e que a reação feita com o $\text{BPP}(\text{OCo}, \text{OCo})$ foi realizada em DMF, talvez por isto o complexo apresente uma baixa velocidade de reação.

Dentre os complexos de cobalto existentes como miméticos do sítio ativo da Nitrilo Hidratase^{148 149 150}, nenhum deles foi analisado quanto à velocidade de reação e todos foram utilizados em meio aquoso. Noveron et al.¹⁴⁸ demonstraram que a complexação da água no complexo de cobalto é a etapa lenta da reação e que o pKa da água coordenada varia de acordo com os ligantes : pKa de 7 quando os ligantes são peptídeos pentadentados com nitrogênio como doadores e pKa em torno de 9 quando

os ligantes possuem um tiolato como doador. Neste trabalho eles relatam que a presença do tiolato se mostrava essencial para a hidrólise da nitrila.

O nosso ligante é composto de três hidroxilas, um fenol e duas aminas, o que pode contar contra a capacidade catalítica do BPP(OC_o,OC_o), já que ligantes do tipo tiolato reduzem a acidez de Lewis do íon metálico quando comparados com ligantes do tipo alcóxidos e aminas.¹⁵¹ Além disso, o tiolato apresenta uma influência *trans* forte, desta maneira ajuda a manter um sítio de coordenação aberto, que permite que o íon metálico reaja via mecanismo de esfera interna.¹⁵¹

No quesito atividade Nitrilo Hidratase o ligante pode ter melhorias quanto à solubilidade em água e atividade biomimética. Esta característica pode ser observada também nas reações de ativação do gás carbônico, como pode ser visto na seção 6.3.2.

6.3.1.2 BPP(ONi,ONi)

A enzima Urease é responsável pela degradação da ureia em gás carbônico e amônia.¹⁵² Na enzima, a uréia se coordena a dois centros metálicos de níquel de maneira bidentada, ativando-a. No caso do complexo BPP(ONi,ONi), nós tivemos que encontrar um meio em que tanto o complexo, quanto a uréia eram solúveis e encontrou-se DMF como o melhor solvente. Após a adição de uréia, como podemos ver na Figura 59, houve um aumento na absortividade em 343 nm e 1000 nm e um decaimento das bandas em 385 nm e 517 nm. Porém, não se observou a formação de amônia.

Figura 59. Espectro eletrônico do complexo BPP(ONi,ONi) em DMF antes (linha contínua) e depois de adicionar 100 μ L de uréia 0.1M (linha pontilhada).

Após a adição de hidróxido de sódio há o aumento das bandas em 337 nm, 402 nm, 510 nm e 701 nm (Figura 60 A), possivelmente pela mudança de transição LMCT para MLCT. Uma maneira simples utilizada para verificar se houve a formação de amônia foi utilizar um papel de tornasol vermelho, que em contato com gás amônia se tornou azul (Figura 60 B e C), indicando a formação de amônia. Outro teste realizado foi feito em um tubo em U feito de microtubos e uma mangueira de PVC fina: em um dos tubos foi feita a reação e a passagem de gás amônia foi forçada pela pressão positiva de uma seringa contendo ar para que a amônia reagisse com uma solução de fenolftaleína contida no outro tubo. Como pode ser visto na Figura 60 D, a solução de fenolftaleína se tornou rósea, indicando novamente que houve a formação de amônia.

Figura 60. (A) Espectro eletrônico de BPP(ONi,ONi) em presença de uréia (linha pontilhada) e após adição de 10 µL de NaOH 0.1M (linha contínua); (B e C) teste com papel de tornasol vermelho do gás liberado; (D) teste em tubo em U contendo fenolftaleína.

O mecanismo de ação do BPP(ONi,ONi) deve ser similar ao enzimático¹⁵³ e por isto sugerimos um mecanismo, mostrado na Figura 61.

Figura 61. Possível mecanismo da hidrólise da ureia pelo BPP(ONi, ONi).

6.3.1.3 BPP(OMn, OMn)

As catalases fazem o desproporcionamento de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A maioria das catalases utiliza o grupo prostético ferro-protoporfirina IX, porém, algumas bactérias utilizam manganês não heme. As Mn-catalases possuem

um sítio ativo binuclear de manganês.¹⁵⁴ Desta forma, imaginou-se que o complexo BPP(OMn,OMn) poderia exibir atividade com relação a degradação de água oxigenada. Desta forma, fizemos uma tentativa de catálise e utilizou-se o sistema clássico de medição de volume de gás obtido em reações do tipo catalase e mediu-se o volume de oxigênio formado em uma proveta emborcada em um béquer com água. Variando-se a concentração de peróxido adicionado, verificou-se que com o aumento da concentração de peróxido, houve uma diminuição na atividade catalítica do complexo (Figura 62A), possivelmente devido à decomposição do complexo. Porém, ao mantermos a concentração de peróxido e aumentar a concentração de BPP(OMn,OMn) e como esperado, houve um aumento na atividade catalítica (Figura 62 B).

A velocidade máxima obtida com 0.95×10^{-6} mol de BPP(OMn,OMn) foi de 2.4×10^{-7} mol s^{-1} , obtendo-se 100% de conversão catalítica em 1 minuto quando utilizamos 3.8×10^{-6} mol de catalisador.

Figura 62. Atividade catalase do complexo BPP(OMn,OMn) variando-se a concentração de peróxido de hidrogênio (A) e a concentração de BPP(OMn,OMn) (B).

A vantagem de verificar a atividade catalase do complexo BPP(OMn,OMn) está na possibilidade de ele ser utilizado em reações de epoxidação como mostrado por Yang et al.¹⁵⁵. Comparando-se a atividade catalase do complexo de manganês de Yang com o

BPP(OMn,OMn), verifica-se que para que a reação se complete, Yang necessita de uma hora de reação, enquanto o BPP(OMn,OMn) em um minuto consome todo o peróxido adicionado. Porém, se fizermos exatamente nas mesmas condições, ou seja, com muito peróxido, o BPP(OMn,OMn) se decompõe. Desta forma, conclui-se que para o BPP(OMn,OMn) poder ser utilizado para grandes gerações de oxigênio, são necessárias várias pequenas adições ao longo da reação.

6.3.2 Acoplamento C-C

As reações de acoplamento C-C foram testadas com todos os complexos após a interação com gás carbônico e posterior adição em meio contendo iodometano, deceno, iso-butano e iso-octano.

6.3.2.1 Reação com iodometano

Com os complexos em mãos, prosseguiu-se para a análise de complexação do CO₂ com a posterior utilização de iodeto de metila para verificar se o efeito sinérgico realmente ocorre entre os sítios metálicos. Observou-se que todos os complexos apresentaram a formação de acetato de metila como produto, o qual foi detectado por cromatografia gasosa, Figura 63, utilizando uma rampa de 30°C até 80°C com aquecimento de 0.5 °C por minuto.

Figura 63. Cromatografia gasosa do padrão de acetato de metila (linha preta) e do sobrenadante da reação de iodometano e CO₂ na presença dos complexos bimetalícos (linha vermelha).

O fato de apenas acetato de metila ser formado indica que a ligação metal-carbono (CO_2) e metal-oxigênio de fato ocorreram em todos os complexos,⁶⁷ como evidenciado via espectroscopia no infravermelho.

A cinética desta reação foi verificada por espectrofotometria no UV-Vis variando-se a temperatura reacional (anexo 70). Desta forma, fizemos uma análise preliminar das constantes termodinâmicas desta reação, as quais estão mostradas na Tabela 4. As entalpias de ativação aparentes maiores são possivelmente devido à energia necessária para dissociar um ponto de coordenação do quelato de um dos metais.¹⁵⁶

Tabela 4. Dados termodinâmicos obtidos da cinética dos complexos.

Complexo	$\Delta H^\ddagger$ ^a	$\Delta S^\ddagger$ ^b	Mecanismo
BPP(OMg,OPPh₂Pd)	123	155	Dissociativo
BPP(OZn,OPPh₂Pd)	54.5	-110	Associativo
BPP(OC₆₀,OPPh₂Pd)	11.7	-233	Associativo
BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd)	147	-267	Associativo
BPP(OMn,OMn)	212	449	Dissociativo
BPP(ONi,ONi)	153	235	Dissociativo
BPP(OC₆₀,OC₆₀)	176	332	Dissociativo

a- k J mol⁻¹

b- J mol K⁻¹

6.3.2.2 Reação com deceno

De todas as reações e condições testadas, apenas algumas apresentaram algum produto detectável. Na Tabela 5 estão as reações que foram realizadas e a indicação se houve formação de produto.

Tabela 5. Reações de acoplamento entre deceno e CO₂.

Entrada	Catalisador	Solvente	Tempo	Adicionais	Produto^a
1	Nada	Hexano	7 horas	Luz UV	Não
2	Só ligante	Hexano	7 horas	Luz UV	Não
3	BPP(OC _o ,OPPh ₂ Pd)	THF	4 horas	Purga de H ₂	Não
4	BPP(OC _o ,OPPh ₂ Pd)	THF	7 horas	Purga de H ₂	Não
5	BPP(OC _o ,OPPh ₂ Pd)	THF	7 horas	Purga de N ₂	Não
6	BPP(OC _o ,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂	Não
7	BPP(OC _o ,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂	Não
8	BPP(OC _o ,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂ , UV	Não
9	BPP(OC _o ,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂ , UV	Não
10	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	THF	4 horas	Purga de H ₂	Não
11	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	THF	7 horas	Purga de H ₂	Sim
12	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	THF	7 horas	Purga de N ₂	Sim
13	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂	Não
14	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂	Não
15	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂ , UV	Não
16	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂ , UV	Não
17	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	Hexano	4 horas	40 bar de CO ₂	Não
18	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	Hexano	4 horas	40 bar CO ₂ , HCl	Não
19	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	Hexano	4 horas	40 bar CO ₂ , K ₂ S ₂ O ₈	Não
20	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	Hexano	24 horas	50 bar CO ₂	Sim
21	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	Hexano	48 horas	50 bar CO ₂	Não

22	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	THF	4 horas	Purga de H ₂	Não
23	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	THF	7 horas	Purga de H ₂	Não
24	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	THF	7 horas	Purga de N ₂	Não
25	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂	Não
26	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂	Não
27	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂ , UV	Não
28	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂ , UV	Não
29	BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)	THF	7 horas	Purga de H ₂	Sim
30	BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)	THF	7 horas	Purga de N ₂	Sim
31	BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂	Não
32	BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂	Não
33	BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂ , UV	Não
34	BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂ , UV	Não
35	BPP(OC ₆ H ₅ ,OC ₆ H ₅)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂	Não
36	BPP(OC ₆ H ₅ ,OC ₆ H ₅)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂	Não
37	BPP(Co,OC ₆ H ₅)	Hexano	7 horas	Luz UV	Não
38	BPP(OZn,OZn)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂	Não
39	BPP(OZn,OZn)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂	Não
40	BPP(OZn,OZn)	Hexano	7 horas	Luz UV	Não
41	BPP(OMn,OMn)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂	Não
42	BPP(OMn,OMn)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂	Não
43	BPP(OMn,OMn)	Hexano	7 horas	Luz UV	Não

44	BPP(ONi,ONi)	Hexano	7 horas	Purga de N ₂	Sim
45	BPP(ONi,ONi)	Hexano	7 horas	Purga de H ₂	Não
46	BPP(ONi,ONi)	Hexano	7 horas	Luz UV	Não
47	BPP(ONi,ONi)	Hexano	6 horas	10 bar CO ₂ , CF ₃ COOH	Não
48	BPP(ONi,ONi)	Hexano	6 horas	20 bar CO ₂	Não
49	BPP(ONi,ONi)	Hexano	6 horas	20 bar CO ₂ , H ₂ O	Não
50	BPP(ONi,ONi)	Hexano	6 horas	20 bar CO ₂ , (NH ₄) ₃ PO ₄	Não
51	BPP(ONi,ONi)	Hexano	4 horas	20 bar CO ₂ , K ₂ S ₂ O ₈ , CF ₃ COOH	Não
52	BPP(ONi,ONi)	Hexano	20 horas	20 bar CO ₂ , K ₂ S ₂ O ₈ , CF ₃ COOH	Sim
53	BPP(ONi,ONi)	Hexano	4 horas	20 bar CO ₂ , K ₂ S ₂ O ₈ , NH ₄ Cl	Não
54	BPP(ONi,ONi)	Hexano	20 horas	20 bar CO ₂ , K ₂ S ₂ O ₈ , NH ₄ Cl	Sim
55	BPP(ONi,ONi)	Hexano	6 horas	30 bar CO ₂	Não
56	BPP(ONi,ONi)	Hexano	4 horas	30 bar CO ₂ , CF ₃ COOH	Não
57	BPP(ONi,ONi)	Hexano	6 horas	30 bar CO ₂ , NH ₄ Cl	Sim
58	BPP(ONi,ONi)	THF	6 horas	40 bar CO ₂	Não
59	BPP(ONi,ONi)	Hexano	16 horas	40 bar CO ₂	Não
60	BPP(ONi,ONi)	Hexano	4 horas	40 bar CO ₂ , K ₂ S ₂ O ₈	Não

61	BPP(ONi,ONi)	Hexano	4 horas	40 bar CO ₂ , CF ₃ COOH	Não
62	BPP(ONi,ONi)	Hexano	4 horas	30 bar CO ₂ , CF ₃ COOH, K ₂ S ₂ O ₈	Não

a- Considerou-se como produto da reação aquele que pôde ser detectado pela técnica de ¹H RMN.

Dentre as reações listadas na Tabela 5, podemos afirmar que o complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd) não conseguiu catalisar o acoplamento entre o gás carbônico e o deceno. As reações **11 e 12** (Tabela 5) foram realizadas em THF com o complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd) por 7 horas. O espectro de ¹H RMN de ambas as reações apresenta um multipeto em 1.71 ppm com integral igual a 8, um multipeto em 3.95 ppm com integral igual a 4 e outro multipeto em 5.45 ppm com integral igual a 2 (anexo 71). O espectro de massas de alta resolução no modo positivo apresentou um pico m/z igual a 197.0787 (anexo 72). O RMN nos induz a pensar na formação de um produto cíclico e a massa pode condizer com o produto mostrado na Figura 64, porém, devido a pequena quantidade obtida não foi possível realizar mais caracterizações para se ter certeza do produto formado.

Figura 64. Possível produto das reações 11 e 12.

A reação **20** apresenta como possível produto, o ácido deca-2,4-dienóico, com massa molecular de 168 g/mol. O espectro CG-MS apresenta um pico em 18.04 minutos

com este íon molecular, o qual possui a quebra de $-\text{CH}_3$ (m/z 154). O espectro ^1H RMN apresenta os seguintes sinais: 0.81 (t, 3H), 1.17 ppm (s, 2H), 1.18 ppm (s, 4H), 2.28 ppm (m, 2H), 7.07 (m, 1H), 7.29 ppm (m, 2H) e 7.53 ppm (m, 1H). Estes sinais estão de acordo com a formação do produto indicado.

As reações **29** e **30** foram realizadas em THF com $\text{BPP}(\text{OPh}_2\text{Pd}, \text{OPh}_2\text{Pd})$ como catalisador. O espectro de ^1H RMN foi utilizado para a caracterização do produto e observou-se os seguintes sinais: 0.883ppm (m, 3H), 1.311-1.26ppm (m, 8H), 1.59ppm (m, 2H), 1.97ppm (m, 2H), 2.05ppm (m, 2H), 4.14ppm (m, 1H), 5.43ppm (m, 1H) e 11.572ppm (s). Tais sinais sugerem a formação do ácido 3- decenóico.

A reação **44** foi realizada com o complexo $\text{BPP}(\text{ONi}, \text{ONi})$ no escuro, por 7 horas em hexano. Obteve-se um produto líquido que pelo ^1H RMN apresentou os seguintes sinais: 0.881ppm (t, 3H), 1.266ppm (s, 12H), 2.05ppm (m, 2H), 5.04ppm (m, 1H), 5.8ppm (m, 0.5H), como pode ser visto na Figura 65.

Figura 65. ^1H RMN do produto da reação 44 do acoplamento entre CO_2 e deceno.

Sabendo-se da proporção 1:1 dos prótons da dupla ligação, fez-se um ^{13}C RMN e obteve-se os seguintes sinais: 14.125ppm (CH_3), 22.593ppm (CH_2), 28.874ppm (CH_2), 29.07ppm (CH_2), 29.208ppm (CH_2), 29.39ppm (CH_2), 31.80ppm (CH_2), 33.744ppm (CH_2), 113.95ppm (CH), 125.152ppm (CH), 174.869ppm (COOH), como pode ser visto na Figura 66.

Figura 66. ^{13}C RMN do produto da reação 44 do acoplamento entre CO_2 e deceno.

O espectro de massas desta reação, Figura 67, também indica a formação do produto esperado em que o composto em questão forma um cluster com duas moléculas de ácido undecanóico e um sódio, com massa igual a 393.3, como esperado teoricamente.

Figura 67. Espectro ESI⁺ do produto da reação 44.

A reação **52** apresentou dois picos principais no CG-MS (anexo 76), um em 8.02 minutos e outro em 10.09 minutos em uma proporção de 6:1. O primeiro pico possui um íon molecular em m/z (MH) de 185. As quebras principais são em m/z 141, correspondendo à perda de CO₂, e outra quebra em m/z 113, correspondendo à perda CHCHCO₂. Os espectros de ¹H e ¹³C RMN se assemelham aos espectros observados para a reação **44**, indicando a formação do ácido 1-undecenóico. Já o pico com tempo de retenção em 10.09 minutos apresenta um íon molecular (MH⁺) de m/z igual a 155. Isto indica a formação de um ácido com cadeia carbônica menor e com uma dupla ligação a mais (C₉H₁₅O₂⁺), as quebras com m/z em 139, 109 e 96 são correspondentes as perdas de uma metila, um CO₂ e um rearranjo de MacLafferty, respectivamente. Este segundo produto não foi isolado.

Para a reação **54** acredita-se que houve a formação do ácido 3-hidroxi-undecanóico, o qual apresenta uma massa de 202 g/mol. No espectro de CG-MS (em anexo 80), observa-se um pico muito intenso com tempo de retenção em 16.97 minutos com m/z igual a 202. As principais quebras desta molécula são as perdas progressivas de CH₂. O espectro de ¹H RMN (anexo 81) apresenta os seguintes picos: 0.88 ppm (t, 3H), 1.27 ppm (m, 6H), 1.31 ppm (s, 4H), 1.38 ppm (m, 2H), 1.51 ppm (m, 2H) 2.04 ppm (m, 1H), 3.25 ppm (m, 1H), o que indica a formação do produto indicado.

A reação **57** é similar à reação **54**, porém, sem a presença de persulfato de potássio. Vê-se a formação de um produto similar ao formado na reação 54, porém, com

um carbono a menos, portanto, apresentando tempo de retenção em 11.31 minutos com m/z igual a 189. As quebras são correspondentes a perdas progressivas de CH_2O . O espectro de ^1H RMN apresenta os seguintes sinais: 0.81 ppm (t, 3H), 1.19 ppm (s, 4H), 1.22 ppm (m, 6H), 1.27 ppm (m, 2H), 2.16 ppm (m, 2H) e 3.96 ppm (m, 1H), os quais correspondem ao ácido 2-hidroxi-decanóico.

Analisando-se os dados destas reações de acoplamento entre o 1-deceno e CO_2 na presença de $\text{BPP}(\text{ONi}, \text{ONi})$, verifica-se que ao contrário do que especificado em trabalhos anteriores^{58 59}, a presença de persulfato de potássio não é essencial para a catálise de reações de acoplamento envolvendo CO_2 . O fato de a reação proceder na presença de NH_4Cl indica que um doador de prótons é essencial na catálise, porém, um doador de prótons muito forte, como o ácido trifluoroacético não é favorável a reação, possivelmente devido à descomplexação dos metais. Outros doadores de prótons como água e $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ não são eficientes, possivelmente devido à menor acidez.

O mecanismo envolvido na reação **57**, possivelmente envolve a formação de um intermediário em que o carbono *beta* do 1-deceno promova a catálise, desta forma, na etapa de eliminação redutiva há a liberação de metano como subproduto. Já para a reação **54**, a presença do persulfato de potássio, um oxidante forte, faz com que esta etapa seja inibida, formando o produto com 11 carbonos.

Os catalisadores que conseguiram realizar qualquer tipo de reação entre o CO_2 e o deceno são $\text{BPP}(\text{OZn}, \text{OPPh}_2\text{Pd})$, $\text{BPP}(\text{OPPh}_2\text{Pd}, \text{OPPh}_2\text{Pd})$ e $\text{BPP}(\text{ONi}, \text{ONi})$. Observa-se que o catalisador heterometálico de zinco e paládio tende a obter produtos de ciclização intramolecular na presença de THF (reações **11** e **12** da Tabela 5), enquanto na presença de hexano, a pressão e temperatura ambiente, nenhum produto é formado (reações **13-16**, Tabela 5). Sabe-se que o THF é uma base de Lewis¹⁵⁷, portanto, isto nos leva a acreditar que o THF tenha um papel importante na síntese e no

mecanismo reacional. Não se sabe ao certo o mecanismo reacional, porém, provavelmente, a reação se inicia após a complexação do gás carbônico e do 1-deceno. Há então um ataque do hidrogênio α do 1-deceno à dupla ligação, que por sua vez ataca o gás carbônico coordenado. Isto deve ocorrer no mínimo três vezes. Após a adição de três carboxilatos, a molécula deve sofrer uma beta-eliminação que resulta na formação de um complexo do tipo metal-hidreto para que a próxima etapa reacional seja possível. Finalmente, o composto deve sofrer uma ciclização tipo zinco-ene catalisada por paládio^{158,159} para que se obtenha o produto cíclico de massa molecular 196. A ciclização zinco-ene ocorre muito mais facilmente que a magnésio-ene¹⁶⁰ e ocorre via a inserção do paládio em um acetato de alila para gerar um intermediário π -alílico que sofre transmetalacão com um organo-zinco para resultar no intermediário zinco-alil.¹⁶¹

Tanto para o catalisador BPP(OZn,OPPh₂Pd) quanto para o BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd), a natureza do gás utilizado na purga de 15 minutos (hidrogênio ou nitrogênio) não faz nenhum efeito, como pode ser visto para as reações **11,12,29** e **30** da Tabela 5.

Já para o catalisador BPP(ONi,ONi) as melhores condições para que haja um acoplamento entre gás carbônico e deceno exigem a pressão de CO₂, como visto nas reações **52,54** e **57** da Tabela 5.

6.3.2.3 Reação com isobutano

As reações que foram realizadas estão listadas na Tabela 6. Dentre elas, as reações sem catalisador (Tabela 6, **1-6**) não apresentaram a formação de qualquer produto, com exceção da reação **7**, que apresentou a formação de um sólido vermelho insolúvel em diclorometano, clorofórmio, etanol, água e acetona. Desta forma, não pudemos analisar o produto formado, porém, como esta reação é uma reação controle,

sabemos que a elevadas temperaturas (100 °C) e 50 bar de CO₂, o ácido píválico não é estável, portanto, todas as reações com catalisador foram realizadas em temperaturas e pressões menores.

Tabela 6. Reações de acoplamento entre iso-butano e CO₂ em diversas temperaturas e pressões, utilizando diferentes catalisadores.

Entrada	Catalisador	Temperatura	Pressão	Adicionais
1	-----	200°C	50 bar	-----
2	-----	100°C	50 bar	-----
3	-----	60°C	40 bar	-----
4	-----	60°C	40 bar	K ₃ PO ₄
5	-----	60°C	40 bar	DMF
6	-----	60°C	40 bar	DMF, K ₃ PO ₄
7	-----	100°C	50 bar	1 g de ácido píválico
8	BPP(ONi,ONi)	60°C	40 bar	-----
9	BPP(ONi,ONi)	60°C	40 bar	K ₃ PO ₄
10	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	60°C	40 bar	-----
11	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	60°C	40 bar	K ₃ PO ₄
12	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	60°C	40 bar	K ₃ PO ₄ , 3x mais catalisador
13	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	80°C	40 bar	K ₃ PO ₄
14	BPP(OMg,OPPh ₂ Pd)	80°C	20 bar	Plaquinhas de sílica impregnadas com NaOH
15	BPP(OC ₆₀ ,OPPh ₂ Pd)	60°C	40 bar	-----
16	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	- 60°C	P.A.	Luz UV, 2 horas
17	BPP(OZn,OPPh ₂ Pd)	- 60°C	P.A.	Luz UV, 4 horas
18	BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)	T.A	P.A	ACN, 6 horas

As reações de **8** a **14** apresentaram benzofenona como produto de decomposição do complexo, o qual aparece com m/z igual a 182 com tempo de retenção de 13.66 minutos nos cromatogramas. A reação **15** não apresentou qualquer produto detectável. Em contrapartida, a reação **16** da Tabela 6 apresentou um espectro de ^1H RMN (anexo 83) com um único singlete em 1.23 ppm. O espectro de ^{13}C RMN (anexo 84) apresenta sinais em 26.93 ppm, 38.54 ppm e 185.33 ppm, correspondendo à formação de ácido pivalico. Alguns picos menores são observados tanto nos espectros de ^{13}C , quanto no de ^1H RMN, possivelmente, correspondendo a isômeros, como o ácido isovalérico. Analisando-se o espectro de massas de alta resolução, Figura 68, observa-se que há uma boa correlação da massa obtida com a massa esperada (101.06 g/mol).

Figura 68. Espectro de massas (ESI) de alta resolução do produto da reação **16** da Tabela 6.

Quando o tempo de reação foi aumentado para 4 horas, Tabela 6 reação **17**, houve a formação de um produto com espectro ^1H RMN apresentando sinais em: 0.87 ppm (s, 3H), 0.91 ppm (s, 3H) e 1.75 (m, 1H), como mostrado em anexo (anexo 85). Isto indica a formação do ácido isobutírico, porém, como a quantidade obtida foi muito pequena, tentativas de se obter um espectro de ^{13}C RMN falharam.

Observa-se que a pressão de gás carbônico nestas reações não faz muita diferença, já que conseguimos obter produtos de acoplamento C-C entre isobutano e

CO₂ a pressões ambientes. Os fatores mais importantes para esta reação proceder com eficiência são a luz UV e o fato de a -60 °C ambos os gases (CO₂ e isobutano) se apresentarem na forma líquida. Acredita-se que o mecanismo da reação, por envolver luz UV e por apresentar poucos subprodutos de acoplamentos nos carbonos primários, ocorre por via radicalar, formando-se o radical isobutila, que se liga facilmente ao centro de paládio do BPP(OZn,OPPh₂Pd), enquanto o gás carbônico que está essencialmente coordenado entre os dois metais, se insere mais tarde na isobutila.

6.3.2.4 Reação com iso-octano

Como o isobutano é um gás a temperatura e pressão ambiente, para que a reação de acoplamento entre o CO₂ e um alceno fosse mais bem estudada, pensou-se em utilizar um alceno similar ao isobutano, porém, que se apresentasse na forma líquida a temperatura e pressões ambientes. Desta forma, utilizamos o iso-octano como substituinte do isobutano e pôde-se realizar as reações a temperatura ambiente. Observou-se a formação do ácido 2,2,4,4-tetrametil pentanóico, utilizando-se os complexos BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) e BPP(OZn,OPPh₂Pd).

O estudo mostrado aqui, é apenas para o complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd). Os espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN para a reação com o complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd) estão em anexo (anexos 86 e 87).

No espectro de ¹H RMN, Figura 69, observa-se a presença de um singleto com integração 9 em 1.5 ppm, dois singletos com integração 3 em 2.1 ppm e 2.35 ppm e outro singleto com integração 2 em 2.8 ppm, compatíveis com o esperado teoricamente para este composto.

Figura 69. ^1H RMN do composto ácido 2,2,4,4-tetrametil pentanóico formado na reação de iso-octano e CO_2 na presença de $\text{BPP}(\text{OPh}_2\text{Pd}, \text{OPh}_2\text{Pd})$ e luz UV.

Já no espectro de ^{13}C RMN, Figura 70, encontram-se os sinais em 25 ppm (metilas próximas ao ácido), 29 ppm (metilas distantes), 31 ppm (carbono quaternário), 36 ppm (carbono quaternário ligado à carbonila), 53 ppm (CH_2) e 185 ppm (carbono carbonílico).

Figura 70. ^{13}C RMN do composto ácido 2,2,4,4-tetrametil pentanóico formado na reação de iso-octano e CO_2 na presença de $\text{BPP}(\text{OPh}_2\text{Pd}, \text{OPh}_2\text{Pd})$ e luz UV.

Com a análise de cromatografia gasosa associada com espectrômetro de massas, Figura 71, verifica-se um pico em 13,6 minutos com a massa esperada ($m/z = 157$) e as quebras 71, 57 e 43, características do composto esperado teoricamente.

Figura 71. CG-MS do composto ácido 2,2,4,4-tetrametil pentanóico formado na reação de isooctano e CO_2 na presença de $\text{BPP}(\text{OPh}_2\text{Pd}, \text{OPh}_2\text{Pd})$ e luz UV.

Além destas análises, pudemos também realizar uma análise de massas de alta resolução, como mostrado na Figura 72 e é possível observar que a massa teórica de 157.1228 tem uma diferença de apenas 2.5 ppm da massa obtida experimentalmente, indicando com certeza que o composto formado é o ácido 2,2,4,4 – tetrametil pentanóico.

Figura 72. Espectro de massas de alta resolução do composto ácido 2,2,4,4-tetrametil pentanóico formado na reação de iso-octano e CO₂ na presença de BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) e luz UV.

Esta reação foi acompanhada via espectroscopia no infravermelho para que uma proposta de mecanismo reacional pudesse ser feita. Na Figura 73, observa-se que a absorbância em 3400 cm⁻¹ devido ao estiramento O-H e a absorbância em 1640 cm⁻¹, devido ao estiramento assimétrico do grupo CO₂⁻, aumenta com o tempo de reação e exposição à luz ultravioleta. A proporção entre estas duas bandas é linear, como pode ser visto na Figura 73, o que indica que ambas são devido à formação do mesmo produto. Em aproximadamente 2 horas de reação chega-se ao máximo de conversão catalítica.

Um possível mecanismo para a reação envolve a adição oxidativa do CO₂ no BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd), gerando Pd(III), o qual apresenta elevada afinidade com alcanos devido ao princípio isolobal¹⁶² e se liga ao iso-octano como mostrado na Figura 74. Esta espécie gera um intermediário via indução da luz UV, que então sofre uma eliminação redutiva, gerando o catalisador de volta.

Figura 73. Espectroscopia no Infravermelho para a cinética da reação de acoplamento C-C entre CO_2 e iso-octano na presença de $\text{BPP}(\text{OPh}_2\text{Pd}, \text{OPh}_2\text{Pd})$ e luz UV.

Figura 74. Possível mecanismo da reação de acoplamento entre CO₂ e iso-octano na presença de BPP(OPPh₂Pd, OPPh₂Pd).

7. Conclusão do capítulo 1

Neste capítulo foi realizada a síntese e caracterização de três ligantes, similares em sua essência com características coordenantes distintas. Desta forma, pôde-se sintetizar complexos bimetalicos tanto do tipo homo metálicos quanto do tipo heterometálicos. A inspiração nas enzimas existentes na natureza se mostrou eficiente vide a atividade biomimética dos complexos BPP(ONi, ONi), BPP(OCu, OCu) e BPP(OMn, OMn) para urease, nitrilo hidratase e catalase.

Após a caracterização, fez-se uma interação com CO₂ e observou-se que o gás carbônico se coordena a todos os complexos, porém, para BPP(OCu, OCu), BPP(ONi, ONi) e BPP(OPPh₂Pd, OPPh₂Pd) a coordenação do CO₂ faz com que haja uma diminuição do acoplamento entre os sítios metálicos e consequentemente se perde o

estado intervalente nas voltametrias cíclicas. Já o complexo BPP(OMn,OMn) apresenta um comportamento distinto, exibindo uma maior interação intersítios com a coordenação do gás carbônico.

Todos os complexos foram utilizados em reações de ativação do gás carbônico para a verificação de seus potenciais catalíticos na possível conversão de CO₂ em produtos com maior valor agregado. Verificou-se que o CO₂ foi ativado para uma reação de alquilação com iodeto de metila em todos eles. Nesta reação o único produto formado foi acetato de metila, indicando que a coordenação principal e ativadora destes complexos é a do tipo ponte com ambos os sítios metálicos. Este fato, mostra o quão importante é a síntese de novos complexos bimetalicos para que se possa utilizar o gás carbônico como fonte de carbono primária em síntese orgânica.

Indo mais além, diversas reações de acoplamento carbono-carbono entre 1-deceno e CO₂ foram testadas e apenas os complexos BPP(OZn,OPPh₂Pd), BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) e BPP(ONi,ONi) se mostraram ativos. O complexo de zinco e paládio tende a formar produtos de ciclização zinco-ene catalisadas por paládio, enquanto o complexo binuclear de paládio forma um ácido com apenas 10 carbonos, sugerindo uma eliminação de metano durante a reação. O complexo BPP(ONi,ONi) apresentou a formação de diversos produtos, não se mostrando muito seletivo.

A reação de acoplamento entre 1-deceno e CO₂ mostrou que reações de acoplamento C-C entre moléculas pouco ativas são de difícil obtenção. Isto também foi demonstrado nas tentativas de obtenção de ácido pivalico a partir de isobutano e CO₂ em que apenas com os catalisadores BPP(OZn,OPPh₂Pd) e BPP(OPPh₂Pd, OPPh₂Pd) foi observado a sua formação na presença de luz UV. Para que se conseguisse acompanhar o acoplamento C-C entre um alceno e o gás carbônico, pensou-se em utilizar luz ultravioleta e um alceno que lembrasse o isobutano, porém, que se

apresentasse na forma líquida a temperatura e pressões ambientes. Assim, partiu-se para o uso do iso-octano e surpreendentemente, na reação utilizando BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) observou-se a formação de ácido 2,2,4,4 tetra-metil-pentanóico. Deve-se lembrar que esta reação é inesperada pois se trata de um alcano e portanto, de ligações C-C saturadas, sendo de extrema importância para se dar um passo além de Suzuki e Negishi.

Conclui-se que este trabalho é de extrema importância nas áreas de química inorgânica, química orgânica e catálise, por abrir uma gama de possibilidades sintéticas com uma reação catalítica nova e catalisadores inéditos.

Capítulo 2.

Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas para a redução do CO₂

“Chama-me Natureza ou Pandora; sou tua
mãe e tua inimiga.”

Machado de Assis, Memórias Póstumas de
Brás Cubas.

8. Introdução

Vimos no capítulo 1 que complexos bimetálicos inspirados no design catalítico da Natureza são eficientes catalisadores em reações de acoplamento carbono-carbono entre o gás carbônico e alcenos/alcenos. O que veremos neste capítulo 2 é a capacidade catalítica de enzimas suportadas em partículas magnéticas para o mesmo fim de redução química do CO₂.

8.1 Enzimas

Enzimas são proteínas que participam de processos químicos em organismos vivos, catalisando reações químicas eficientemente e seletivamente. As enzimas são elementos centrais em todos os processos bioquímicos, sendo que na natureza elas atuam em uma sequência organizada e catalisam centenas de reações que degradam moléculas de nutrientes, conservam e transformam a energia química e produzem macromoléculas biológicas a partir de precursores simples.

A origem do poder catalítico das enzimas está na estabilização do estado de transição, permitindo a aceleração de reações, porém, as atividades enzimáticas são afetadas pela sua conformação, pois devido ao fato de serem moléculas dinâmicas, as suas funções dependem da interação com outras moléculas, envolvendo uma ligação reversível. A molécula ligada reversivelmente a uma proteína é chamada de substrato ou ligante. O ligante pode ser qualquer tipo de molécula, incluindo outra proteína. A

natureza transiente das interações proteína-ligante é crítica para a vida, permitindo que um organismo responda rapidamente e reversivelmente a uma mudança ambiental e a circunstâncias metabólicas.¹⁶³

Desta forma, vê-se que o conhecimento da estrutura das proteínas é essencial para o entendimento de seu funcionamento, pois nos fornece informações químico-biológicas de extrema importância.¹⁶³

Neste caso, veremos que o ligante se liga a um sítio na proteína, chamado sítio de ligação, que é complementar ao ligante, em tamanho, forma, carga, caráter hidrofílico ou hidrofóbico. Ou seja, a interação é específica e a proteína pode distinguir o seu substrato dentre milhares de moléculas ao seu redor.

No modelo proposto por Emil Fisher em 1894, a associação entre enzima e substrato é vista de maneira rígida, porém, é óbvio que a catálise enzimática é mais que o simples aumento na concentração e posicionamento dos reagentes. Desta forma, em 1958, Koshland propôs um modelo substituto em que o substrato é capaz de induzir mudanças conformacionais discretas e reversíveis na enzima.¹⁶⁴ Estas mudanças podem ser sutis, envolvendo um pequeno número de resíduos de aminoácidos ou podem envolver um movimento enzimático maior, sendo que a atividade de diversas enzimas é ditada por movimentos amplos do tipo “*dobradiça*”.¹⁶⁵

O movimento *dobradiça* envolve duas formas enzimáticas: a aberta e a fechada, sendo que a presença do substrato favorece a conformação fechada. O fechamento do sítio ativo previne que os intermediários de reação escapem e favorece uma catálise eficiente. Este tipo de movimento não necessita de um custo energético muito grande, pois a relaxação estrutural local faz com que as rotações em larga escala sejam possíveis.¹⁶⁵

A barreira a ser cruzada de substrato para produto envolve o movimento coletivo de átomos e moléculas de água ligadas fracamente à superfície enzimática, propagando estas flutuações do suporte principal ao sítio ativo. As flutuações de potencial eletrostático de uma enzima são fatores chave em reações que envolvem uma mudança grande de polaridade das ligações de uma reação. Um exemplo desta importância está no fato de organismos termofílicos e hipertermofílicos quando submetidos a temperaturas em que enzimas mesofílicas são ativas, perderem toda a atividade enzimática devido à rigidificação de sua estrutura.¹⁶⁶

Na área da química sintética, o uso de catalisadores tão eficientes traz à química tradicional um passo inovador para que se obtenham os mesmos resultados com menor custo energético. Com isto, ao pensarmos em enzimas sempre imaginamos que elas são uma das coisas mais bonitas que existem na natureza, pois são moléculas funcionais da vida e por isso, podem ser utilizadas como agentes terapêuticos, catalisadores e materiais. Porém, estes catalisadores biológicos são de complexa purificação e obtenção, tornando-os extremamente caros, e, além disso, muitas enzimas possuem baixa estabilidade fora de seu sistema natural.

Dentre os diversos métodos para obter enzimas mais estáveis está a imobilização enzimática em diferentes suportes.

8.2 Suportes

Os suportes em uma imobilização enzimática devem ser analisados quanto a sua forma, característica química, estabilidade e compatibilidade. Existem diversos tipos de suporte, como por exemplo, nanopartículas de sílica, nanopartículas magnéticas, géis, polímeros, zeólitas, materiais lamelares, membranas, dentre outros.

As nanopartículas de sílica apresentam elevada área superficial e elevada taxa de transferência de massa devido ao seu tamanho diminuto e podem ser excelentes suportes para a imobilização de enzimas, pois não reagem com os aminoácidos, porém são pouco estáveis em pHs acima de 8. ¹⁶⁷ Os polímeros em forma de nanopartículas apresentam as mesmas qualidades das nanopartículas de sílica. A desvantagem dos polímeros é a estabilidade química destes polímeros a ambientes diversos, pois se o polímero for composto de grupos éster ou imina ele pode ser facilmente hidrolisado e um cuidado com o pH reacional deve ser tomado. Os melhores polímeros são aqueles que apenas possuem ligações C-C e éteres. ¹⁶⁷

Os géis normalmente apresentam boa compatibilidade biológica e garantem a estabilidade das enzimas por permitirem que a interação das enzimas com o meio seja baixa. Porém, justamente por esta última característica, para a realização de catálise, o uso de géis deve ser meticulosamente estudado, senão o gel aprisionará a enzima enclausurando-a sem que ela consiga entrar em contato com o substrato a ser transformado. ¹⁶⁷

As membranas apresentam as mesmas características que os géis e também se deve tomar cuidado com a entrada de substratos para haver contato com as enzimas. As membranas podem ser facilmente utilizadas em reatores e também podem ser facilmente removidas.

Neste estudo nós apenas utilizamos nanopartículas de magnetita, as quais estão descritas no item 8.2.1.

8.2.1 Nanopartículas Magnéticas

Um dos focos de grande interesse em Nanotecnologia é o desenvolvimento de nanopartículas funcionalizadas quimicamente, em particular, as que apresentam

propriedades magnéticas. As nanopartículas de interesse tecnológico apresentam dimensões típicas entre 1 e 100 nm, faixa em que as propriedades físicas, químicas e/ou biológicas são frequentemente diferenciadas em relação aos materiais massivos (*bulk*)¹⁶⁸. Sob o ponto de vista magnético, as dimensões nanométricas fazem com que tais partículas passem a apresentar apenas um domínio magnético, comportando-se como nanomagnetos permanentes¹⁶⁹.

O domínio magnético representa um agrupamento de átomos no qual todos os momentos magnéticos atômicos estão alinhados. Nos materiais, geralmente os vetores de magnetização dos domínios estão arrançados de tal forma que a soma vetorial acabe ficando próxima à zero, levando a uma redução da energia magnetoestática e à aproximação da condição de equilíbrio, correspondente ao mínimo de energia potencial armazenada^{170,171}.

Na Figura 75 está ilustrada a influência do tamanho das partículas no comportamento do vetor campo magnético.

Figura 75. Ilustração esquemática mostrando a influência do tamanho das partículas no comportamento do vetor campo magnético. Numa partícula de 20 nm há apenas um único vetor campo magnético, enquanto na de 200 nm já começam a existir vetores formando diversos domínios magnéticos.

Cada material apresenta tamanhos máximos diferentes de partícula para que o multidomínio se torne monodomínio. A Tabela 7 mostra o tamanho máximo para uma

partícula de Fe, Co, Ni, Fe_3O_4 ou $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ ser monodomínio. Vê-se que no caso da magnetita, um tamanho de 128 nm é suficiente.

Tabela 7. Tamanho máximo estimado para uma partícula esférica multidomínio passar a ser monodomínio.

Material	D_s (nm)
Fe	14
Co	70
Ni	55
Fe_3O_4	128
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	166

Os domínios magnéticos influenciam as propriedades magnéticas de um material, por exemplo, quando nanopartículas são submetidas a um ciclo de histerese há uma rotação dos seus únicos vetores de campo magnético de forma coerente para superar a anisotropia das partículas, enquanto um material *bulk* tem que alinhar os campos magnéticos dos domínios. A anisotropia em partículas afeta diretamente a barreira energética entre estados magnéticos, pois está relacionada à falta de simetria cristalográfica da superfície, à redução do número de coordenação, à rugosidade, às interações spin-órbita, ao fenômeno de transferência de carga e à expansão ou contração da grade de estrutura. Por exemplo, o aumento do tamanho das partículas resulta no aumento da energia de anisotropia e o monodomínio ferromagnético substitui o comportamento superparamagnético. O aumento da distância inter-partícula também acarreta em um aumento de anisotropia, levando a um aumento da coercividade e das temperaturas de bloqueio.

A maioria dos efeitos observados em partículas magnéticas monodomínio é devido à anisotropia magnética, ou seja, a energia dependente da orientação do vetor de

magnetização do domínio com relação aos eixos cristalinos. Em uma partícula uniaxial a energia de anisotropia é dada pela

$$E(\theta) = KV \sin^2 \theta$$

Equação 2

¹⁷²:

$$E(\theta) = KV \sin^2 \theta$$

Equação 2

Sendo K o parâmetro de energia de anisotropia, V o volume da partícula e θ o ângulo entre o vetor de magnetização e o eixo cristalino de anisotropia. O acoplamento spin-órbita origina K, atuando em conjunto com um acoplamento eletrostático da órbita do cristal. ¹⁷²

O comportamento superparamagnético aparece em partículas ferromagnéticas e antiferromagnéticas que estão abaixo do tamanho máximo para se obter um monodomínio e estão abaixo da temperatura de bloqueio (T_b), atuando como um momento magnético gigante. A temperatura de bloqueio ($T_b = KV/25 k_B$: k_B = constante de Boltzmann) varia com a escala de tempo da medida e com o tamanho da partícula devido à transição de uma partícula no estado bloqueado para um estado relaxado, ou seja, superparamagnético. ¹⁷³ A barreira energética (E) entre estados de equilíbrio diferentes do vetor de magnetização é muito menor que a constante de Boltzmann vezes a temperatura ($E \ll k_B T$) no estado superparamagnético, permitindo a livre movimentação do momento magnético da partícula. ¹⁷⁴

Uma maneira de ver como o superparamagnetismo influencia as propriedades de uma partícula é pela coercividade, a qual é a intensidade do campo magnético externo que deve ser imposta a uma substância ferromagnética para lhe anular a sua magnetização, ou seja, é a resistência oferecida pelo material para se desmagnetizar. Na Figura 76 é possível ver que há um máximo de coercividade, que está relacionado com o diâmetro de uma partícula para ela se tornar monodomínio, e para tamanhos menores,

a coercividade vai diminuindo até que no estado superparamagnético não existe mais resistência sobre a desmagnetização.

Figura 76. Coercividade como função do tamanho da partícula. D_{sp} é o tamanho para se obter partículas superparamagnéticas e D_s é o tamanho de uma partícula monodomínio.

8.3 Imobilização

Ao fixarmos algo, prevenindo a sua movimentação, estamos fazendo uma imobilização. Em tecnologia enzimática, este termo se refere ao confinamento físico de uma enzima ou a sua localização dentro de uma região definida com a retenção das atividades catalíticas. Ao imobilizar uma enzima, algumas mudanças estruturais e conformacionais podem acontecer e consequentemente, acarretar em mudanças das suas propriedades.^{175,176}

Como as enzimas são extremamente sensíveis, a imobilização é uma técnica necessária para o aumento de algumas propriedades enzimáticas como estabilidade, atividade e a possibilidade de reutilização. Entretanto, a extensão das mudanças de propriedade é diretamente dependente do método de imobilização, da natureza do suporte, do agente acoplante e da especificidade dos grupos reativos. Isto faz com que haja diversos métodos de imobilização, porém, sempre afetando a atividade enzimática de alguma maneira.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹

Desde 1960 o uso de enzimas isoladas e imobilizadas tem sido utilizado em reatores industriais de larga escala. Hoje em dia, esforços na área de pesquisa e desenvolvimento têm sido feitos de maneira a aperfeiçoar o material dos suportes, com o objetivo de manter e /ou aumentar a atividade enzimática.¹⁷⁵

Através da imobilização, as enzimas ficam pouco suscetíveis a processos intramoleculares, como autólise, proteólise e agregação, e a enzima dentro de uma estrutura porosa não entra em contato com agentes desnaturantes, tais como bolhas e solventes imiscíveis. O uso de enzimas imobilizadas também permite a simplificação do desenho de um reator e do controle de uma reação, já que apenas retirando a enzima do contato da reação, faz com que ela pare.¹⁸⁰

Proteínas e enzimas imobilizadas têm sido utilizadas também em aplicações biomédicas. Estas aplicações incluem o uso de anticorpos ou antígenos imobilizados para cromatografia com bioafinidade e também o uso de receptores ou ligantes imobilizados para o estudo de suas interações com células e biosensores.^{181,182}

Deve-se ter em mente que para cada tipo de suporte existe uma gama de possibilidades de procedimentos de imobilização. Dentre os métodos de imobilização estão os reversíveis e os irreversíveis:

As imobilizações irreversíveis previnem a lixiviação da enzima durante as reações, porém quando a enzima se desativa, o suporte deve ser jogado fora juntamente com a enzima, enquanto nas imobilizações reversíveis, há a possibilidade de recuperar os suportes após a inativação da enzima.

A ligação covalente à superfície, o aprisionamento dentro de uma matriz e a micro-encapsulação se caracterizam como imobilizações irreversíveis. Para a ligação covalente, o suporte deve possuir um grupo reativo como, por exemplo, amina, carboxilato e tiol, ou deve ser ativado de maneira a realizar a imobilização. O pré-

requisito para a imobilização direta em superfícies magnéticas é a ativação das ligações Fe-OH com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).¹⁸³ Se a superfície está coberta de funções ácido carboxílico, este tipo de ativação também é necessária, resultando em ligações estáveis do tipo amida entre o suporte e a enzima.¹⁸⁴⁻¹⁹²

Quando o suporte possui aminas, o simples uso de um agente reticulante, como glutaraldeído resulta na formação de ligações imina entre a biomolécula e o suporte. A redução destas ligações imina pode ser feita a partir do uso de uma solução de borohidreto de sódio para obter ligações amina.¹⁹³

A um suporte epoxidado, a reação ocorrerá com aminas, hidroxilas e sulfetos presentes na superfície da enzima. Este método normalmente proporciona bastante estabilidade às proteínas devido ao fato de elas serem imobilizadas por múltiplos pontos à superfície do suporte.^{194,195}

Pode-se também utilizar o co-aprisionamento de partículas magnéticas e enzimas em uma matriz polimérica. O ponto negativo deste tipo de sistema é a diminuição da transferência de massa, porém, por outro lado, há uma menor desnaturação das enzimas.

¹⁹⁶

Outra metodologia envolve a micro-encapsulação, em que, através de rotas sintéticas meticulosamente pensadas, há o aprisionamento das enzimas no núcleo de partículas magnéticas poliméricas, obtendo-se um biocatalisador extremamente estável.¹⁹⁷

Já para as imobilizações reversíveis, o método mais fácil é a adsorção das enzimas à superfície do suporte, pois o ΔG diminui com a adsorção, sendo um processo altamente entrópico. As interações entre nanopartículas e enzima são basicamente por pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals ou interações hidrofóbicas. A

desvantagem deste método de imobilização é que o processo de adsorção é altamente afetado por pH, força iônica, temperatura e polaridade do solvente.^{198,199}

A ligação iônica também pode ser utilizada para se obter um sistema reversível de imobilização. Utilizando-se ligantes iônicos poliméricos podemos modular as interações entre proteína e matriz, porém, como as cargas estão muito próximas às enzimas, a cinética pode se distorcer como resultado da partição ou devido ao fenômeno de difusão, mudando o pH ótimo de reação ou a estabilidade quanto ao pH.^{175,200}

Ligações por afinidade como entre estreptavidina e biotina são muito utilizados em métodos de imobilização para se obter partículas magnéticas para imunoenaios. Alguns trabalhos também utilizam inibidores enzimáticos como uma maneira de purificar uma mistura complexa de enzimas.

Outro método que utiliza a afinidade é composto do uso de uma camada de ouro em volta de partículas magnéticas. A afinidade entre partícula e suporte se dá pelos resíduos de cisteína através da sua ligação na superfície do suporte.²⁰¹

Dentre os métodos reversíveis de imobilização está a quelação, em que utilizando Cu^{2+} ou Ni^{2+} coordenado ao suporte, pode-se coordenar a superfície enzimática ao metal.²⁰²⁻²⁰⁴ Neste caso, a adsorção não é uniforme e há a possibilidade de lixiviação dos metais, diminuindo a reprodutibilidade destes sistemas.

8.4 Enzimas a serem imobilizadas

Neste trabalho a imobilização de quatro enzimas diferentes foi estudada em quatro tipos de suporte magnéticos diferentes. Estas enzimas serão utilizadas em conjunto para que haja a redução do gás carbônico para metanol, de acordo com o esquema mostrado na Figura 77. A enzima formato desidrogenase (FDH) primeiramente reduz o CO_2 a ácido fórmico, que por sua vez é reduzido pela

formaldeído desidrogenase (FalDH) à formaldeído, que então é reduzido a metanol pela álcool desidrogenase (ADH). Estas três reações utilizam o NADH como coenzima, que deve ser regenerado pela glutamato desidrogenase (GDH).

Figura 77. Esquema sequencial enzimático para a obtenção de metanol a partir de CO₂.

8.4.1 Formato desidrogenase (FDH)

A enzima formato desidrogenase (E.C 1.2.12) faz parte do grupo D-2-hidroxi ácido desidrogenase sendo encontrada em organismos metilotróficos.^{1 205,206} A reação catalisada pela FDH é a redução do CO₂ via NADH para formato e vice versa. A FDH de *Candida boidinii* existe como um homodímero de 42 kDa²⁰⁷, com duas subunidades idênticas, cada uma com um sítio ativo independente.²⁰⁸ A reação segue um mecanismo bi-bi ordenado consistindo de quatro passos principais:²⁰⁹

- (1) O NAD⁺ se liga à FDH formando um complexo enzima-substrato;
- (2) O formato se liga ao complexo enzima-substrato, o qual é rapidamente transformado num complexo ternário;
- (3) CO₂ é liberado do complexo enzima-substrato;
- (4) NADH é liberado.

¹ Organismos com capacidade de utilizar substratos com apenas um carbono (C1) como única fonte de energia e carbono.

A reação inversa também é possível através do uso de excesso de NADH.²¹⁰ A FDH possui um potencial considerável em aplicações de biotecnologia como a detecção de formato²¹¹⁻²¹³, a regeneração de NADH em sistemas enzimáticos²¹⁴⁻²¹⁶ e a produção de metanol a partir de CO₂.^{217,218}

8.4.2 Formaldeído desidrogenase (FalDH)

A enzima formaldeído desidrogenase (E.C 1.2.1.1) pertence à família das enzimas álcool desidrogenase de cadeia média^{219,220} e está presente em uma variedade de organismos que vão desde bactérias à animais.²²¹ A FalDH em sua forma ativa é um homotetrâmero de subunidades idênticas, compreendendo 398 resíduos de aminoácidos e dois átomos de zinco, com massa molecular de 42 kDa. Com relação aos átomos de zinco, um é estrutural, ligado a quatro resíduos de cisteína e o outro está no sítio catalítico, ligado a um resíduo de cisteína.²²²

A reação catalisada pela formaldeído desidrogenase é a oxidação de formaldeído à ácido fórmico e vice-versa. Esta reação é dependente de glutatona em todos os organismos, exceto na *Pseudomonas putida*.²²³ O mecanismo de reação sugerido para FalDH de *P. putida* é do tipo “ping-pong”:

- (1) Primeiro o formaldeído se liga ao sítio ativo formando um complexo enzima-substrato que rapidamente já forma o produto;
- (2) O produto, ácido fórmico, é então liberado;
- (3) O NAD⁺ se liga à enzima, formando um complexo enzima-NAD⁺ que por sua vez forma o NADH;
- (4) O NADH é liberado.

A FaldH já foi estudada para a detecção de formaldeído ^{224,225} e em sistemas para formação de metanol a partir de CO₂. ^{226 227}

8.4.3 Álcool desidrogenase (ADH)

A álcool desidrogenase (E.C 1.1.1.1) está presente em uma variedade de microorganismos e no fígado de animais. O seu papel fisiológico está ligado ao metabolismo do álcool. ²²⁸ A ADH de *Sacharomyces cerevisiae* é composta de quatro subunidades idênticas, cada uma contendo 88 resíduos de aminoácidos, dois átomos de zinco (um estrutural e outro catalítico) ^{229,230} e uma coenzima (NAD(H)) com limitada especificidade para alcoóis primários. A massa molecular da enzima tetramérica é de 150 kDa. ^{231,232}

A reação catalisada pela ADH é de oxidação do etanol à acetaldeído com o custo de NAD⁺. O mecanismo segue uma ordem bi-bi randômica em que:

- (1) Um substrato, ou NAD⁺ ou álcool, se liga à enzima formando um complexo enzima-substrato;
- (2) Um segundo substrato, NAD⁺ ou álcool, se liga ao complexo enzima-substrato, formando um complexo ternário;
- (3) Do complexo ternário, um dos produtos é liberado, NADH ou acetaldeído;
- (4) Do complexo enzima-produto resultante da etapa (3), o segundo produto é liberado, NADH ou acetaldeído.

A ADH é utilizada em diversas áreas, como por exemplo, em estudos forenses para estimar a concentração primária de alcoóis ^{233,234} e NAD⁺ ²³⁵ e etilenoglicol ^{236,237}. Também é utilizada como catalisador em química orgânica. ^{238,239}

8.4.4 Glutamato desidrogenase (GDH)

A glutamato desidrogenase (E.C 1.4.1.3) pertence à família de desidrogenases ELFV (glutamato, leucina, fenilalanina e valina) e pode ser encontrada em diversos organismos, desde bactérias até animais. A GDH de fígado bovino é responsável pela interconversão do nitrogênio do grupo α -amino de aminoácidos em amônia.²⁴⁰ A reação envolve dois substratos na direção da deaminação oxidativa, e três substratos na direção da aminação redutiva:²⁴¹

Esta enzima possui seis subunidades idênticas de 56 kDa cada e a enzima ativa possui um peso molecular de 336 kDa, mas pode se associar em estruturas maiores sem perder a sua atividade.²⁴²

O mecanismo segue uma ordem bi-bi randômica em que:²⁴³

- (1) Um substrato, ou NAD^+ ou glutamato, se liga à enzima formando um complexo enzima-substrato;
- (2) Um segundo substrato, NAD^+ ou glutamato, se liga ao complexo enzima-substrato, formando um complexo ternário;
- (3) Do complexo ternário, um dos produtos é liberado, NADH ou α -ceto-glutarato;
- (4) Do complexo enzima-produto resultante da etapa (3), o segundo produto é liberado, NADH ou α -ceto-glutarato.

Em biocatálise, a GDH é utilizada como regenerador da coenzima $\text{NADH}^{244,245}$, mas também apresenta propriedades como biosensor.²⁴⁶⁻²⁴⁸

9. *Objetivos específicos*

O objetivo desta parte do trabalho foi a imobilização das enzimas álcool desidrogenase de *Sacharomyces cerevisie*, formato desidrogenase de *Candida boidinii*, formaldeído desidrogenase de *Pseudomonas putida* e glutamato desidrogenase de fígado bovino em três tipos de suporte magnético diferentes. Estes suportes são compostos de um núcleo magnético de magnetita (Fe_3O_4), o qual foi encapsado ou apenas com amino-propil-trietoxissilano (APTS) para a formação da MagNP-APTS ou com sílica e depois APTS, para obter a MagNP@SiO₂-APTS ou com glioxil-agarose para obter a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose.

As melhores enzimas obtidas foram utilizadas em um sistema multi-enzimático para a conversão de gás carbônico em metanol e formaldeído.

“Como uma criança antes de a ensinarem a ser grande,

Fui verdadeiro e leal ao que vi e ouvi”

Alberto Caiero

10. Parte experimental

10.1 Materiais e Métodos

Todos os materiais foram utilizados sem prévia purificação, a não ser quando especificado. Os métodos de análise estão citados na Parte experimental do Capítulo 1.

10.2 Sínteses das nanopartículas

10.2.1 Síntese de Nanopartículas de Magnetita

No balão B são colocados 1100 mL de água deionizada e este é aquecido até a ebulição sob borbulhamento de N₂ (Figura 78). Aplicando-se ao balão B uma atmosfera positiva de N₂ transferem-se 100 mL de água deste balão para o frasco A.

Adiciona-se 20 g de NaOH (Synth, 97%) ao balão B e 1,269 g de FeCl₂ (Aldrich, 98%) e 5,406 g de FeCl₃.6H₂O (Sigma-Aldrich, ≥ 98%) ao frasco A. O frasco A é colocado em um banho de ultra-som até a total dissolução dos sais de ferro.

O agitador mecânico é ligado e, aplicando-se uma atmosfera positiva de N₂ ao frasco A, a solução de ferro é adicionada lentamente ao frasco B sob agitação de aproximadamente 2000 rpm. A agitação é mantida por 30 minutos.

Após a reação, as partículas são lavadas com água deionizada e deaerada até se obter pH 7, com a ajuda de um campo magnético permanente que as mantém agrupadas em um local do balão. As nanopartículas então são tratadas para serem revestidas com o silano desejado.

Figura 78. Esquema de vidraria utilizada para a reação de obtenção de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita.

10.2.2 Recobrimento das nanopartículas com sílica

Para a formação da camada de sílica em volta das nanopartículas de magnetita utilizou-se o método de Stöber^{249 250}. Ajustou-se o pH para 10 com hidróxido de amônio e adicionou-se 100 mL de uma solução água/etanol (v:v 1:9) e então. Fez-se uma solução com 1 mL de TEOS (tetraetil ortosilicato) e 49 mL de álcool etílico e adicionou-a lentamente sob uma agitação vigorosa (2000 rpm).

As nanopartículas MagNP@SiO₂ foram lavadas 10 vezes com 20 mL de etanol e então secas sob vácuo até peso constante. Estas partículas sofreram então o processo de silanização antes do uso.

A caracterização foi feita por infravermelho e espalhamento dinâmico de luz.

10.2.3 Silanização das nanopartículas

As nanopartículas obtidas tendem a agregar quando em solução. Para evitar que este fenômeno ocorra, realiza-se logo em seguida à síntese, a silanização das

nanopartículas com o aminopropil trimetóxi-silano, seguindo procedimentos já descritos na literatura:

A suspensão de nanopartículas é lavada 2 vezes com metanol (Carlo Elba, 99,9%) deaerado e adicionada a uma mistura de solventes (1:1 de metanol/tolueno), em atmosfera inerte. Esta suspensão é aquecida a 95 °C até que seu volume se reduza pela metade e a seguir adiciona-se 35 mL de metanol deaerado. Este processo é repetido três vezes para garantir que toda a água em excesso seja retirada do sistema.

O sistema de arraste da água funciona a partir de misturas azeotrópicas: metanol/tolueno (27% de tolueno v/v) e água/tolueno (87% de tolueno v/v). A primeira mistura tem ponto de ebulição de 63.5 °C, enquanto a temperatura de ebulição para a segunda é de 84.1°C. Desta maneira evita-se a reação de hidrólise do silano no seio da solução impedindo que haja desperdício de reagente.

Assim, após o procedimento descrito acima, 0,02 mL de silano para cada 1mg de Fe₃O₄ nanoparticulado é adicionado e o sistema fica em refluxo por 12 horas a uma temperatura de 110°C em tolueno (Synth, 92%).

As partículas obtidas são então lavadas com acetona deaerada e secas em dessecador a vácuo durante 2 semanas, obtendo-se um pó preto. Realizou-se a caracterização das nanopartículas terminadas em amina com espectroscopia de infravermelho, microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura, microanálise e mössbauer.

10.2.4 Síntese da MagNP-Agarose

Em um frasco, adicionou-se 6 mg de agarose, 13 mg de KBr e 20 µL de H₂SO₄. Agitou-se por 30 minutos e então, uma suspensão de MagNP-APTS dispersa em 0.5 mL de NaOH 1 molL⁻¹ foi adicionada à agarose. Agitou-se por mais 30 minutos.

Lavou-se 5 vezes com 0.5 mL de tampão TRIS-HCl 0.1 molL^{-1} , pH 8.8.

10.2.5 Síntese da MagNP@CMC

A síntese da MagNP@CMC foi realizada pelo aluno de doutorado do laboratório LQSN, Delmárcio Gomes. Nesta síntese 640 mg de Fe_3O_4 foram misturadas à 16 mg de CMC e 34 mL de água. A reação prosseguiu por 1 hora e meia e então as partículas foram lavadas três vezes com água e secas em estufa a 100°C por um dia.

10.2.6 Ativação da superfície da MagNP@CMC

Em um balão, adicionou-se 500 mg de MagNP@CMC, 3 mL de água e sob banho de gelo, adicionou-se 250 μL de uma solução 2 molL^{-1} de NaOH e 6.7 mg de NaBH_4 . Então, adicionou-se 180 μL de glicidol gota a gota e deixou-se agitando a 25°C por 16 horas.

Lavou-se três vezes com água e então 5 mL de água deionizada e 15.8 mg de metaperiodato de sódio foram adicionados. Deixou-se agitando por 2 horas e lavou-se três vezes com água com a ajuda da centrifugação para a lavagem ser possível.

10.2.7 Síntese da Glioxil-agarose

Em um balão, adicionou-se 500 mg de agarose, 3 mL de água e sob banho de gelo, adicionou-se 250 μL de uma solução 2 molL^{-1} de NaOH e 6.7 mg de NaBH_4 . Então, adicionou-se 180 μL de glicidol gota a gota e deixou-se agitando a 25°C por 16 horas.

Lavou-se três vezes com água e então 5 mL de água deionizada e 15.8 mg de metaperiodato de sódio foram adicionados. Deixou-se agitando por 2 horas e lavou-se três vezes com água com a ajuda da centrifugação para a lavagem ser possível.

10.3 Imobilizações

Todas as imobilizações e catálises foram feitas no mínimo em triplicata.

10.3.1 Imobilização da álcool desidrogenase de *Sacharomyces cerevise*

10.3.1.1 Imobilização da ADH em MagNP-APTS (procedimento geral)

Uma determinada quantidade de MagNP-APTS (1,2,4,8, 16 e 32 mg) foi dispersada em 0.5 mL de tampão 0.1 molL^{-1} TRIS-HCl pH 8.8. Em outro frasco, 1 mg de ADH foi dispersada em 0.5 mL do mesmo tampão. O conteúdo dos dois frascos foi combinado e então, glutaraldeído foi adicionado (0.22, 0.44, 0.88, 1.2 e 1.42 mmol). A imobilização ocorreu a 0°C por um determinado período de tempo (5, 10, 30 e 60 minutos) e a MagNP-APTS/ADH obtida foi lavada três vezes com 0.5 mL de tampão 0.1M TRIS-HCl pH 8.8.

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico de conversão do etanol à acetaldeído, analisando-se a formação de NADH em pH 8.8 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL^{-1}) e 37°C . Obteve-se a maior conversão catalítica com: 8 mg de MagNP-APTS, 0.22 mmol de glutaraldeído e 10 minutos de imobilização.

10.3.1.2 Imobilização da ADH em MagNP@SiO₂-APTS (procedimento geral)

Uma determinada quantidade de MagNP@SiO₂-APTS (1, 2, 4, 8, 16 e 32 mg) foi dispersada em 0.5 mL de tampão TRIS-HCl 0.1 molL^{-1} (pH 8.8). Em outro frasco, 1 mg de ADH foi dispersada em 0.5 mL do mesmo tampão e combinada com o conteúdo do primeiro frasco. Adicionou-se então glutaraldeído (0.22, 0.44, 0.88, 1.2 e 1.42 mmol) e a imobilização procedeu a 0°C por certo tempo (5, 10, 30 e 60 minutos). A MagNP@SiO₂-APTS/ADH foi lavada três vezes com tampão 0.1 molL^{-1} TRIS-HCl pH 8.8.

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico de conversão do etanol à acetaldeído, analisando-se a formação de NADH em pH 8.8 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹) e 37°C. Obteve-se a maior conversão catalítica com: 16 mg de MagNP@SiO₂-APTS, 0.22 mmol de glutaraldeído e 1 hora de imobilização.

10.3.1.3 Imobilização da ADH em MagNP-APTS-Agarose (procedimento geral)

Um determinado volume (50, 100, 200 e 300 µL) de uma suspensão 4 mg/mL (em tampão 0.1 molL⁻¹ TRIS-HCl pH 8.8) de MagNP-APTS-Agarose foi adicionado à 0.5 mL de uma solução de 2 mg/mL de ADH (dispersa no mesmo tampão). Após 10 minutos de imobilização a 0°C, o material magnético foi lavado três vezes com tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹ (pH 8.8).

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico de conversão do etanol à acetaldeído, analisando-se a formação de NADH em pH 8.8 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹) e 37°C. Obteve-se a maior conversão catalítica com 200 µL de MagNP-APTS-Agarose.

10.3.2 Imobilização da formaldeído desidrogenase de *Pseudomonas putida*

10.3.2.1 Imobilização da FaldDH em MagNP-APTS (procedimento geral)

Inicialmente, uma suspensão de MagNP-APTS 3.5 mg/mL (em tampão Tris-HCl pH 7.5, 0.1 molL⁻¹) foi preparada. A certo volume desta suspensão (57, 85, 142, 228, 286 e 343 µL) adicionou-se 1 mL de uma solução 0.063 mg/mL de FaldDH em tampão 0.1 molL⁻¹ Tris-HCl pH 7.5, seguida da adição de uma determinada quantidade de glutaraldeído (1x10⁻⁵, 2x10⁻⁵, 3x10⁻⁵, 4x10⁻⁵ and 5x10⁻⁵ mol).

A imobilização prosseguiu a 0°C variando-se o tempo de imobilização (0, 5, 10, 20 e 30 minutos). Após este período, a MagNP-APTS/FalDH obtida foi lavada três vezes com 100 µL de tampão TRIS-HCl pH 7.5 0.1 molL⁻¹.

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico da conversão do formaldeído a formato, analisando-se a formação de NADH em pH 7.5 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹) e 32°C. Obteve-se a maior conversão catalítica com 0.8 mg de MagNP-APTS, 3x10⁻⁵ mol de glutaraldeído e 20 minutos de imobilização.

10.3.2.2 Imobilização da FalDH em MagNP@SiO₂-APTS (procedimento geral)

Uma determinada quantidade de MagNP@SiO₂-APTS (0.2, 0.3, 0.4, 0.8 e 1 mg) foi dispersada em 100 µL de tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹ (pH 7.5). Adicionou-se então 1 mL de uma solução 0.063 mg/mL de FalDH (em tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹ e pH 7.5), seguida da adição de uma determinada quantidade de glutaraldeído (0.5x10⁻⁵, 1x10⁻⁵, 1.5x10⁻⁵ and 2x10⁻⁵ mol).

A imobilização ocorreu a 0°C por certo período de tempo (0, 5, 10, 20 e 40 minutos). Após a imobilização, MagNP@SiO₂-APTS/FalDH foi lavada três vezes com 100 µL de tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹ e pH 7.5.

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico da conversão do formaldeído a formato, analisando-se a formação de NADH em pH 7.5 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹) e 32°C. Obteve-se a maior conversão catalítica com 0.3 mg de MagNP@SiO₂-APTS, 1x10⁻⁵ mol de glutaraldeído e 20 minutos de imobilização.

10.3.2.3 Imobilização da FaldDH em MagNP-APTS-Glioxil Agarose (procedimento geral)

Inicialmente, preparou-se uma suspensão de MagNP-APTS 6.8 mg/mL em tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹ e pH 7.5. A uma determinada quantidade desta suspensão (29, 59, 110 e 235 µL) adicionou-se 1 mL de uma solução 0.063 mg/mL de FaldDH, seguida da adição de uma suspensão 100 mg/mL de glioxil-agarose (50, 100, 150, 200 e 300 µL). A imobilização prosseguiu a 0°C por um determinado período de tempo (0, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) e após este tempo, foram feitas três lavagens sucessivas de MagNP-APTS-Glioxil Agarose/FaldDH com 100 µL de tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹ pH 7.5 cada. O sistema obtido foi então dispersado em 0.5 mL do mesmo tampão.

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico da conversão do formaldeído a formato, analisando-se a formação de NADH em pH 7.5 (tampão TRIS-HCl 0.1M) e 32°C. Obteve-se a maior conversão catalítica com 0.75 mg de MagNP-APTS, 100 µL de glioxil-agarose 100 mg/mL e 10 minutos de imobilização.

10.3.2 Imobilização da formato desidrogenase de *Candida boidinii*

10.3.3.1 Imobilização da FDH em MagNP-APTS (procedimento geral)

A solução estoque de enzima consistia em 3.13 mg/mL de FDH em tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹ (pH 7.5). Para a imobilização, 300 µL desta solução (0.94 mg, 5U) foram misturados à 500 µL de uma suspensão de MagNP-APTS (com 1, 2, 4, 8 e 16 mg de nanopartícula). Então, adicionou-se gluteraldeído (1.2 µmol, 2.4 µmol, 4.8 µmol, 9.6 µmol ou 19.2 µmol) e a imobilização prosseguiu a 0°C por certo tempo (0, 2, 5, 10, 15, 20 e 60 minutos).

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico de conversão do formato a CO₂, analisando-se a formação de NADH em pH 7.5 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹) e 32°C. Obteve-se a maior conversão catalítica com 16 mg de MagNP-APTS, 1.2 µmol de gluteraldeído e 1 hora de imobilização.

10.3.3.2 Imobilização da FDH em MagNP@SiO₂-APTS (procedimento geral)

Como no caso anterior (item 10.3.3.1), 300 µL de uma solução estoque de FDH (0.94 mg, 5U) foram adicionados à 0.5 mL de uma suspensão de MagNP@SiO₂-APTS (1, 2, 4, 8, 13, 16 e 18 mg) em tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹, pH 7.5. Seguiu-se então com a adição de gluteraldeído (0, 0.6 µmol, 1.2 µmol, 2.4 µmol, 4.8 µmol, 9.6 µmol or 19.2 µmol) e a reação prosseguiu a 0°C por 0, 2, 5, 10, 15 ou 20 minutos. Após este período a MagNP@SiO₂-APTS/FDH foi lavada três vezes com 0.5 mL de tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹, pH 7.5.

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico de conversão do formato a CO₂, analisando-se a formação de NADH em pH 7.5 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹) e 32°C. Obteve-se a maior conversão catalítica com 13 mg de MagNP-APTS, 0.6 µmol de gluteraldeído e 10 minutos de imobilização.

10.3.3.3 Imobilização da FDH em MagNP-APTS-Glioxil Agarose (procedimento geral)

Neste caso, 8 mg de MagNP-APTS e 300 µL de uma solução estoque de FDH (0.94 mg, 5U) foram misturados com 700 µL de tampão TRIS-HCl 0.1 M, pH 7.5 e 300 µL de glioxil-agarose (100 mg/mL). A imobilização prosseguiu por 10 minutos a 0°C e

então, a MagNP-APTS-Glioxil Agarose/FDH foi lavada três vezes com 0.5 mL de tampão pH 7.5 e dispersas em 0.6 mL do mesmo tampão.

10.3.4 Imobilização da glutamato desidrogenase de fígado bovino

10.3.4.1 Imobilização da GDH em MagNP-APTS (procedimento geral)

A um frasco contendo uma determinada quantidade de MagNP-APTS (0, 1, 2, 4, 8 ou 16 mg) suspensas em 100 μL de tampão Tris-HCl (pH 7.5, 0.1 molL^{-1}) adicionou-se 100 μL de uma solução 0.523 mg/mL de GDH. Então uma determinada quantidade de glutaraldeído (0, 4, 10, 20 e 30 μmol) foi adicionada e deixou-se a reação a 0°C por certo tempo (0, 5, 10, 15 e 20 minutos). Após a imobilização a MagNP-APTS/GDH foi lavada três vezes com 100 μL de tampão TRIS-HCl pH 7.5, 0.1 molL^{-1} .

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico de conversão do glutamato a α -ceto-glutarato, analisando-se a formação de NADH em pH 7.5 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL^{-1}) e 32°C . Obteve-se a maior conversão catalítica com 2 mg de MagNP-APTS, 4 μmol de glutaraldeído e 5 minutos de imobilização.

10.3.4.2 Imobilização da GDH em MagNP@SiO₂-APTS (procedimento geral)

Uma determinada quantidade de MagNP@SiO₂-APTS (0.6, 1.2, 2.4, 4 e 8 mg) foi suspensa em 100 μL de tampão TRIS-HCl (pH 7.5, 0.1 molL^{-1}) e 100 μL de uma solução 0.523 mg/mL de GDH foi adicionada à esta suspensão. Em seguida, adicionou-se glutaraldeído (0, 4, 10, 20 ou 30 μmol) e deixou-se a 0°C por um tempo (0, 2.5, 5, 10 e 15 minutos). Após a imobilização, a enzima resultante, MagNP@SiO₂-

APTS/GDH, foi lavada três vezes com 100 μL de tampão TRIS-HCl (pH 7.5, 0.1 molL^{-1}).

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico de conversão do glutamato a α -ceto-glutarato, analisando-se a formação de NADH em pH 7.5 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL^{-1}) e 32°C. Obteve-se a maior conversão catalítica com 1.2 mg de MagNP@SiO₂-APTS, 20 μmol de gluteraldeído e 0 minutos de imobilização.

10.3.4.3 Imobilização da GDH em MagNP-APTS-Glioxil Agarose (procedimento geral)

De uma solução estoque de GDH 0.523 mg/mL, 100 μL foram adicionados a uma quantidade de MagNP-APTS (1, 2, 4, 8 ou 12 mg) suspensa em 100 μL de tampão TRIS-HCl (pH 7.5, 0.1 molL^{-1}). Então, certa quantidade de glioxil-agarose 150 mg/mL foi adicionada à suspensão (10, 25, 50, 125 e 150 μL) e a imobilização ocorreu a 0°C por determinado tempo (0, 2, 5, 10 e 20 minutos). Após a imobilização, a enzima resultante, MagNP-APTS-Glioxil Agarose/GDH, foi lavada três vezes com 100 μL de tampão TRIS-HCl (pH 7.5, 0.1 molL^{-1}).

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico de conversão do glutamato a α -ceto-glutarato, analisando-se a formação de NADH em pH 7.5 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL^{-1}) e 32°C. Obteve-se a maior conversão catalítica com 12 mg de MagNP-APTS, 50 μL de glioxil agarose 150 mg/mL e 5 minutos de imobilização.

10.3.4.4 Imobilização da GDH em MagNP@CMC (procedimento geral)

A uma determinada quantidade de MagNP@CMC 200 mg/mL (10, 20, 30, 40 e 50 μL) adicionou-se certa quantidade de GDH 0.523 mg/mL (50, 100, 150, 200 e 150

μL). A imobilização ocorreu a 0°C por certo tempo (0, 2.5, 5, 10 e 20 minutos). Após a imobilização, a enzima resultante, MagNP@CMC/GDH, foi lavada três vezes com $100 \mu\text{L}$ de tampão TRIS-HCl ($\text{pH } 7.5$, 0.1 molL^{-1}).

As melhores condições de imobilização encontradas para este método foram baseadas no desempenho catalítico de conversão do glutamato a α -ceto-glutarato, analisando-se a formação de NADH em $\text{pH } 7.5$ (tampão TRIS-HCl 0.1 molL^{-1}) e 32°C . Obteve-se a maior conversão catalítica com $30 \mu\text{L}$ de MagNP@CMC 200 mg/mL , $100 \mu\text{L}$ de GDH 0.523 mg/mL e 5 minutos de imobilização.

10.4 Cinéticas

10.4.1 Conversão de etanol a acetaldeído

A ADH imobilizada foi adicionada a $980 \mu\text{L}$ de tampão 0.1 molL^{-1} de TRIS-HCl $\text{pH } 8.8$, contendo $1 \mu\text{L}$ de etanol (0.17 mmol) em uma cubeta de quartzo. Adicionou-se então $20 \mu\text{L}$ de NAD^+ (2 m molL^{-1}) e a reação foi monitorada pela formação do NADH, com λ_{max} em 340 nm , via espectroscopia UV-Vis.

Para os estudos de dependência de pH , manteve-se a temperatura de 32°C , enquanto para os estudos de temperatura, manteve-se o pH em 8.8 .

10.4.2 Conversão de formaldeído a metanol

A ADH imobilizada foi adicionada a $980 \mu\text{L}$ de tampão fosfato 0.1 molL^{-1} $\text{pH } 5.8$, contendo $5 \mu\text{L}$ de formaldeído 36% ($60 \mu\text{mol}$) em uma cubeta de quartzo. Adicionou-se então $20 \mu\text{L}$ de NADH (2 m molL^{-1}) e a reação foi monitorada pelo consumo do NADH, com λ_{max} em 340 nm , via espectroscopia UV-Vis.

Para os estudos de dependência de pH, manteve-se a temperatura de 25°C, enquanto para os estudos de temperatura, manteve-se o pH em 5.8.

10.4.3 Conversão de formaldeído a formato

Em uma cubeta de quartzo adicionou-se 30 μL de formaldeído (36% v/v), 20 μL de NAD^+ (7.5 mM) e o conteúdo total obtido das imobilizações da FalDH (apenas para MagNP-Glyoxyl-Agarose/FalDH que foi utilizado 200 μL da suspensão final). O volume da reação foi ajustado para 1 mL com tampão TRIS-HCl 0.1M pH 7.5. A reação foi acompanhada pela formação de NADH, com λ_{max} em 340 nm, via espectroscopia UV-Vis.

Para os estudos de dependência de pH, manteve-se a temperatura de 25°C, enquanto para os estudos de temperatura, manteve-se o pH em 7.5.

10.4.4 Conversão de formato a formaldeído

Em uma cubeta de quartzo adicionou-se 50 μL de uma solução de formato de sódio (1 m molL^{-1}), 20 μL de NADH (7.5 m molL^{-1}) e o conteúdo total obtido das imobilizações da FalDH (apenas para MagNP-Glyoxyl-Agarose/FalDH que foi utilizado 200 μL da suspensão final). O volume da reação foi ajustado para 1 mL com tampão TRIS-HCl 0.1 molL^{-1} pH 7.5. A reação foi acompanhada pela formação de formaldeído a partir da sua reação com reagente de Nash ²⁵¹, formando um produto amarelo com λ_{max} em 420 nm, via espectroscopia UV-Vis.

Para os estudos de dependência de pH, manteve-se a temperatura de 25°C, enquanto para os estudos de temperatura, manteve-se o pH em 7.5.

10.4.5 Conversão de formato a CO_2

A enzima FDH foi dispersa em 1 mL de tampão TRIS-HCl 0.1 mol L^{-1} e pH 7.5 e então adicionou-se 10 μL de formiato de sódio 0.4 M e 5 μL de NAD^+ (0.9 mol L^{-1}). A formação de NADH foi monitorada pelo surgimento da banda em 340 nm por espectroscopia UV-Vis.

Para os estudos de dependência de pH, manteve-se a temperatura de 37°C , enquanto para os estudos de temperatura, manteve-se o pH em 7.5.

10.4.6 Conversão de CO_2 a formato

A enzima FDH foi dispersa em 0.5 mL de tampão TRIS-HCl 0.1 mol L^{-1} e pH 7.5 e então adicionou-se 0.5 mL de uma solução saturada de CO_2 em água (pH 4 $\approx 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CO}_{2(\text{aq})}$) e 5 μL de NADH (0.9 mol L^{-1}). O consumo de NADH foi monitorado pelo desaparecimento da banda em 340 nm por espectroscopia UV-Vis.

Para os estudos de dependência de pH, manteve-se a temperatura de 25°C , enquanto para os estudos de temperatura, manteve-se o pH em 7.5.

10.4.7 Conversão de glutamato a α -ceto-glutarato

Os estudos de cinética da GDH foram feitos em uma cubeta de quartzo com 20 μL de uma solução 0.1 mol L^{-1} de glutamato, 50 μL de uma solução 2.4 mmol L^{-1} de NAD^+ e 900 μL de solução tampão. A reação foi acompanhada pela formação de NADH, com λ_{max} em 340 nm, via espectroscopia UV-Vis.

Para os estudos de dependência de pH, manteve-se a temperatura de 25°C , enquanto para os estudos de temperatura, manteve-se o pH em 7.5.

10.5 Estudos de reciclagem

10.5.1 Reciclagem dos sistemas com ADH imobilizada

Para os estudos de reciclagem da reação de conversão de etanol à acetaldeído, a MagNP-APTS/ADH e a MagNP@SiO₂-APTS/ADH foram utilizadas em pH 8.8 e 25°C, enquanto a MagNP-Agarose/ADH foi utilizada em pH 8.8 e 32°C, correspondendo às condições de melhor performance para cada sistema.

Para os estudos de reciclagem da reação de conversão de formaldeído à metanol, a MagNP-APTS/ADH e a MagNP@SiO₂-APTS/ADH foram utilizadas em pH 7.5 e 25°C, enquanto a MagNP-Agarose/ADH foi utilizada em pH 6.8 e 30°C, correspondendo às condições de melhor performance para cada sistema.

10.5.2 Reciclagem dos sistemas com FalDH imobilizada

Para os estudos de reciclagem da reação de formaldeído à formato, o sistema MagNP-APTS/FalDH foi utilizado em pH 8.8 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹) e 42°C, o sistema MagNP@SiO₂-APTS/FalDH em pH 7.5 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹) e 32°C e o sistema MagNP-APTS-Glioxil Agarose/FalDH foi utilizado em pH 5.8 (tampão fosfato 0.1 molL⁻¹) e 32°C.

Para os estudos de reciclagem da reação de formato à formaldeído, os sistemas MagNP-APTS/FalDH e MagNP@SiO₂-APTS/FalDH foram utilizados em pH 6.8 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹) e 20°C, e o sistema MagNP-APTS-Glioxil Agarose/FalDH foi utilizado em pH 6.8 (tampão fosfato 0.1 molL⁻¹) e 30°C.

10.5.3 Reciclagem dos sistemas com FDH imobilizada

Para os estudos de reciclagem da reação de conversão de formato à CO_2 , o sistema MagNP-APTS/FDH foi utilizado em pH 7.5 e 22°C , enquanto MagNP@ SiO_2 -APTS/FDH e MagNP-APTS-Glioxil Agarose/FDH foram utilizados em pH 7.5 e 27°C .

Para os estudos de reciclagem da reação de conversão de CO_2 à formato, o sistema MagNP-APTS/FDH foi utilizado em pH 6.8 e 15°C , enquanto MagNP@ SiO_2 -APTS/FDH foi utilizado em pH 7.5 e 25°C , e para o sistema MagNP-APTS-Glioxil Agarose/FDH foi utilizado pH 6.8 e 35°C .

10.6 Estudos termodinâmicos

10.6.1 Sistemas com ADH

As medidas de K_M para o etanol foram feitas em tampão 0.1 molL^{-1} TRIS-HCl, pH 8.8, utilizando-se $100 \text{ }\mu\text{L}$ de NAD^+ (7.54 mmolL^{-1}) e variações de concentração de etanol de $1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ a 1 mmolL^{-1} a 25°C (para MagNP-APTS/ADH, MagNP@ SiO_2 -APTS/ADH) e 32°C (para a ADH livre e MagNP-Agarose/ADH). As determinações de $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$ foram realizadas a 20, 21, 22, 23 e 25°C e pH 8.8.

B_{max} , K_d e o potencial de ligação foram determinados por titulação fluorimétrica do complexo ternário ADH-Acetamida-NADH em pH 8.8 (tampão TRIS-HCl 0.1 molL^{-1}) na presença de acetamida (100 mL de uma solução 0.1 molL^{-1}), utilizando uma solução estoque de NADH 1.5 mM (adições correspondentes de 0 a 0.5 mmolL^{-1} de NADH adicionado). A fluorescência foi medida em 420 nm .

10.6.2 Sistemas com FalDH

As medidas de K_M foram realizadas em pH 6.8 (tampão fosfato 0.1 mol L^{-1}) e 32°C para a FalDH livre, pH 8.8 (tampão TRIS-HCl 0.1 mol L^{-1}) e 42°C para MagNP-APTS/FalDH, pH 7.5 (tampão TRIS-HCl 0.1 mol L^{-1}) e 32°C para MagNP@SiO₂-APTS/FalDH e pH 5.8 (tampão fosfato 0.1 mol L^{-1}) e 32°C para MagNP-APTS-Glioxil Agarose/FalDH. Utilizando $50 \text{ }\mu\text{L}$ de NAD^+ (0.9 m mol L^{-1}) e variações de concentrações de formaldeído de 0 a 50 m mol L^{-1} , a 32°C .

As determinações de $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$ foram realizadas a 20, 21, 22, 23 e 25°C e pH 6.8 para FalDH livre, pH 8.8 para MagNP-APTS/FalDH, pH 7.5 para MagNP@SiO₂-APTS/FalDH e pH 5.8 para MagNP-APTS-Glioxil Agarose/FalDH.

10.6.3 Sistemas com FDH

As medidas de K_M foram realizadas em tampão TRIS-HCl 0.1 mol L^{-1} , pH 7.5 utilizando $50 \text{ }\mu\text{L}$ de NAD^+ (0.9 m mol L^{-1}) e variações de formiato de sódio de 0 a 5 mmol L^{-1} , a 20°C .

As medidas de $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$ foram realizadas a 20, 21, 22, 23 e 25°C em pH 7.5.

10.6.3 Sistemas com GDH

As medidas de $S_{0.5}$ foram realizadas em tampão TRIS-HCl 0.1 mol L^{-1} , pH 7.5 utilizando $50 \text{ }\mu\text{L}$ de NAD^+ (0.9 m mol L^{-1}) e variações de concentração de glutamato de 0 a 5 mmol L^{-1} , a 25°C .

As medidas de $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$ foram realizadas a 20, 21, 22, 23 e 25°C em pH 7.5.

10.7 Análises de produtos das reações enzimáticas

10.7.1 Determinação do consumo de formaldeído

Para determinar a formação de formaldeído nos baseamos na reação de Nash, na qual o Reagente de Nash reage com o formaldeído formado, formando um éster de Hantzsch. Neste ensaio, adiciona-se 10 μL da reação em 50 μL de uma solução de reagente de Nash (9.7 molL^{-1}), completa-se o volume para 1 mL. Espera-se 10 minutos e então a absorbância em 410 nm é medida.

10.7.2 Determinação do consumo do glutamato

Para determinar o consumo de glutamato nos baseamos na reação entre a ninidrina e o glutamato. Para este ensaio, fez-se uma solução estoque de ninidrina em DMSO com concentração 8 mg/mL.

A 50 μL de sobrenadante da reação foram adicionados 200 μL da solução de ninidrina e 250 μL de tampão acetato 0.2 molL^{-1} . Incubou-se a 100°C por 15 minutos e então adicionou-se 300 μL de etanol. A concentração foi determinada a partir da absorbância do produto desta reação em 570 nm.

10.7.3 Determinação da formação de metanol

Para determinar a formação de metanol, adicionou-se o conteúdo da reação diretamente no cromatografo gasoso. Utilizou-se a rampa de 30°C com aquecimento a 2°C por minuto até 50°C , mantendo-se nesta temperatura por 2 minutos. O tempo de retenção do metanol está em 2.02 minutos.

10.8 Ensaios diversos

10.8.1 Ensaio Raman com AuNPs

Inicialmente, pesou-se 2 mg de partículas magnéticas recobertas com a molécula a ser analisada (aminoácido ou enzima). Estas partículas foram lavadas com 100 μL de tampão Tris-HCl 0.1 molL^{-1} , pH 8.8. À estas partículas, adicionou-se 1mL de AuNP ($\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$) e mediu-se o espectro Raman em uma cubeta.

10.8.1 Digestão trípica da GDH

A enzima GDH (livre ou imobilizada) foi lavada três vezes com tampão fosfato 0.1 molL^{-1} pH 7 contendo 0.1 molL^{-1} de EDTA. Deste conteúdo, separou-se em três microtubos diferentes com:

- a) 10 μL da GDH e 5 μL de tripsina (1mg/100 μL);
- b) 10 μL da GDH, 0.1 μL de ADP 0.1 molL^{-1} e 5 μL de tripsina (1mg/100 μL);
- c) 10 μL da GDH, 0.1 μL de GTP 0.1 molL^{-1} e 5 μL de tripsina (1mg/100 μL).

Incubou-se estes tubos a 25°C por 12 horas e analisou-se o conteúdo da digestão por MALDI-TOF.

“Nature does not work with an end in view”

Benedict De Spinoza, The Ethics

11. Resultados e Discussão

11.1 Das nanopartículas

As nanopartículas de magnetita funcionalizadas com aminopropiltietoxissilano foram caracterizadas por infravermelho, AFM (microscopia de força atômica), difração de raio-X e MFM (microscopia de força magnética). Na Figura 79 encontra-se o espectro infravermelho das nanopartículas de Fe_3O_4 (A), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (B) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-APTS}$ (C).

Figura 79. Espectro no infravermelho das nanopartículas de Fe_3O_4 nuas (preto, espectro A), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (vermelho, espectro B) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-APTS}$ (verde, espectro C).

No espectro no infravermelho das nanopartículas não silanizadas é possível observar a banda característica das nanopartículas de magnetita em 586 cm^{-1} e 629 cm^{-1} ,

estas bandas resultam de uma separação da banda ν_1 em 570 cm^{-1} , a qual corresponde a ligação Fe-O da magnetita bruta. Observou-se também de uma banda de absorção em 446 cm^{-1} , correspondente ao deslocamento da banda ν_2 do Fe-O da magnetita em 375 cm^{-1} para um número de onda maior.^{1 252}

Já no espectro das nanopartículas silanizadas, as bandas características das nanopartículas de magnetita não silanizadas estão deslocadas, sendo encontradas em 484 cm^{-1} , 783 cm^{-1} e 845 cm^{-1} por causa da interação silano – magnetita.²⁵² Observamos também, bandas adicionais em 1392 cm^{-1} , 1562 cm^{-1} e 1676 cm^{-1} características de estiramento C-N e das vibrações angulares simétricas N-H de amina primária, respectivamente.

Pela análise de raio-X de pó das nanopartículas magnéticas, Figura 80, verifica-se a presença dos planos 220, 311, 400, 422 e 440, característicos de magnetita. Através **$\kappa\lambda\beta\cos\theta$** Equação 3), calculou-se o tamanho das nanopartículas utilizando a altura média do plano mais intenso de reflexão (311). Obteve-se um tamanho médio de 38 nm.

$$\tau = \frac{\kappa\lambda}{\beta\cos\theta} \quad \text{Equação 3}$$

τ = tamanho médio dos domínios, κ = fator de forma, λ = comprimento de onda do raio x, β = largura da medida da altura média e θ = ângulo de Bragg.

Figura 80. Espectro de difração de raio-X de pó da MagNP-APTS.

As nanopartículas superparamagnéticas foram caracterizadas também por microscopia de força atômica. Abaixo, a Figura 81 mostra a imagem obtida de AFM e o gráfico ao lado mostra a distribuição de tamanho das partículas existentes nesta amostra, sendo que o diâmetro médio é de 58 nm. Para se obter estas imagens, depositou-se 5 μ L da solução contendo as nanopartículas sobre mica recém-clivada então deixou-se secar ao ar. As imagens foram obtidas por MAC Mode SFM usando MAClevers Tipo II com uma velocidade de 1 Hz e resolução de 256 pontos por linha.

Figura 81. Imagem de microscopia de força atômica (AFM) e o seu gráfico de distribuição de tamanho. O diâmetro médio obtido é de 58 nm.

Foi realizada também a imagem de microscopia de força magnética (MFM), das nanopartículas superparamagnéticas estando quimicamente ligadas a um substrato de ouro. A imagem obtida (Figura 82) mostra a imagem topográfica à esquerda e o contraste da imagem de microscopia de força magnética à direita. Indicando que as nanopartículas são magnéticas.

Figura 82. Imagem topográfica das nanopartículas magnéticas (esquerda) e o contraste da imagem de microscopia de força magnética.

Obteve-se também imagens de microscopia eletrônica de transmissão no laboratório do Prof. Dr. Pedro Kiyohara do Instituto de Física-USP (Figura 83), que mostram a formação das nanopartículas com um diâmetro médio de 12 nm. Como já explicado anteriormente, a amostra foi tratada com volumes diferentes de ácido acético glacial, observando-se que com um volume maior de ácido acético adicionado, as nanopartículas tornam-se mais protonadas e, portanto mais distanciadas umas das outras.

Figura 83. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de magnetita superparamagnéticas silanizadas.

Com as partículas em mãos, pôde-se partir para a imobilização enzimática.

11.2 Imobilização da ADH

Para a otimização da imobilização da álcool desidrogenase de *Sacharomyces cerevisiae* fez-se primeiramente os estudos de variação do tempo, quantidade de partícula adicionada e quantidade de agente acoplante adicionado (glutaraldeído ou agarose). Nesta primeira etapa, veremos os sistemas MagNP-APTS e MagNP@SiO₂-APTS juntos por se tratarem do mesmo método de imobilização.

11.2.1 Variação da quantidade de nanopartícula adicionada

O primeiro sobrenadante da imobilização foi medido pelo método de Bradford para a verificação da quantidade de enzima imobilizada por quantidade de nanopartículas magnética adicionada. Para a MagNP-APTS, na Figura 84 linha vermelha, há um máximo de ADH imobilizada em 8 mg de MagNP-APTS. Considerando-se que a massa molecular da ADH é de 141 KDa, calcula-se que $6,52 \times 10^{-9}$ mol de ADH foram imobilizados em $6,2 \times 10^{-9}$ mol de MagNP-APTS (Para um tamanho

médio de nanopartículas de 7 nm. $MM_{7nm}=1254552$), ou seja, uma ADH para cada nanopartícula. Aumentando-se a quantidade de nanopartícula adicionada ao sistema, não iremos aumentar a quantidade de enzima imobilizada, pois a razão ADH/MagNP-APTS só irá diminuir, o que pode acarretar em uma desestabilização da enzima.

Para a MagNP@SiO₂-APTS, Figura 84 linha preta, observamos que o máximo de imobilização ocorre em 8 mg de nanopartícula adicionada, imobilizando 0.75 mg de ADH. Esta quantidade também resulta na proporção de uma nanopartícula para cada enzima.

O sistema utilizando agarose como agente acoplante entre enzima e nanopartícula já partiu de uma quantidade fixa de MagNP-APTS, sendo esta quantidade de 8 mg. Este valor foi escolhido baseado na otimização para o sistema MagNP-APTS/ADH.

Figura 84. Relação entre a eficiência de imobilização da ADH (%) e a quantidade de partículas utilizadas na imobilização. Para MagNP-APTS (linha vermelha) e para MagNP@SiO₂-APTS (linha preta).

11.2.2 Variação da quantidade de glutaraldeído adicionado

A quantidade de glutaraldeído adicionado teve grande influência na imobilização, pois à medida que a concentração de glutaraldeído aumentava, a conversão de álcool a acetaldeído diminuía. Pode-se atribuir este resultado pelo aumento do acoplamento entre enzimas e entre partículas ao invés de ajudar na imobilização. Observando-se o resultado na Figura 85, escolheu-se utilizar a concentração de 0.2 mmolL^{-1} de glutaraldeído na imobilização tanto para MagNP-APTS quanto para MagNP@SiO₂-APTS.

Figura 85. Relação entre a conversão de etanol a acetaldeído com a quantidade de glutaraldeído utilizado na imobilização de ADH em MagNP-APTS (linha vermelha) e MagNP@SiO₂-APTS (linha preta).

11.2.3 Variação do tempo de imobilização

Estudou-se a influência do tempo de imobilização para os dois sistemas (MagNP-APTS e MagNP@SiO₂-APTS) utilizando glutaraldeído com concentração de 1 mmol L^{-1} . Observa-se na Figura 86 que para MagNP-APTS, 10 minutos de

imobilização são o suficiente para se obter a maior conversão de etanol a acetaldeído, enquanto o sistema MagNP@SiO₂-APTS necessita de uma hora de imobilização.

Figura 86. Relação entre o tempo de imobilização e a conversão do etanol a acetaldeído para MagNP-APTS (linha vermelha) e MagNP@SiO₂-APTS (linha preta).

11.2.4 Imobilização por múltiplos-pontos (MagNP-Agarose)

O terceiro sistema era composto de nanopartículas magnéticas recobertas com agarose e nós avaliamos a quantidade de agarose, de ácido sulfúrico e de MagNP-Agarose utilizada para se obter a melhor ADH imobilizada. Destes parâmetros, concluiu-se que 10 mg de agarose e 20 µL de H₂SO₄ são necessários para modificar 13 mg de MagNP-APTS de maneira eficiente e que desta reação de recobrimento, 200 µL de MagNP-Agarose suspensas em 600 µL de solução tampão (TRIS-HCl 0.1 molL⁻¹, pH 7.5) foram as melhores condições encontradas para se imobilizar a ADH e obter a melhor conversão de etanol a acetaldeído, como pode ser visto na Figura 87 A-C.

Figura 87. Relação entre (A) a quantidade de agarose utilizada na imobilização e a quantidade de ADH imobilizada (B) a quantidade de ácido sulfúrico utilizado e a quantidade de ADH imobilizada e (C) quantidade de MagNP-Agarose utilizada e a conversão de etanol a acetaldeído.

11.2.5 Caracterização dos sistemas

Para analisar os sistemas imobilizados devemos ter em mente que as interações eletrostáticas são de extrema importância para a estabilidade, características de ligação e função das proteínas. Sabe-se que as características eletrostáticas de uma proteína são determinadas por estados de ionização das cadeias laterais de seus aminoácidos e também pela interação de dipolos da cadeia principal.

Podemos analisar os sistemas imobilizados como se fossem mutações enzimáticas, pois a imobilização de certa maneira faz com que diversos aminoácidos da cadeia protéica interajam com um suporte, havendo mudanças conformacionais, enquanto as enzimas mutantes também têm de se reorganizar tridimensionalmente.

O efeito de uma mutação no valor de pK_a , por exemplo, diminui com o aumento da distância entre o sítio da mutação e o local onde se está medindo o pK_a . Resíduos em uma distância intermediária onde termos dependentes de $1/r^6$ são pequenos e os termos eletrostáticos ainda são os preferidos para mutações em que se quer realizar mudanças dependentes de carga.²⁵³

A diferença entre imobilização e a mutação é que na mutação nós temos pleno controle da região em que estamos modificando, enquanto em uma imobilização, este controle é praticamente impossível; porém, a imobilização faz uma mudança estrutural coletiva que juntas podem ser mais eficientes para a obtenção de uma melhora da atividade e seletividade enzimática.

A perturbação das características naturais das enzimas devido à estas “mutações por imobilização” são tipicamente obtidas pela combinação de efeitos de dessolvatação e interações fortemente eletrostáticas com os resíduos vizinhos.

11.2.5.1 Espectroscopia no Infravermelho

O espectro no infravermelho na Figura 88, apresenta bandas de amida I (A) da ADH (espectro I) em todos os sistemas imobilizados (II, III e IV). Esta banda na ADH livre exhibe três mínimos de transmitância situados em 1670 cm^{-1} , devido às folhas β , em 1658 cm^{-1} devido às α -hélices e em 1637 cm^{-1} correspondendo à estrutura secundária não repetitiva. Os sistemas imobilizados são mais difíceis de atribuir, porém, a MagNP-APTS/ADH não apresenta uma diferença muito grande destas bandas. O sistema

MagNP@SiO₂-APTS/ADH apresenta um aumento de estruturas α -hélice, enquanto MagNP-Agarose/ADH apresenta mínimos de transmitância em 1636 e 1617 cm⁻¹, devido a folhas β intra e inter moleculares, respectivamente.

A banda de amida II (C) é encontrada em 1547 cm⁻¹ na ADH livre, enquanto nos sistemas imobilizados, esta banda não pôde ser atribuída. A banda D em 1162 cm⁻¹ é provavelmente devido ao estiramento do NH₃⁺ da lisina, podendo ser observada em todos os sistemas imobilizados, com maior intensidade para MagNP-APTS/ADH.

Figura 88. Espectro no infravermelho para ADH (I), MagNP-APTS/ADH (II), MagNP@SiO₂-APTS/ADH (III) e MagNP-Agarose/ADH (IV).

Verifica-se desta forma que cada suporte apresenta uma maneira distinta de estabilizar a ADH em sua superfície, acarretando algumas mudanças estruturais, como observada para MagNP-APTS/ADH e MagNP-Agarose/ADH.

11.2.5.2 Espectrofotometria de fluorescência

As proteínas contêm diversos aminoácidos, dentre eles, a tirosina, o triptofano e a fenilalanina são os responsáveis pela absorção protéica e também pela emissão. Destes aminoácidos, o triptofano exibe uma maior fluorescência, portanto quase toda fluorescência observada de uma proteína se dá pela sua emissão.

O triptofano não é um aminoácido muito comum, e por tanto ser raro, como por fluorescer, pode nos indicar alguma mudança estrutural da proteína de acordo com o microambiente ao seu redor.²⁵⁴

A fluorescência do triptofano pode ser extinta quando este se encontra próximo a aminoácidos protonados, como asparagina e glutamina ou devido à transferência de energia devido à ressonância Föster.

Quando o triptofano se torna mais exposto, há uma mudança para o vermelho e quando ele se torna mais interno, uma mudança para o azul ocorre na fluorescência. Assim, podemos identificar mudanças estruturais em proteínas utilizando a fluorescência. A enzima álcool desidrogenase de *Sacharomyces cerevisiae* possui cinco triptofanos por subunidade, como pode ser visto na Figura 89 em vermelho.

Figura 89. Estrutura da enzima Álcool Desidrogenase de *Sacharomyces cerevisiae* (PDB 2HCY). Em vermelho estão indicados os triptofanos e em azul, os sítios ativos.

Sabendo-se disto, analisou-se a fluorescência da ADH livre e imobilizada. A

Figura 90 mostra estes espectros de fluorescência.

Figura 90. Espectros de fluorescência da ADH livre (linha preta), MagNP-APTS/ADH (linha vermelha), MagNP@SiO₂-APTS/ADH (linha verde) e MagNP-Agarose/ADH (linha azul).

Analisando-se os espectros, vê-se que a ADH livre apresenta um máximo de emissão em 327 nm e que todos os métodos de imobilização causaram um deslocamento da fluorescência na direção do vermelho, em menor ou maior extensão. O método que se parece mais com o espectro da ADH livre é o da MagNP-Agarose/ADH, com o seu máximo de emissão em 336 nm.

A MagNP-APTS/ADH apresenta um máximo de emissão em 334 nm e a MagNP@SiO₂-APTS/ADH não apresenta fluorescência de triptofano. O que é possível observar, é que com a imobilização há o surgimento de uma banda em 442 nm no espectro de fluorescência, sendo caracterizado como fosforescência de triptofano. Neste caso, o sistema MagNP@SiO₂-APTS/ADH apresenta a maior intensidade de fosforescência de triptofano. Para efeito de comparação, verificou-se que a enzima álcool desidrogenase de fígado de cavalo é conhecida por exibir fosforescência do triptofano 314²⁵⁵ quando está na conformação fechada²⁵⁶. Ao sobrepor os as

estruturas das enzimas ADH de fígado de cavalo e de *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo 88) verifica-se que o único triptofano da ADH de levedura que pode exibir fosforescência é o W₁₇₂, pois está em uma folha beta perto centro da estrutura terciária enzimática. Propomos desta maneira, que a imobilização em MagNP@SiO₂-APTS faz com que este triptofano seja inserido na parte interna da proteína, de maneira a favorecer a sua fosforescência, já que a fosforescência de triptofano a temperatura ambiente ocorre apenas em ambientes rígidos.

11.2.5.3 Raman

Já foi descrito que as nanopartículas de ouro podem interagir com moléculas, aumentando o sinal de espalhamento Raman, o que se chama de SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) e, portanto, resolveu-se imobilizar aminoácidos em nanopartículas magnéticas com a mesma metodologia utilizada para a imobilização da enzima ADH e então, interagir com nanopartículas de ouro, para “vermos” como os aminoácidos estão na superfície da nanopartícula magnética. Isso nos ajudaria a distinguir aminoácidos pelos quais a enzima ADH está se ligando às nanopartículas magnéticas. A melhor analogia para este experimento é a de que as nanopartículas de ouro se comportam como “observadoras” de uma pessoa utilizando uma roupa, a roupa no caso seriam as enzimas e a pessoa, as nanopartículas magnéticas: o observador só é capaz de enxergar o exterior da roupa e por exclusão, pode-se dizer por que lado a pessoa está utilizando a roupa.

Na Figura 91 estão os espectros Raman da MagNP-APTS/Aminoácido- AuNP e para MagNP-APTS/ADH-AuNP. Verifica-se que há uma semelhança entre o espectro da MagNP-APTS/ADH com o espectro da iso-leucina, sugerindo a disponibilidade desse aminoácido na superfície, próximo do ponto de ancoramento da nanopartícula de

ouro. Já para os sistemas MagNP@SiO₂-APTS/ADH e MagNP-Agarose/ADH observa-se bandas características de triptofano (Figura 92) e iso-leucina (Figura 93), respectivamente.

Figura 91. Espectros SERS de aminoácidos imobilizados na MagNP-APTS com relação ao espectro SERS da MagNP -APTS/ADH (a). Representação esquemática das iso-leucinas na estrutura da ADH (b) e espectro SERS da isoleucina imobilizada em MagNP-APTS comparado com o da MagNP -APTS/ADH (c).

Figura 92. Espectros SERS de aminoácidos imobilizados na MagNP@SiO₂-APTS com relação ao espectro SERS da MagNP@SiO₂-APTS/ADH (a). Representação esquemática dos triptofanos na estrutura da ADH (b) e espectro SERS do triptofano imobilizado em MagNP@SiO₂-APTS comparado com o da MagNP@SiO₂-APTS/ADH (c).

Figura 93. Espectros SERS de aminoácidos imobilizados na MagNP-Agarose com relação ao espectro SERS da MagNP-Agarose/ADH (a). Representação esquemática das iso-leucinas na estrutura da ADH (b) e espectro SERS da isoleucina imobilizada em MagNP-Agarose comparado com o da MagNP-Agarose/ADH (c).

11.2.5.4 Microscopia de Força Atômica

Fez-se também uma caracterização por microscopia de força atômica dos sistemas imobilizados. Após a secagem sobre mica, é possível observar que houve a formação de clusters de aproximadamente 1 μm nas imagens de topografia (Figura 94 a Figura 96 A). Pelas imagens de contraste de fase (Figura 94 a Figura 96 B) foi possível detectar variações das propriedades elásticas abrangendo diversos níveis de dissipação de energia interna associados com o amortecimento viscoso e com a energia de histerese de adesão.²⁵⁷ No sistema MagNP-APTS/ADH (Figura 94B) há um centro composto de um material que lembra a elasticidade de enzimas, com clusters menores e mais duros ao seu redor.

Figura 94. Microscopia de Força Atômica do sistema MagNP-APTS/ADH. Topografia (A), Contraste de fase (B).

Figura 95. Microscopia de Força Atômica do sistema MagNP@SiO₂-APTS/ADH. Topografia (A), Contraste de fase (B).

O sistema MagNP-Agarose/ADH (Figura 96) apresenta as mesmas características de MagNP-APTS/ADH porém com uma melhor homogeneidade dos clusters duros. O sistema mais intrigante é o da MagNP@SiO₂-APTS/ADH em que não conseguimos observar um contraste de fase (Figura 95B), sugerindo que as partículas magnéticas estão dentro de um cluster de enzimas, como se tivessem sido recobertas pela ADH.

Figura 96. Microscopia de Força Atômica do sistema MagNP-Agarose/ADH. Topografia (A), Contraste de fase (B).

11.2.5.5 ADH e catálise

A enzima álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* possui em seu sítio ativo um átomo de zinco complexado por uma molécula de água e pelos resíduos His₆₆, Cys₁₅₃ e Cys₄₃ como indicado na Figura 98. A reação de oxidação inicia com a complexação do álcool pelo zinco no sítio ativo, que por sua vez é estabilizado por pontes de hidrogênio com a Thr₄₅, a qual faz ponte de hidrogênio com o NAD⁺ de maneira a realizar a reação redox de alcoóis e aldeídos como mostrado na Figura 97.²⁵⁸

Figura 97. Esquema da reação de catálise da enzima álcool desidrogenase.

Este mecanismo em que um resíduo da enzima está envolvido na transferência de hidrogênio foi amplamente discutido na década de 60 em que se pensava que um resíduo de triptofano estava envolvido no mecanismo de transferência de hidrogênio.²⁵⁹⁻²⁶¹ Estudos com complexos ternários contendo inibidores enzimáticos indicaram que ou não existe algum grupo da enzima participando na transferência de hidrogênio ou se

está, o mesmo hidrogênio que reduz a enzima numa primeira etapa, seria transferido para a coenzima numa segunda etapa.²⁶² Outro indicativo de que durante a transferência de hidrogênio não é necessária a protonação específica de um grupo da proteína é o fato dos efeitos isotópicos diminuir juntamente com o decaimento de V e V/K acima de pH 8.²⁶³

Figura 98. Sítio ativo da enzima ADH de *Saccharomyces cerevisiae*.

Sabendo-se do mecanismo catalítico, podemos avaliar a influência do pH e da temperatura na catálise antes e após a imobilização.

11.2.5.5.1 Influência do pH na catálise

As enzimas possuem o seu pH ótimo de reação, porém, quando imobilizadas, não se sabe se o pH ótimo se mantém o mesmo, devido às pequenas mudanças estruturais. Desta forma, variou-se o pH reacional, para avaliar o pH ótimo de reação da

ADH imobilizada em nanopartículas magnéticas pelos diferentes métodos tanto para conversão de etanol a acetaldeído (Figura 99 A) quanto para a conversão de formaldeído a metanol (Figura 99 B).

Figura 99. Variação do pH da reação com relação à conversão de etanol a acetaldeído (A) e à conversão de formaldeído a metanol (B) para ADH livre (linha preta), MagNP-APTS/ADH (linha vermelha), MagNP@SiO₂-APTS/ADH (linha azul) e MagNP-APTS-Agarose (linha verde).

Verifica-se pela equação da Figura 97 que a reação de conversão do etanol em acetaldeído é favorecida em pHs básicos, o que é exatamente o que observamos para a ADH livre na Figura 99, a qual apresenta um máximo de conversão bem definido em pH 8.8. Verifica-se também, que todos os sistemas imobilizados apresentam o pH ótimo em 8.8, porém, o que os diferencia é a sensibilidade quanto ao pH, já que para pHs abaixo 8.8, quando comparados com a ADH livre, o sistema MagNP-APTS/ADH apresenta uma leve estabilização e a MagNP@SiO₂-APTS/ADH exibe uma conversão excelente, mostrando pouca influência do pH em sua catálise. O sistema MagNP-APTS-agarose/ADH também apresenta uma maior estabilidade com relação à ADH livre e à MagNP-APTS/ADH, porém, menor que para o sistema MagNP@SiO₂-APTS/ADH. Este efeito de estabilização quanto ao pH pode ser resultado de mudanças conformacionais devido à imobilização, diminuindo a acessibilidade dos íons H⁺ ao

sítio ativo.^{264 265} Outra explicação pode ser a mudança do pK que controla a reação na direção da oxidação do álcool.²⁶⁶

Outra maneira de verificar se a mudança conformacional após a imobilização gerou um pK diferente é estudar a influência do pH na reação inversa. Desta forma, para a reação de conversão de formaldeído à metanol, espera-se que pHs mais baixos a favoreçam. Como esperado, a ADH livre apresenta o seu pH ótimo em pH 5.8, juntamente com a MagNP-APTS/ADH. A MagNP@SiO₂-APTS/ADH é o sistema que apresenta a maior variação do pH ótimo, apresentando o máximo de conversão em pH 7.5, enquanto a MagNP-APTS/Agarose/ADH possui pH ótimo em 6.8. Estes resultados indicam que a mudança conformacional sofrida pela ADH após a imobilização foi considerável, já que apresenta grandes diferenças quanto ao pH ótimo e sensibilidade à íons H⁺.

Em outros estudos, perturbações no pKa da água ligada ao Zn²⁺ foram observados após a ligação da coenzima na enzima (pKa varia de 9.2 a 7.6 após a ligação) e a extensão destas perturbações é sensível à distância entre a carga positiva estabilizante na forma oxidada da coenzima, NAD⁺, e a carga negativa do alcóxido²⁶⁷ devido aos efeitos de campo ligante de esfera interna.²⁶⁸ Se com a imobilização tiver um aumento do volume por detrás do anel de nicotinamida da coenzima, pode ser que haja uma diminuição do pKa que controla a catálise.²⁶⁷

11.2.5.5.2 Influência da temperatura na catálise

Em temperaturas baixas (20-27°C, Figura 100), o método de imobilização via glutaraldeído resulta em conversões de etanol à acetaldeído maiores (de 82 a 90%). Porém, o sistema MagNP-APTS/Agarose/ADH obtém conversões catalíticas ao redor de 92% em temperaturas entre 32 e 43°C, sendo melhor que os outros sistemas. Este

resultado pode estar associado com uma rigidificação da ADH na MagNP-APTS/Agarose, fazendo com que ela sofra menor influência da temperatura na catálise após a imobilização.

Já para a reação de conversão de formaldeído à metanol, observa-se que a ADH livre apresenta dois máximos de conversão : um em 32°C e outro em 42°C, enquanto a MagNP-APTS/ADH e a MagNP-APTS/Agarose/ADH apresentam conversões melhores em temperaturas baixas (20-30°C), com 100% e 60% de conversão, respectivamente. Já o sistema MagNP@SiO₂-APTS/ADH, assim como a enzima livre, também apresenta dois máximos, cada um com aproximadamente 95% de conversão, estando situados em 25°C e 35°C.

A teoria de rigidificação enzimática na MagNP-APTS/Agarose/ADH não se sustenta quando se compara as duas reações catalíticas (direta e inversa), pois ao invés de se manter estável em temperaturas altas, ela perde toda a sua atividade acima de 35°C. Assim, acredita-se que outros fatores estão influenciando a estabilidade enzimática quanto à temperatura e mais estudos dos sistemas enzimáticos devem ser realizados para a compreensão destes sistemas.

Figura 100. Relação entre a conversão catalítica de etanol à acetaldeído com a temperatura de reação para ADH livre (◇), MagNP-APTS/ADH (○), MagNP@SiO₂-APTS/ADH (□) e MagNP-Agarose/ADH (△).

11.2.5.5.3 Reciclagem

Partiu-se então para uma reciclagem da enzima imobilizada. A Figura 101A mostra que o sistema MagNP-APTS/ADH possui elevada atividade apenas nas duas primeiras reações de conversão de etanol à acetaldeído, quando então, a atividade inicia a sua queda para níveis em torno de 40% de conversão. O sistema MagNP@SiO₂-APTS/ADH apresenta uma conversão em torno de 90% estável ao longo das reações. Pode-se utilizá-la por até 10 vezes sem que se observe uma queda na conversão catalítica. O sistema MagNP-APTS/Agarose/ADH apresenta conversões entre 50%, permanecendo ativa em todos os 10 ciclos catalíticos.

Já para a conversão de formaldeído à metanol, Figura 101B, o sistema MagNP-APTS/ADH é estável apenas na primeira reação, sendo completamente inativada na terceira reação. O sistema MagNP@SiO₂-APTS/ADH possui elevada atividade enzimática no primeiro ciclo de reação, decaindo o valor de conversão enzimática para 20 % já no segundo ciclo. Aparentemente, a MagNP@SiO₂-APTS/ADH precisa de um tempo para voltar a ser ativa, já que no sexto ciclo catalítico, há um aumento considerável da conversão catalítica para 60 %, o qual decai novamente no sétimo ciclo.

Figura 101. Estudo de reciclagem dos sistemas imobilizados da ADH: MagNP-APTS/ADH (rosa), MagNP@SiO₂-APTS/ADH (azul) e MagNP-APTS/Agarose/ADH (amarelo) na: (A) reação de etanol à acetaldeído e (B) reação de formaldeído à metanol.

O sistema MagNP-APTS/Agarose/ADH tem uma atividade e estabilidade muito baixa para a reação de conversão de formaldeído à metanol, como pode ser visto na Figura 101.

11.2.5.6 Aspectos termodinâmicos

Uma maneira de tentar entender como que está a estrutura terciária da enzima na superfície das partículas magnéticas é através do estudo dos aspectos termodinâmicos dos sistemas. Sabe-se que complexos ternários entre enzima, NADH e um terceiro ligante são altamente fluorescentes e podem oferecer ajuda para a descoberta da quantidade de sítios ativos em enzimas.²⁶⁹

O terceiro ligante no caso da álcool desidrogenase foi a acetamida, pois se assemelha com o etanol, substrato de maior interação com a ADH de *Sacharomyces cerevisiae*. Fez-se então uma titulação observando o aumento da fluorescência até que houvesse a saturação da enzima, como mostrado na Figura 102.

Figura 102. Gráfico de intensidade de fluorescência do complexo ternário NADH-ADH-Acetamida com o aumento da concentração de NADH. Linha Preta (◇) ADH livre, linha verde

(○) MagNP-APTS/ADH, linha azul (▽) MagNP@SiO₂-APTS/ADH e linha vermelha (□), MagNP-APTS/Agarose/ADH.

Dos gráficos da Figura 102 observa-se que apenas a ADH livre apresenta um perfil hiperbólico, enquanto os sistemas imobilizados possuem uma constante cinética associada a este processo de formação do complexo ternário, por isto, para a ADH imobilizada vê-se um gráfico em S.

Esta componente cinética é a velocidade de associação do NADH à enzima imobilizada, provavelmente devido a um tempo de indução. Analisou-se, portanto o tempo necessário para atingir a fluorescência máxima e observou-se que para MagNP-APTS/ADH e MagNP@SiO₂-APTS/ADH são necessários 30 minutos, enquanto para MagNP-Agarose/ADH são necessários 15 minutos.

Pela inclinação da reta de um gráfico Lineweaver-Burk²⁷⁰ pôde-se determinar a constante de dissociação ADH-NADH e os potenciais de ligação da ADH livre e delas imobilizadas. Os valores obtidos podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação entre as constantes de dissociação, constante de Michaelis-Menten e o potencial de ligação dos diferentes sistemas com a ADH livre.

	B _{max}	K _d (μM)	Potencial de ligação	K _M (mM)
ADH livre	65	25.4	2.6	3.09
MagNP-APTS/ADH	84	75.4	1.1	0.6
MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH	191	279.9	0.7	0.68
MagNP-Agarose/ADH	77	110	1.3	0.95

A constante de dissociação aumenta com a imobilização e com isso o potencial de ligação diminui pela metade. Para o sistema MagNP@SiO₂-APTS/ADH a K_d é 10 vezes maior quando comparada com a ADH livre. A constante de dissociação de enzimas diz o quão forte é a ligação entre a enzima (E) e o substrato (S): quanto menor

é a constante, mais forte é a interação E-S. Para um mesmo sistema, a interação pode variar significativamente com as condições da solução, como temperatura, pH e força iônica.

Os valores de K_d obtidos indicam que grandes quantidades de NADH são necessárias para saturar a ADH na ausência de acetamida, já que sem a acetamida é impossível titular a ADH com NADH. O aumento da constante de dissociação pode ser devido à contração do sitio de ligação do NADH por causa da imobilização de uma consequente expulsão de águas essenciais para o reconhecimento do cofator.

Os valores de K_M mostrados na Tabela 8 foram calculados a partir de gráficos do tipo Michaelis-Menten, variando-se a concentração de etanol adicionado à reação com relação à velocidade reacional. Com a imobilização o K_M diminuiu, o que significa que menores concentrações de substrato são necessárias para a obtenção da velocidade máxima de reação, sendo estes valores similares para MagNP-APTS/ADH e MagNP@SiO₂-APTS/ADH (0.6mmolL^{-1}) e um pouco maior para MagNP-Agarose/ADH (0.95mmolL^{-1}).

Com relação à variação de temperatura fez-se um gráfico de Arrhenius, sendo a abscissa igual a $-E_a/R$ (gráficos em anexo – anexo 89). Desta maneira, encontrou-se a energia de ativação tanto para a ADH livre quanto para ela imobilizada. Verificou-se que para que a reação catalítica de conversão do etanol à acetaldeído ocorra, houve uma diminuição da energia de ativação significativa com a imobilização. Esta diminuição foi maior para MagNP-APTS/ADH, o que está de acordo com as maiores conversões encontradas para este sistema.

Semelhante à equação de Arrhenius ($k = A e^{-E_a/RT}$)

Equação 4 4), Eyring escreveu uma equação teórica baseada no estado de transição (Equação 5) para soluções. A difusão térmica e o fluxo de energia devido a um

gradiente de potencial químico são descritos por Eyring. Ao se fazer uma analogia entre as equações de Arrhenius e Eyring chega-se a conclusão que a energia de ativação (E_a de Arrhenius) é equivalente a variação de entalpia do estado de transição ($\Delta H^\ddagger$ de Eyring).²⁷¹

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad \text{Equação 4}$$

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta H^\ddagger/RT} e^{\Delta S^\ddagger/R} \quad \text{Equação 5}$$

Experimentalmente foi obtida a energia de ativação para a conversão catalítica de etanol à acetaldeído pela ADH livre e imobilizada. Com este resultado, pôde-se avaliar a extensão da mobilidade enzimática ao utilizar o valor de E_a Equação 5.

Podemos dizer que a entropia de dessolvatação da enzima está diretamente relacionada à mobilidade enzimática, pois durante a ligação de um substrato em uma enzima, existem mudanças conformacionais. Antes da ligação acontecer, a enzima se encontra na forma aberta, permitindo o acesso do substrato ao sítio ativo, enquanto que na presença do substrato a conformação fechada é favorecida. Nesta conformação, o solvente é deslocado, permitindo uma nova conformação dos grupos catalíticos ao redor do substrato para uma catálise eficiente.¹⁶⁶

Desta forma, quanto maior o valor de ΔS de transição, maior a mobilidade enzimática. Na Tabela 9 estão mostrados os valores calculados pela equação de Eyring, verificando-se que a maior mobilidade está para a MagNP-APTS/Agarose/ADH, seguida de MagNP@SiO₂-APTS/ADH e MagNP-APTS/ADH e por fim a ADH livre.

Tabela 9. Comparação entre a energia de ativação e a entropia do estado de transição dos diferentes sistemas da ADH.

	$\Delta H^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
Free ADH	57.9	28
MagNP-APTS/ADH	82.7	170
MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH	108.5	257
MagNP-Agarose/ADH	131.2	326

Esta ordem de mobilidade encontrada nos surpreende, pois com a imobilização, a enzima álcool desidrogenase se tornou mais móvel, o que talvez explique a menor conversão catalítica dos sistemas imobilizados em temperaturas elevadas (de 30 a 45°C) quando comparados com a ADH livre.

11.3 Imobilização da FDH

A imobilização da enzima formato desidrogenase de *Candida boidinii* (FDH) foi feita de maneira a entendermos os parâmetros relevantes de uma imobilização para a melhora de rendimento e reciclagem da FDH. Encontrou-se o melhor método de imobilização para cada tipo de suporte após uma série de otimizações.

11.3.1 Variação da quantidade de nanopartícula adicionada

Dentre as otimizações realizadas, foi feita a variação da quantidade de suporte magnético empregado na imobilização. Mantendo-se a concentração de glutaraldeído em 0.2 molL⁻¹ e 5 minutos de imobilização, observou-se que 0.5 mg de FDH é imobilizada por 8 mg e 16 mg de MagNP-APTS, porém, a conversão catalítica aumentou por um fator de 2 quando 16 mg de MagNP-APTS foi utilizado (Figura 103). A proporção FDH:MagNP-APTS (mol:mol) é de 2:1 e 1:1, respectivamente, portanto, a

proporção de 1:1, assim como encontrado para a ADH, é a melhor, pois obtém-se um sistema mais estável.

Figura 103. Relação entre a quantidade de MagNP-APTS utilizada na imobilização e a quantidade de FDH imobilizada (linha vermelha) e com a conversão de formato a CO_2 (linha preta).

Para o sistema utilizando MagNP@ SiO_2 -APTS, foi observado um aumento gradual na conversão catalítica com o aumento da quantidade de suporte utilizado até um máximo de 13 mg (proporção FDH:MagNP@ SiO_2 -APTS, 1:1), sendo que após este ponto, a conversão de formato a CO_2 decaiu, como pode ser visto na Figura 104.

Figura 104. Relação entre a quantidade de MagNP@ SiO_2 -APTS utilizada na imobilização e a conversão de formato a CO_2 .

11.3.2 Variação da quantidade de agente acoplante

Mantendo-se a concentração de MagNP-APTS em 16 mg/mL, variou-se a quantidade de glutaraldeído utilizado na imobilização. O que pôde ser observado é que a enzima imobilizada teve a sua atividade catalítica diminuída a medida que a concentração de glutaraldeído aumentava (Figura 105). Desta forma, escolheu-se a concentração de 1.5×10^{-5} mol de glutaraldeído por apresentar os melhores resultados.

Figura 105. Efeito da quantidade de glutaraldeído utilizada na conversão catalítica de formato a CO_2 .

A quantidade de glutaraldeído adicionada ao sistema MagNP@SiO₂-APTS/FDH foi estudada em dois tempos de imobilização diferentes : 2 minutos e 10 minutos. Isto foi realizado, pois foram encontrados dois tempos ótimos de imobilização (Figura 108). Pode-se ver na Figura 106 que para o tempo de imobilização igual a dois minutos, a adição crescente de glutaraldeído teve um efeito negativo na atividade catalítica da FDH obtida, provavelmente devido ao fato deste tempo ser devido a adsorção da FDH na superfície das partículas e não da quimiosorção. Já para o tempo de 10 minutos

encontrou-se uma concentração ótima de glutaraldeído adicionado ($5\mu\text{ mol}$), correspondendo à melhor conversão catalítica, o que também sugere uma interação mais forte entre suporte e enzima.

Figura 106. Efeito da quantidade de glutaraldeído adicionada na conversão catalítica para 2 minutos (linha vermelha) e 10 minutos de imobilização (linha preta).

11.3.3 Variação do tempo de imobilização

O aumento do tempo de imobilização do sistema MagNP-APTS/FDH acarretou em uma melhora dos rendimentos obtidos para a conversão de formato à CO_2 , encontrando um máximo com 1 hora de imobilização (80 % de conversão catalítica), como mostrado na Figura 107. Observa-se também que após este período, a atividade enzimática decaiu drasticamente.

Como dito anteriormente, para o sistema MagNP@ SiO_2 -APTS/FDH foram observados dois picos máximos de conversão catalítica com relação ao tempo de imobilização (Figura 108), um em 2 minutos e outro em 10 minutos. Escolheu-se 10 minutos de imobilização devido à formação de uma ligação mais forte entre a enzima e o suporte, como já mostrado no item 11.3.2.

Figura 107. Relação entre o tempo de imobilização e a conversão catalítica do sistema MagNP-APTS/FDH.

Figura 108. Influência do tempo de imobilização do sistema MagNP@SiO₂-APTS/FDH na conversão catalítica de formato a CO₂.

A enzima formato desidrogenase quando imobilizada no suporte MagNP-APTS/Glioxil-Agarose apresentou um decaimento na conversão catalítica com o aumento do tempo de imobilização como pode ser visto na Figura 109. Por esta razão,

optou-se por adotar como protocolo uma mistura rápida dos dois componentes. Este pequeno período de imobilização aparentemente é suficiente para que haja a ligação entre enzima e suporte sem produzir efeitos negativos na conformação enzimática.

Figura 109. Influência do tempo de imobilização do sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH na conversão catalítica.

11.3.4 Variação da quantidade de MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH utilizada na catálise

Como a suspensão obtida apresentou excelente conversão catalítica, optou-se por encontrar a melhor quantidade de MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH para obter-se a melhor conversão catalítica. O volume total da suspensão obtida foi de 0.6 mL. Observou-se que com o aumento da concentração de MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH na mistura reacional havia um aumento da conversão catalítica até o máximo de 94% para 200 μ L de MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH, como pode ser visto na Figura 110.

Figura 110. Influência da quantidade de MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH utilizada na conversão catalítica.

11.3.5 Caracterização dos sistemas

Após a otimização dos protocolos de imobilização foram feitas caracterizações dos sistemas MagNP-APTS/FDH, MagNP@SiO₂-APTS/FDH e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH.

11.3.5.1 Microscopia de Força Atômica

A morfologia dos filmes foi analisada por Microscopia de Força Atômica (AFM) para verificar a homogeneidade e o tamanho dos grãos obtidos. Após a secagem sobre mica, a imagem de contraste de fase do sistema MagNP-APTS/FDH (Figura 111) revela a formação de aglomerados de aproximadamente 0.5-2 μm compreendendo pequenos clusters inorgânicos ancorados em um aglomerado de enzima.

Figura 111. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP-APTS/FDH: (A) imagem topográfica e (B) imagem de contraste de fase.

Já o sistema MagNP@SiO₂-APTS apresenta em sua imagem de contraste de fase (Figura 112) um aglomerado de enzima e partículas magnéticas praticamente sem contraste de fase ao redor deste aglomerado.

Figura 112. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP@SiO₂-APTS/FDH: (A) imagem topográfica e (B) imagem de contraste de fase.

No caso do sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH, apesar da imagem de contraste de fase mostrar algumas partículas expostas na superfície (Figura 113), a maioria delas se encontra no interior de um recobrimento de agarose e enzima.

Figura 113. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH: (A) imagem topográfica e (B) imagem de contraste de fase.

11.3.5.2 Aspectos termodinâmicos

Valores de energia de ativação e entropia de ativação foram obtidos para os sistemas enzima/nanopartícula e para a enzima livre de maneira a nos guiar nas características principais dos novos sistemas obtidos para entendermos mais a fundo a influência da imobilização na atividade enzimática. Como mostrado na Tabela 10, a maior atividade encontrada para MagNP-APTS/FDH está acompanhada da diminuição pela metade da constante de Michaelis-Menten. O decaimento da energia de ativação reflete uma influencia positiva no sítio ativo, porém isto é mais do que compensado pelo decaimento da entropia de ativação, implicando em uma estrutura mais organizada e rígida. Avaliando-se os valores de todos os sistemas imobilizados, acredita-se que o sistema MagNP-APTS/FDH é o que possui a melhor relação $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$. Para o sistema

MagNP@SiO₂-APTS/FDH a menor energia de ativação é compensada pelo aumento do K_M , enquanto para a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH todos os fatos são menos favoráveis quando comparados com a FDH livre.

Tabela 10. Diferença entre os K_M , $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$ da FDH livre e imobilizada.

	Atividade (U) ^a	K_M (mM) ^b	$\Delta H^\ddagger$ ^c	$\Delta S^\ddagger$ ^d
FDH livre	5	6	13	-78
MagNP-APTS/FDH	4	3	8.6	-104
MagNP@SiO₂-APTS/FDH	12	20	5.9	-115
MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH	6	9	21	-120

a) 27°C, pH 7.5 b) 20°C, tampão Tris-HCl (0.1 M pH 7.5), 5 μ L de NAD⁺ (0.9 mM) e 40 mM de formato; c) kJ mol⁻¹; d) J mol⁻¹ K⁻¹.

11.3.5.3 Estabilidade térmica

Como maneira de verificar a estabilidade enzimática, os sistemas foram incubados por até 1 hora a 60°C e pH 7.5. Durante este período, alíquotas foram retiradas de tempos em tempos para a avaliação de sua atividade. O resultado desta análise pode ser visto na Figura 114. A inclinação da reta para a FDH livre e para a MagNP@SiO₂-APTS/FDH foram similares (-0.023 min⁻¹), enquanto a MagNP-APTS/FDH apresentou uma inclinação menor (-0.020 min⁻¹) indicando um aumento da estabilidade da FDH. Para o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH a inclinação da reta teve o valor de -0.086 min⁻¹, encontrando-se completamente inativa após 20 minutos de incubação.

Figura 114. Inativação enzimática a 60°C e pH 7.5 para FDH livre (○), MagNP-APTS/FDH (□), MagNP@SiO₂-APTS/FDH (△) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH (▽).

11.3.6 FDH e catálise

A conversão de gás carbônico em formato nos sistemas biológicos é tipicamente realizada pela enzima NADH dependente chamada formato desidrogenase (FDH). Esta enzima também é utilizada em estudos catalíticos envolvendo a transferência de hidreto, devido à simplicidade de seu substrato. Nesta parte do estudo, verificou-se a influência do pH e da temperatura na catálise da FDH livre e imobilizada.

11.3.6.1 Variação do pH

Para encontrarmos o pH ótimo da reação de conversão de formato à CO₂ (Figura 115A) fez-se um estudo da catálise enzimática em diferentes pHs. Verificou-se que a FDH livre apresenta uma atividade praticamente constante em 40% de conversão catalítica entre os pHs 5.8 e 8.8. No caso da MagNP@SiO₂-APTS/FDH o pH ótimo está bem definido em 7.5 com 90 % de conversão catalítica, enquanto a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH apresenta uma atividade constante entre os pHs 5.8 e 8.8 próxima a 20% de conversão catalítica. O sistema MagNP-APTS/FDH exibe uma

atividade catalítica praticamente nula em pHs baixos e aumenta consideravelmente após o pH 7.5, chegando a 90% de conversão catalítica no pH 9.8.

A reação inversa, de gás carbônico a formato, também foi analisada quanto a influência do pH (Figura 115B), encontrando-se para a FDH livre um pH ótimo em 8.8 com 3% de conversão catalítica, enquanto a MagNP-APTS/FDH e a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH apresentam um perfil similar, com um pH ótimo em 6.8 e conversões de 9% e 5%, respectivamente. O sistema MagNP@SiO₂-APTS/FDH novamente se apresentou com as melhores conversões e obteve 14% de conversão catalítica no pH 7.5, sendo este o seu pH ótimo.

Figura 115. Conversão catalítica quanto à variação do pH reacional para a reação de formato a CO₂ (A) e de CO₂ a formato (B) para FDH livre (linha azul), MagNP-APTS/FDH (linha preta), MagNP@SiO₂-APTS/FDH (linha verde) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH (linha vermelha).

11.3.6.2 Variação da temperatura

Variando-se a temperatura reacional, observa-se que para a reação de formato a gás carbônico (Figura 116A), apesar da FDH livre apresentar a melhor performance catalítica em 37°C (correspondendo a 35% de conversão), esta enzima é robusta a variações de temperatura, pois não apresenta perdas consideráveis de atividade com o aumento da temperatura até 47°C (correspondendo a 32 % de conversão). Quando a

FDH está imobilizada na MagNP-APTS e na MagNP@SiO₂-APTS/FDH há um aumento nas conversões, porém ela se torna bem mais sensível a mudanças térmicas. A MagNP-APTS/FDH se apresentou mais ativa a temperaturas maiores que 37°C, sendo a sua temperatura ótima em 42°C, enquanto a MagNP@SiO₂-APTS/FDH exibiu suas melhores conversões entre 23°C e 37°C. A imobilização no suporte MagNP-APTS/Glioxil-Agarose rendeu uma FDH extremamente sensível à temperatura, com o máximo de conversão em 27°C.

Para a reação inversa, de CO₂ a formato, a FDH livre continuou com o mesmo comportamento praticamente estável com a mudança de temperatura reacional (Figura 116B). De maneira similar, o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH apresenta conversões ao redor de 5% por todo o espectro de temperatura, porém, com um leve máximo em 35°C. O sistema MagNP-APTS/FDH possui um máximo de conversão a 15°C, sendo dentre os sistemas de FDH imobilizado, o mais sensível a mudanças de temperatura, enquanto o sistema MagNP@SiO₂-APTS/FDH apresenta o seu máximo em 25°C.

Figura 116. Relação entre a temperatura de reação e a conversão catalítica na reação de conversão de formato a CO₂ (A) e de CO₂ a formato (B) para FDH livre (linha azul) MagNP-APTS/FDH (linha preta), MagNP@SiO₂-APTS/FDH (linha verde) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH (linha vermelha).

11.3.6.3 Dependência entre estrutura e atividade

Como já dito anteriormente, a emissão do triptofano é particularmente sensível a mudanças locais de campo elétrico e pode ser utilizada como sonda de ligação de substratos, sofrendo deslocamentos da emissão ou até mesmo a supressão.^{254,272-274} A diferença entre a intensidade de emissão pode ser utilizada para comparação da catálise enzimática em diferentes pHs, antes e depois da adição do substrato e da coenzima.

Considerando a estrutura da FDH (código PDB, 2JCI), visualizada no programa PyMol v0.99, o sítio ativo possui resíduos capazes de formar ligação de hidrogênio com os átomos de oxigênio do formato, sendo eles a histidina, a arginina e a asparagina. No caso da ligação do NAD^+ , enquanto a isoleucina e a valina fornecem um ambiente hidrofóbico favorável, a adenina pode se inserir entre uma arginina e uma cisteína, os quais são considerados resíduos essenciais para a ligação da coenzima.²⁰⁷ Na verdade, estes resíduos podem determinar como a catálise irá proceder em diferentes pHs. Neste sentido, Blanchard et al.²⁷⁵ reportaram que a ligação do NAD^+ é prevenida pela protonação de um grupo com $\text{pK} = 6.4$ e pela desprotonação de um grupo com $\text{pK} = 8.4$. Estes grupos podem ser relacionados com a histidina e com a cisteína, respectivamente.

Outro fator importante é mostrado na Figura 117, em que a formato desidrogenase de *Candida boidinii* possui cinco triptofanos diferentes, quatro deles estão relativamente próximos aos sítios catalíticos, enquanto o outro está longe dos sítios ativos. Estes triptofanos podem ser vistos na Figura 117 como círculos vermelhos.

Como pode ser visto na Figura 118 A, existe uma boa correlação entre as mudanças de emissão do triptofano e da atividade enzimática da FDH livre após a adição de formato e NAD^+ , como função do pH. A maior atividade é observada no pH 7.5, sugerindo a participação de uma histidina não protonada, de acordo com a hipótese

de Blanchard et al.²⁷⁵. A correlação observada indica que as mudanças de fluorescência do triptofano podem ser utilizadas como sonda da ligação do formato e do NAD^+ na FDH livre.

Figura 117. Esquema da FDH de *Candida boidinii* mostrando os sítios dos triptofanos (círculos vermelhos). Adaptada de²⁰⁷.

No caso da MagNP-APTS/FDH (Figura 118 A), os perfis observados são bem diferentes do que aqueles para a FDH livre (Figura 118A). A conversão catalítica aumenta com o pH (linha azul, Figura 118B), quase paralelamente ao decaimento da emissão do triptofano na presença de formato (linha preta, Figura 118 B) e NAD^+ , indicando uma flutuação negativa ao redor do pH 8.8, provavelmente devido a desprotonação do resíduo de cisteína, como observado por Blanchard e Cleland.²⁷⁵ O complexo binário MagNP-APTS/FDH- NAD^+ deve ter sofrido um aumento de seu pKa (originalmente 8.3-8.5), já que devem estar protonados para a ligação do formato e a interação do formato aumenta com o aumento do pH nesta forma imobilizada de FDH.

A tendência observada de aumento com o pH (acima de pH 9) pode refletir o envolvimento de outros sítios, como os resíduos de amina da MagNP-APTS, já que este efeito não pode ser observado na enzima livre.

Figura 118. Relação entre a catálise em diferentes pHs (linha azul, $\triangle$) e a magnitude de supressão de emissão do triptofano antes e depois da adição de formato (linha preta, $\square$) e NAD⁺ (linha vermelha, $\circ$) para (A) FDH livre, (B) MagNP-APTS/FDH, (C) MagNP@SiO₂-APTS/FDH e (D) MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH.

Como mostrado na Figura 118 C, o perfil catalítico da MagNP@SiO₂-APTS/FDH versus o pH exibe um máximo em 7.5, quase coincidindo com o perfil de

fluorescência associado com a ligação do formato, assim como observado para a FDH livre (Figura 118A). Neste caso, a ligação do NAD^+ parece decair acompanhando o aumento do pH (linha vermelha, Figura 118C), porém é possível que os triptofanos estejam mais próximos do sítio de ligação do formato e mais distantes do sítio do NAD^+ , desta forma, a emissão dos triptofanos não seria uma sonda eficaz para a ligação de NAD^+ .

No terceiro processo de imobilização (Figura 118D), o perfil de atividade *versus* pH da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH apresenta um aumento da atividade com o aumento do pH de maneira similar aquela observada para a MagNP-APTS/FDH (Figura 118 B). Entretanto, neste caso, não foi possível observar nenhum comportamento coerente da fluorescência do triptofano na presença de formato e NAD^+ . Acredita-se que a agarose esconda a influência das partículas magnéticas e desta forma o triptofano não pode ser utilizado como uma sonda confiável de monitoramento do sítio ativo da FDH imobilizada na MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH.

11.3.6.4 Reciclagem

Quando submetidas a análise de reciclagem, os três sistemas apresentam entre 30% de decaimento da atividade inicial após o primeiro ciclo, mantendo-se com a atividade constante por pelo menos mais cinco ciclos catalíticos. A atividade relativa da MagNP@SiO₂-APTS/FDH (colunas verdes, Figura 119) é sempre significativamente maior durante os cinco primeiros ciclos, enquanto a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH (colunas vermelhas, Figura 119) apresentou as menores conversões. Em ambos os casos, um rápido decaimento de conversão catalítica foi observado após o sexto ciclo catalítico. O sistema MagNP-APTS/FDH (colunas azuis, Figura 119) possui

um comportamento mais estável, mantendo a conversão catalítica em torno de 40% por 10 ciclos catalíticos sucessivos.

Figura 119. Reciclagem dos sistemas MagNP-APTS/FDH (coluna azul) MagNP-Glioxil-Agarose/FDH (coluna vermelha) e MagNP@SiO₂-APTS/FDH (coluna verde).

11.4 Imobilização da FaldH

Para a otimização da imobilização da enzima formaldeído desidrogenase de *Pseudomonas putida* fez-se primeiramente os estudos de variação do tempo, quantidade de partícula adicionada e quantidade de agente acoplante adicionado (glutaraldeído ou agarose).

11.4.1 Variação da quantidade de nanopartícula adicionada

Mantendo-se a quantidade de FaldH e agente acoplante constante, variou-se a quantidade de suporte utilizado para encontrar a melhor performance enzimática quanto à conversão de formaldeído a ácido fórmico. Analisando a Figura 120, verifica-se que com o sistema utilizando MagNP-APTS e glutaraldeído, há um aumento quase linear da

conversão catalítica com o aumento da quantidade de suporte magnético adicionado, sendo necessárias 0.8 mg de MagNP-APTS para a obtenção da máxima conversão para o sistema MagNP-APTS/glutaraldeído (36 %), enquanto para o sistema MagNP@SiO₂-APTS/glutaraldeído apenas 0.3 mg de MagNP@SiO₂-APTS resultam em 100% de conversão. A partir deste ponto, o sistema MagNP@SiO₂-APTS/glutaraldeído apresenta um decaimento na conversão catalítica. O sistema MagNP-APTS/Glioxil Agarose, possui máxima conversão, 40%, com 0.4 mg de MagNP-APTS.

Calculando-se a proporção de FalDH:suporte magnético nas condições ótimas, encontra-se uma proporção de 2:3 para MagNP-APTS/FalDH e MagNP@SiO₂-APTS/FalDH. Um acréscimo de nanopartículas magnéticas acarreta na desestabilização do sistema.

Figura 120. Efeito da quantidade de nanopartículas adicionada ao processo de imobilização. O desempenho de cada sistema foi avaliada quanto à conversão de formaldeído a formato: MagNP-APTS/ADH (linha preta), MagNP@SiO₂-APTS/ADH (linha vermelha) e MagNP/Glioxil-Agarose/ADH (linha verde).

11.4.2 Variação da quantidade de agente acoplante

Ao variar a quantidade de glutaraldeído adicionada ao processo de imobilização, observou-se que o sistema utilizando MagNP-APTS necessita de 3×10^{-5} mol de glutaraldeído para chegar ao máximo de conversão catalítica (40%), enquanto o sistema com MagNP@SiO₂-APTS necessita 3 vezes menos agente acoplante para o mesmo propósito, alcançando 60% de conversão catalítica, como pode ser visto na Figura 121 A. Já o sistema utilizando o método de imobilização por múltiplos pontos necessitou de 100 μ L de uma suspensão de glioxil-agarose de concentração 1 g/mL para obter 40% de conversão de formaldeído a formato (Figura 121 B). É interessante notar que após certa concentração de agente acoplante há o decréscimo da conversão catalítica, o que pode ser devido a desnaturação ou a um aumento de ligações cruzadas entre enzimas.

Figura 121. Variação do agente acoplante na imobilização com relação à conversão de formaldeído em formato. (A) Variação da concentração de glutaraldeído e (B) Variação da quantidade de glioxil-agarose adicionada.

11.4.3 Variação do tempo de imobilização

Encontrou-se o melhor tempo de imobilização para cada sistema mantendo constante a quantidade de enzima, suporte magnético e agente acoplante. Pela Figura

122, pode-se afirmar que os dois métodos envolvendo glutaraldeído obteve suas atividades ótimas com 20 minutos de imobilização, com conversões catalíticas de 50 e 100 % para MagNP-APTS/FalDH e MagNP@SiO₂-APTS/FalDH, respectivamente. Porém, com apenas 10 minutos, o sistema MagNP/Glioxil-Agarose/FalDH obteve 70% de conversão de formaldeído em ácido fórmico. Maiores períodos de imobilização resultam em uma diminuição da eficiência catalítica, possivelmente devido a maiores mudanças conformacionais das enzimas suportadas.

Figura 122. Relação entre o tempo de imobilização e a conversão catalítica para MagNP-APTS/FalDH (linha preta), MagNP@SiO₂-APTS/FalDH (linha vermelha) e MagNP/Glioxil-Agarose/FalDH (linha azul).

11.4.5 Caracterização dos sistemas

11.4.5.1 Microscopia de Força Atômica

Após a otimização dos protocolos de imobilização, obteve-se imagens de microscopia de força atômica de cada sistema. Observa-se na Figura 123A que após a secagem sobre mica, o sistema MagNP-APTS/FalDH apresenta clusters de 500 nm e

agregados de clusters com aproximadamente 2 μm . Tais clusters quando observados na imagem de contraste de fase (Figura 123B) apresentam um envoltório de matéria orgânica sobre uma camada inorgânica. Já o sistema $\text{MagNP@SiO}_2\text{-APTS/FalDH}$ apresenta na imagem topográfica (Figura 124 A) clusters de aproximadamente 2 μm , que na imagem de contraste de fase (Figura 124 B) são compostos de partículas magnéticas ao redor de um cluster orgânico.

Figura 123. Imagens de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP-APTS/FalDH (A) Imagem topográfica (B) imagem de contraste de fase.

Figura 124. Imagens de Microscopia de Força Atômica para o sistema $\text{MagNP@SiO}_2\text{-APTS/FalDH}$ (A) Imagem topográfica (B) imagem de contraste de fase.

Partindo para o sistema $\text{MagNP/Glioxil-Agarose/FalDH}$ verifica-se a formação de clusters maiores de 2 a 4 μm (Figura 125 A), os quais apresentam um núcleo

inorgânico, possivelmente, nanopartículas magnéticas, envoltas por uma camada orgânica, composta de glioxil-agarose e FalDH (Figura 125 B).

Figura 125. Imagens de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP/Glioxil-Agarose/FalDH (A) Imagem topográfica (B) imagem de contraste de fase.

Com a imobilização, clusters micrométricos são formados e dependendo do suporte utilizado para a imobilização, materiais completamente distintos são obtidos. As partículas MagNP-APTS tendem a agregar ao redor da enzima como uma armadura (Figura 123), enquanto as partículas MagNP@SiO₂-APTS e MagNP/Glioxil-Agarose tendem a expor a formaldeído desidrogenase para a solução, Figura 124 e Figura 125, respectivamente. Tentaremos correlacionar o comportamento da FalDH imobilizada com as imagens de AFM, já que com a imobilização, novas interações intra e inter moleculares são formadas com a influencia do suporte.

11.4.5.2 Aspectos termodinâmicos

Um dos comportamentos enzimáticos que foi modificado com a imobilização, como pode ser visto na Tabela 11 é a constante de Michaelis-Menten (K_M). O aumento do K_M no sistema MagNP-APTS/FalDH pode ser devido a proteção de nanopartículas

ao redor das enzimas observada no AFM (Figura 123). Uma diminuição de 4 e 6 vezes no K_M foi observada para os sistemas MagNP/Glioxil-Agarose/FalDH e MagNP@SiO₂-APTS/FalDH, respectivamente, indicando uma maior afinidade pelo substrato que a enzima livre.

A energia de ativação e entropia do estado de transição também se modificaram com a imobilização. A entropia do estado de transição foi calculada pela equação de Eyring com os valores de energia de ativação obtidos pelo gráfico de Arrhenius. Quanto maior este valor, maior é a mobilidade da enzima. Como mostrado na Tabela 11, há um aumento do $\Delta S^\ddagger$ ²⁷⁶ seguido de um aumento da energia de ativação para todos os sistemas imobilizados, quando comparados com a enzima livre. O aumento do $\Delta H^\ddagger$ é compensado pelo aumento da entropia.

Tabela 11. Valores de $\Delta H^\ddagger$, $\Delta S^\ddagger$ e K_M para a FalDH livre e imobilizada.

Sistema	$\Delta H^\ddagger$ (KJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (J mol K ⁻¹)	K_M (μM)
FalDH livre	152	377	0.3 ^a
MagNP-APTS/FalDH	401	1216	0.65 ^b
MagNP@SiO₂-APTS/FalDH	355	1064	0.05 ^c
MagNP-Glyoxyl-Agarose/FalDH	370	1132	0.08 ^d

a- 0.1 M tampão fosfato, pH 6.8 e 32°C, correspondendo a melhor conversão catalítica para a FalDH livre.

b- 0.1 M tampão Tris-HCl, pH 8.8 e 42°C, correspondendo a melhor conversão catalítica para MagNP-APTS/FalDH.

c- 0.1 M tampão Tris-HCl, pH 7.5 e 32°C, correspondendo a melhor conversão catalítica para MagNP@SiO₂-APTS/FalDH.

d- 0.1 M tampão fosfato, pH 5.8 e 32°C, correspondendo a melhor conversão catalítica para which MagNP/Glioxil-Agarose/FalDH.

11.4.5.3 Espectroscopia Raman Confocal

Da espectroscopia Raman confocal verifica-se que a banda de amida I da FalDH livre está em 1695 cm^{-1} , como pode ser visto na Figura 127 A, correspondendo a região de predominância de estruturas β intermoleculares.^{277,278} Quando formaldeído é adicionado à enzima, esta banda é deslocada para 1733 cm^{-1} , o que indica a presença de uma estrutura rígida por forças induzidas. Carey et al.²⁷⁹ afirmam que quando um grupo carbonílico está em um ambiente hidrofóbico, a sua banda Raman aparece próxima de 1725 cm^{-1} e já que a FalDH possui esta característica, acredita-se que algumas carbonilas próximas ao sítio ativo ou do sítio ativo mudam a sua posição para um ambiente mais hidrofóbico após o formaldeído se ligar à enzima.

Quando a FalDH é imobilizada na MagNP-APTS, a banda de amida I está presente em 1620 cm^{-1} , Figura 127 B, região das estruturas β intermoleculares²⁷⁸, indicando que possivelmente há um efeito indutivo do óxido de ferro nas carbonilas expostas à solução, deslocando a banda para menor energia em comparação com a FalDH livre. Após a adição de formaldeído, Figura 127 B linha vermelha, a banda de amida I é deslocada para a região de estruturas β intramoleculares (1637 cm^{-1}). Este efeito pode ser devido a uma diminuição da interação entre as subunidades. O deslocamento para o azul ocorre em menor extensão que para a enzima livre, porém, também pode ser devido a um ambiente mais hidrofóbico para as carbonilas.

A MagNP@SiO₂-APTS/FalDH tem a banda de amida I em uma região em que predomina-se a existência de estruturas β intramoleculares (1638 cm^{-1}), deslocando-se para 1644 cm^{-1} após a adição de formaldeído como pode ser visto na Figura 127 C. O pequeno deslocamento pode ser devido a uma mudança apenas do estado excitado do que uma mudança conformacional maior no estado fundamental.²⁷⁹

A banda de amida I para o sistema MagNP/Glioxil-Agarose/FalDH está situada em 1688 cm^{-1} , Figura 127 D, região de predominância de estruturas β intramoleculares,²⁷⁸ porém com maior energia que as encontradas para MagNP@SiO₂-APTS/FalDH, provavelmente por causa de uma menor interação com a água. Quando formaldeído é adicionado a este sistema, há um deslocamento para o vermelho para 1644 cm^{-1} , indicando uma reorganização dos elétrons π no estado fundamental das carbonilas, provavelmente devido à interação com água ou com a glioxil-agarose, aumentando o momento de dipolo C=O.²⁷⁹

A espectroscopia Raman pode dar informações importantes sobre a ligação de substratos nos sítio ativos, correlacionando-se com a estrutura e a reatividade²⁸⁰ e pode ser utilizada para que haja um melhor entendimento das energias de ativação após a imobilização. Neste caso, acredita-se que o deslocamento para o azul com a inserção de carbonilas em um ambiente hidrofóbico é favorável à catálise. Imamura et al.²²³ observaram que resíduos hidrofóbicos ao redor do sítio ativo podem aumentar a estabilização da enzima. Na Figura 126, observa-se uma parte do sítio ativo da FalDH (PDB: 1KOL), em que em vermelho está a Phe93 próxima da carbonila do Asp169 (em azul). Possivelmente, quando o formaldeído se liga no sítio ativo, esta carbonila vai de encontro ao anel aromático da fenilalanina. Este fenômeno ocorre em menor extensão para a MagNP@SiO₂-APTS/FalDH, enquanto a MagNP-APTS/FalDH possui a banda de amida I em menores energias, indicando a formação de uma conformação enzimática diferente após a imobilização.

Figura 126. Representação em cartoon do sítio ativo da FalDH. Em vermelho está evidenciado a Phe93 e em azul a Asp169.

O sistema MagNP-APTS/Glioxil-agarose/FalDH desloca para o vermelho a sua banda de amida I após a adição de formaldeído, indicando a formação de pontes de hidrogênio. Estes dois últimos casos podem aumentar substancialmente a energia de ativação, como pode ser visto na Tabela 11.

Na região II, Figura 127, são observadas duas bandas na enzima livre: uma em 1529 cm^{-1} e outra em 1565 cm^{-1} , correspondendo a NH_3^+ e ao $\text{C}_4=\text{C}_5$ do anel imidazólico da histina, respectivamente. Esta segunda banda é sensível à ligação de metais, aumentando a sua energia quando isto ocorre. Os sistemas imobilizados possuem a banda de NH_3^+ em 1537 cm^{-1} , 1531 cm^{-1} e 1532 cm^{-1} para MagNP-APTS/FalDH, MagNP@SiO₂-APTS/FalDH e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH, respectivamente. Este pequeno deslocamento para o azul é devido à interação em maior ou menor extensão com o óxido de ferro, o que acarreta em um efeito indutivo na amina, movendo a banda tipo *bending* para frequências maiores. Desta forma, pode-se afirmar que há uma maior interação entre o suporte e a FalDH no sistema MagNP-APTS/FalDH do que para os outros sistemas.

A banda correspondente ao anel imidazólico da histidina é observada em 1570 cm^{-1} , 1572 cm^{-1} e 1580 cm^{-1} para MagNP-APTS/FalDH, MagNP@SiO₂-APTS/FalDH, MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH, respectivamente. Esta banda quando localizada

em 1570 cm^{-1} indica que não há a ligação histidina-metal,²⁷⁸ o que seria o caso para a enzima livre, para MagNP-APTS/FalDH e MagNP@SiO₂-APTS/FalDH. Porém, o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH apresenta esta banda na região de ligação entre o N-3 do anel imidazólico e zinco.²⁷⁸ Mesmo que a histidina não esteja diretamente ligada ao zinco, pode-se assumir que com a imobilização, a distância entre o N-3 e o zinco está diminuindo com o maior deslocamento desta banda.

Em outras palavras, os estudos termodinâmicos foram suportados pela espectroscopia Raman Confocal, a qual indicou que com a imobilização houve um aumento da mobilidade enzimática, um aumento da interação com a água e uma diminuição da interação entre subunidades, o que resulta em um aumento da energia de ativação.

Figura 127. Espectro Raman Confocal da FalDH (A), MagNP-APTS/FalDH (B), MagNP@SiO₂-APTS/FalDH (C) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH (D) antes (linha preta) e depois (linha vermelha) da adição de formaldeído.

11.2.5.3 *FalDH e catálise*

A enzima formaldeído desidrogenase de *Pseudomonas putida* pertence à família MDR (medium chain alcohol dehydrogenase) que contém zinco. A maioria das formaldeído desidrogenases é dependente de NAD^+ e glutatona, porém a FalDH de *Pseudomonas putida* não é dependente de glutatona, catalizando a oxidação do formaldeído sem a adição externa de glutatona.²²¹

O sítio catalítico possui um átomo de zinco, um pequeno espaçador e um espaçador mais longo. O pequeno espaçador possui entre 20 e 29 resíduos, enquanto o mais longo possui entre 84 e 110 resíduos. Dentre os ligantes do espaçador pequeno estão a cisteína e a histidina. O primeiro ligante (cisteína) fica numa estrutura tipo loop, sendo o primeiro resíduo após a folha β dos resíduos 11-13 e está 2 resíduos antes de uma α -hélice. O segundo ligante, histidina, é sempre o primeiro resíduo antes da folha β .²²⁰ O zinco apresenta propriedades físico-químicas importantes, resultando em um grande impacto na reatividade e catálise de enzimas. Como o Zn^{2+} possui seu orbital d preenchido (d^{10}) é estável em reduções e oxidações, participando em reações redox combinadas com coenzimas orgânicas. Na Figura 128 está esquematizado o sítio ativo da enzima FalDH.

A partir destas informações, podemos partir para o comportamento catalítico em diferentes condições.

Figura 128. Sítio ativo da enzima FaldDH e *Pseudomonas putida*.

11.2.5.3.1 Influência do pH na catálise

Assim como para as outras enzimas já mostradas nesta tese, verificamos a atividade catalítica delas em diferentes pHs. Verifica-se que a formação de formaldeído é favorecida em pHs menores:

Observando a Figura 129, vê-se que a enzima livre possui um pH ótimo de 6.8 para as duas conversões (formaldeído/formato e formato/formaldeído), enquanto a MagNP@SiO₂-APTS/FalDH possui seu pH ótimo de conversão de formaldeído em formato em pH 7.5. Já o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH apresenta um decaimento da conversão catalítica com o aumento do pH e a MagNP-APTS/FalDH possui seu pH ótimo em 5.8. No caso da conversão formaldeído à formato, o aumento no pKa dos aminoácidos responsáveis pela catálise pode ter ocorrido se dois grupos foram deprotonados com a imobilização, assim, um grupo deprotonado tenderá a aumentar o pKa do outro grupo, envolvendo uma mudança conformacional grande. Outro jeito de explicar este deslocamento do pH ótimo é que a ligação de hidrogênio

entre as partículas e a enzima acarreta em um aumento do pKa do doador de prótons com vista a diminuir a repulsão eletrônica. O comportamento da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH indica que possivelmente houve um decaimento do pKa, com o aumento da interação entre partículas positivas ou até mesmo pela disposição dos aminoácidos do sítio ativo em um ambiente hidrofóbico. Esta última hipótese pode ser provada pela presença de uma pequena banda em 1720 cm^{-1} no Raman Confocal (Figura 127 D, linha preta- antes da adição de formaldeído).

Ao observar a reação inversa (Figura 129, lado direito), sendo esta a de conversão do formato em formaldeído, observa-se que o pH ótimo da FalDH imobilizada em todos os suportes está em 5.8, igualmente ao pH ótimo da enzima livre, porém a MagNP-APTS/FalDH possui uma elevada conversão catalítica. Possivelmente, o fato da reação ser diretamente dependente da presença de íons hidrônio faça com que as influencias conformacionais não sejam tão importantes neste caso.

Figura 129. Variação do pH da reação com relação à conversão de formaldeído a formato (A) e à conversão de formato a formaldeído (B) para FalDH livre (linha preta), MagNP-APTS/FalDH (linha vermelha), MagNP@SiO₂-APTS/FalDH (linha azul) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH (linha verde).

11.2.5.3.2 Influência da temperatura na catálise

Para a conversão de formaldeído a formato, a enzima livre possui dois máximos de conversão, um em 27°C e outro em 47°C, como pode ser visto na Figura 130. Com a imobilização, esta característica é mantida para a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH, enquanto a MagNP@SiO₂-APTS/FalDH exibiu melhores conversões (de 80 a 100%) entre 25°C e 42°C. A MagNP-APTS/FalDH exibiu uma máxima conversão de 28% a 42°C.

No sentido inverso da reação, de formato a formaldeído, a FalDH livre apresenta um máximo de conversão (32%) entre 32 e 37°C, enquanto a MagNP-APTS/FalDH apresenta o máximo de conversão (100%) em 20°C e um segundo máximo de conversão (45%) em 32°C. Uma conversão de 60% em 32°C é encontrado para a MagNP-APTS/Glioxil-agarose/FalDH. Já o sistema MagNP@SiO₂-APTS/FalDH apresenta seu máximo de conversão (53%) a 20°C. Estas diferenças entre temperaturas ótimas de reação se devem pela maior mobilidade da enzima imobilizada, o que faz com que haja uma diminuição da temperatura ótima.

Figura 130. Influência da temperatura na conversão de (A) formaldeído a formato e (B) de formato em formaldeído para FalDH livre (linha vermelha), MagNP-APTS/FalDH (linha azul), MagNP@SiO₂-APTS/FalDH (linha preta) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH (linha verde).

11.2.5.3.4 Reciclagem

Os sistemas imobilizados também foram estudados quanto a possibilidade de reciclagem do catalisador. Observa-se na Figura 131, que a MagNP-APTS/FalDH apresenta a menor estabilidade com relação aos outros sistemas na reação de conversão do formaldeído a formato, sendo que o segundo ciclo catalítico já apresenta metade da conversão catalítica inicial. Já o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH após 10 ciclos apresenta 70 % da atividade inicial, enquanto o sistema MagNP@SiO₂-APTS/FalDH, além de apresentar as melhores conversões, também se mostra mais estável, mantendo a sua atividade ao redor de 80% ao longos das reações.

Quanto à reação inversa, de formato a formaldeído, vê-se que o sistema MagNP-APTS/FalDH é o que apresenta os melhores resultados, seguido do sistema MagNP@SiO₂-APTS/FalDH. A MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH perde toda a sua atividade no quarto ciclo catalítico.

Figura 131. Reciclagem para a reação (A) formaldeído à formato e (B) formato a formaldeído para MagNP-APTS/FalDH (azul petróleo), MagNP@SiO₂-APTS/FalDH (rosa) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH (laranja).

A melhor maneira de avaliar estes resultados é verificar os pHs e temperaturas em que foram realizados. A reação direta, de formaldeído a formato, deve ser feita em pHs e temperatura ótimos para cada enzima suportada : MagNP-APTS/FalDH (pH 6.8 e 42°C), MagNP@SiO₂-APTS/FalDH (pH 7.5 e 32°C), MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH (pH 5.8 e 27°C). Enquanto a reação indireta, de formato a formaldeído, deve ser feita em: para MagNP-APTS/FalDH (pH 5.8 e 20°C), MagNP@SiO₂-APTS/FalDH e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH (pH 5.8 e 32°C).

O sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH foi utilizado em temperaturas e pHs parecidos para ambas reações, portanto, acredita-se que este sistema não é muito estável a concentrações elevadas de formaldeído, enquanto o sistema MagNP@SiO₂-APTS/FalDH apresenta uma certa estabilidade para as duas reações, porém, sendo mais estável em pH 7.5 do que em pH 5.8. Já o sistema MagNP-APTS/FalDH aparentemente apresenta estabilidade para pH 5.8 e temperaturas menores, sendo pouco sensível ao formaldeído.

11.5 Imobilização da GDH

A imobilização da GDH foi realizada para que se pudesse ter uma enzima que reciclasse o NAD⁺ formado pelas outras enzimas (FDH, FalDH e ADH). Nesta seção discutiremos sobre a sua imobilização. A GDH diferentemente das outras enzimas foi imobilizada em quatro sistemas: MagNP-APTS, MagNP@SiO₂-APTS, MagNP-APTS/Glioxil-Agarose e MagNP@CMC (nanopartículas magnéticas recobertas com carboximetil celulose).

11.5.1 Variação da quantidade de nanopartícula adicionada

Ao aumentar a quantidade de MagNP-APTS (Figura 132, linha preta) percebeu-se que a atividade enzimática decaiu drasticamente, mantendo-se então para todas as imobilizações 1 mg de MagNP-APTS. Já para o sistema utilizando glioxil agarose (Figura 132, linha vermelha), verifica-se que existem dois máximos de quantidade de MagNP-APTS, um em 2 mg ($5.4E^{-10}$ mol) e outro em 12 mg ($3.3E^{-9}$ mol). Como a glioxil-agarose é um material poroso, isso acaba ajudando a enzima a manter a sua forma estrutural ativa. Sabendo-se que na imobilização foram adicionados $1.6E^{-10}$ mol de GDH, verifica-se que no primeiro ponto, são 3 MagNP para 1 GDH e no segundo ponto são 20 MagNP para 1 GDH.

Para excluir a possibilidade de que o GDH seja inativada pela presença de íons Fe em solução, como já observado anteriormente com enzimas redox²⁸¹, pelo contato com a superfície não protegida da MagNP, fez-se a imobilização da GDH em MagNP@SiO₂-APTS (Figura 132, linha azul) e de fato, encontrou-se melhores atividades enzimáticas do que para a MagNP-APTS. Ainda assim, a presença de maiores quantidades de MagNP@SiO₂-APTS mostrou uma influência negativa sobre a GDH. Dessa forma, chegou-se ao valor ideal da quantidade de nanopartícula a ser adicionada no sistema, 1 mg, nas nossas condições de trabalho.

Figura 132. Influência da quantidade de nanopartícula adicionada à imobilização da GDH com relação à conversão de glutamato em α -cetoglutarato para MagNP-APTS/GDH (linha preta), MagNP@SiO₂-APTS/GDH (linha azul) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (linha rosa).

O sistema de MagNP@CMC utilizou uma suspensão de partículas (200 mg/ mL) e a variação de quantidade de partículas foi de 0,2 mg a 1 mg de MagNP@CMC utilizada (Figura 132, linha rosa). Observa-se um máximo em 0,6 mg, sendo então esta a quantidade de MagNP@CMC utilizada em todas as imobilizações.

11.5.2 Variação da quantidade de agente acoplante utilizado

Os sistemas utilizando glutaraldeído apresentaram comportamentos diferentes quanto à adição de glutaraldeído. Enquanto a MagNP-APTS/GDH diminuía a conversão catalítica com a adição de glutaraldeído (Figura 133, linha preta), o sistema MagNP@SiO₂-APTS/GDH (Figura 133, linha vermelha) apresentou um aumento da atividade com o aumento da concentração do agente acoplante.

Figura 133. Influência da quantidade de glutaraldeído adicionado à imobilização da GDH com relação à conversão de glutamato em α -cetoglutarato para MagNP-APTS/GDH (linha preta), MagNP@SiO₂-APTS/GDH (linha vermelha).

Já para o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH, observa-se um máximo de conversão catalítica em 25 % utilizando-se 50 μL de uma suspensão de glioxil-agarose 100 mg/ mL, como pode ser visto na Figura 134.

Figura 134. Influência da quantidade de glioxil-agarose adicionado à imobilização da GDH com relação à conversão de glutamato em α -cetoglutarato para MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH.

11.5.3 Variação do tempo de imobilização

Mantendo-se a quantidade de nanopartícula e de agente acoplante adicionado, variou-se o tempo de imobilização da glutamato desidrogenase. Observa-se na Figura 135 que para os sistemas utilizando glutaraldeído (linha preta e linha vermelha), o melhor tempo de imobilização constitui-se de uma imobilização instantânea. Os sistemas utilizando múltiplos pontos para imobilização, MagNP-APTS/Glioxil-Agarose e MagNP@CMC, apresentam o máximo de conversão catalítica com 5 minutos de imobilização.

Figura 135. Relação entre o tempo de imobilização e a conversão de glutamato em α -cetoglutarato para MagNP-APTS/GDH (linha preta), MagNP@SiO₂-APTS/GDH (linha vermelha), MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (linha azul) e MagNP@CMC/GDH (linha rosa).

11.5.4 Caracterização dos sistemas

11.5.4.1 Microscopia de Força Atômica

Para todos os sistemas imobilizados foram feitas imagens de Microscopia de Força Atômica após a secagem sobre mica. Observa-se na Figura 136A a formação de clusters de aproximadamente 800 nm para a MagNP-APTS/GDH. Estes clusters quando

analisados pelo contraste de fase, Figura 136B, apresentam uma composição essencialmente de GDH com poucas partículas magnéticas sobre ele.

Figura 136. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP-APTS/GDH. (A) Imagem topográfica e (B) Imagem de contraste de fase.

Clusters maiores são formados para o sistema MagNP@SiO₂-APTS/GDH, Figura 137A, apresentando tamanhos de aproximadamente 5 μm com um contraste de fase (Figura 137B) pouco definido, possivelmente devido ao fato das partículas magnéticas se encontrarem dentro do cluster enzimático.

Figura 137. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP@SiO₂-APTS/GDH. (A) Imagem topográfica e (B) Imagem de contraste de fase.

Com o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH, clusters de 250 nm heterogêneos são observados (Figura 138A), sendo compostos de agregados de GDH com poucas partículas magnéticas sobre estes agregados orgânicos (Figura 138B).

Figura 138. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH. (A) Imagem topográfica e (B) Imagem de contraste de fase.

O sistema mais diferente quanto às imagens de AFM é o MagNP@CMC/GDH em que são observados clusters micrométricos (Figura 139 A) compostos de partícula magnéticas homogeneamente dispersas em um agregado orgânico maior, composto de carboxi-metilcelulose e GDH (Figura 139 B).

Figura 139. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP@CMC/GDH. (A) Imagem topográfica e (B) Imagem de contraste de fase.

11.5.4.2 Aspectos termodinâmicos

A estabilização enzimática realizada através da imobilização é uma estratégia muito bem conhecida, porém, a estabilização de uma enzima alostérica composta de seis subunidades é um desafio ainda maior quando comparado com outros sistemas enzimáticos, pois as subunidades devem continuar sensíveis umas às outras após a imobilização.²⁸² A GDH apresenta fortes interações entre pelo menos três subunidades desta proteína hexamérica²⁸³, sendo que a interação inter subunidades é realizada pela região da antena.²⁸⁴

Com a imobilização estas interações devem permanecer existentes para que a atividade enzimática seja mantida. Os estudos termodinâmicos para entender a mobilidade destes sistemas foram realizados e encontramos que a GDH aumentou em sua rigidez devido à diminuição do $\Delta S^\ddagger$ dos sistemas imobilizados, como pode ser visto na Tabela 12. Observa-se também que há uma diminuição da energia de ativação para todos os sistemas como maneira de compensar a rigidez obtida na imobilização.

Tabela 12. Valores de $S_{0.5}$, ΔH , $\Delta S^\ddagger$ e n (coeficiente de Hill) para a GDH livre e imobilizada.

Sistema	$S_{0.5}$ (μM)*	E_a (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (J mol K ⁻¹)	n
GDH livre	190	849	2767	2.1
MagNP-APTS/GDH	350	319	941	3.9
MagNP@SiO₂-APTS/GDH	75	405	1247	3.5
MagNP-Glioxil-Agarose/GDH	75	251	712	1.6
MagNP@CMC/GDH	15	215	615	1.2

* $S_{0.5}$ é o correspondente à constante de Michaelis-Menten para enzimas alostéricas

Percebe-se que a imobilização via múltiplos pontos resulta em sistemas mais rígidos do que os realizados via cross-linking com glutaraldeído. O comportamento enzimático deve envolver um compromisso envolvendo K_M , ΔH e mobilidade. Com relação à afinidade pelo substrato, apenas o sistema MagNP-APTS/GDH apresentou um K_M maior que a GDH livre. Pode-se também dizer que quanto maior a mobilidade, maior é a energia de ativação, o que em teoria, acarretará em um decaimento da conversão catalítica.

O coeficiente de Hill (n , Tabela 12), é uma ferramenta utilizada para estimar a magnitude de cooperação entre as subunidades enzimáticas. A GDH livre apresenta um n igual a 2.1, enquanto após a imobilização em MagNP-APTS e MagNP@SiO₂-APTS há um acréscimo no valor de n , indicando um aumento da cooperatividade entre subunidades. A imobilização via múltiplos pontos resulta em um decréscimo de cooperatividade entre as subunidades, com um valor de n que sugere nenhuma cooperatividade para MagNP@CMC/GDH, enquanto o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH apresenta o valor mais próximo do da GDH livre ($n=1.6$).

11.5.4.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da GDH livre e imobilizada foi estudada incubando-se a enzima a 50 °C e pH 7.5. Retirou-se alíquotas com o passar do tempo e verificou-se a conversão catalítica. Como pode ser visto na Figura 140, a imobilização via múltiplos pontos (linha azul e linha marrom) resulta nos sistemas mais estáveis termicamente com relação à GDH livre (linha preta), enquanto os métodos utilizando glutaraldeído (linha verde e vermelha) não conseguiram estabilizar tão bem a GDH, apresentando uma estabilidade térmica menor que a GDH livre.

Figura 140. Inativação enzimática a 50°C e pH 7.5. GDH livre (linha preta, ○), MagNP-APTS/GDH (linha vermelha, □), MagNP@SiO₂-APTS/GDH (linha verde, ▽), MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (linha azul, △) and MagNP@CMC/GDH (linha marrom, ◇).

11.5.4.4 Espectroscopia Raman Confocal

O espectro Raman Confocal para a GDH livre antes e depois da adição de glutamato e NAD⁺ pode ser observado na Figura 141A. Neste espectro verifica-se que a GDH livre não apresenta mudanças espectroscópicas com a adição de glutamato (Figura 141, linha vermelha) e NAD⁺ (Figura 141, linha azul). A banda de amida I possui seu máximo em 1634 cm⁻¹. Os sistemas que se parecem com a GDH livre quanto ao espectro Raman Confocal são MagNP@SiO₂-APTS/GDH (Figura 141C) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (Figura 141D), com a banda de amida I em 1634 cm⁻¹ e 1629 cm⁻¹, respectivamente. Estes sistemas também não apresentaram mudanças espectroscópicas com a adição dos substratos.

O espectro inicial de MagNP-APTS/GDH (Figura 141B) possui a banda de amida I em 1633 cm⁻¹ (linha preta, Figura 141B). Quando glutamato é adicionado, a banda de amida I é deslocada para o azul com máximo em 1662 cm⁻¹ (linha vermelha, Figura 141B), apresentando uma pequena banda em 1733 cm⁻¹, o que indica a presença

de grupos hidrofóbicos ao redor de alguma carboxila que muda a sua posição após a ligação do glutamato. Com a adição de NAD^+ (linha azul, Figura 141B) há um deslocamento da banda de amida I para o vermelho, apresentando o máximo de absorção em 1650 cm^{-1} .

Novamente, o sistema MagNP@CMC/GDH (Figura 141E) é o mais distinto entre eles, apresentando a banda de amida I com um máximo em 1660 cm^{-1} (linha preta, Figura 141E), correspondendo à uma perda de estruturas β intermoleculares, porém, com a adição de glutamato estas estruturas parecem aumentar sua contribuição, apresentando um máximo da banda de amida I em 1623 cm^{-1} . Quando NAD^+ é adicionado, a banda em 1733 cm^{-1} surge, indicando que uma carbonila de algum resíduo próximo ao sítio de ligação do NAD^+ se deslocou para um ambiente hidrofóbico.

Com a ajuda do programa PyMol v.0.99, pôde-se observar a estrutura da GDH de fígado bovino (código PDB, 3MW9) e existem quatro aminoácidos responsáveis pela ligação do glutamato, a Lys90, Lys126, Lys114 e Arg221²⁸⁴, estando uma tirosina relativamente próxima à Lys90 e uma tirosina e uma fenilalanina próximas a Lys126, portanto, em outras palavras, existe a possibilidade de que estes sejam os aminoácidos que mudaram de posição na estrutura terciária após a imobilização na MagNP-APTS . O sítio de ligação do NAD^+ possui os seguintes aminoácidos: Val255, Asp275, Ser275, Gln330 e Ser 327, portanto, deles, apenas o Asp275 e a Ser276 podem contribuir para o surgimento da banda em 1733 cm^{-1} após a adição de NAD^+ no sistema MagNP@CMC/GDH , indicando uma possível mudança conformacional.

Figura 141. Espectro Raman Confocal da (A) GDH livre, (B) MagNP-APTS/GDH, (C) MagNP@SiO₂-APTS/GDH, (D) MagNP-Glioxil-Agarose/GDH, (E) MagNP@CMC/GDH antes (linha preta) e depois da adição de glutamato (linha vermelha) e da adição de NAD^+ (linha azul).

11.5.5 GDH e a catálise

11.5.5.1 Influência do pH

Da catálise em diferentes pHs (Figura 142) pode-se observar que a GDH livre (linha azul, Figura 142) possui o seu pH ótimo em pH 8.8 com conversões catalíticas ao redor de 30%, enquanto a MagNP-APTS/GDH (linha preta, Figura 142) tem a conversão aumentada com o aumento do pH, alcançando 18% de conversão no pH 9.8. O sistema MagNP@SiO₂-APTS/GDH (linha verde claro, Figura 142) apresenta o seu pH ótimo em pH 7.5 com conversões em torno de 25% e a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (linha vermelha, Figura 142) mantém as suas conversões em torno de 12% entre os pHs 5.8 e 7.5. Por fim, o sistema MagNP@CMC/GDH (linha verde escura, Figura 142) possui conversões em torno de 70% , 2.5 vezes maior que a GDH livre, entre os pHs 7.5 e 8.8, ainda mantendo melhores conversões que os outros sistemas em pHs mais baixos.

Figura 142. Relação entre o pH reacional e a conversão catalítica para GDH livre (linha azul), MagNP-APTS/GDH (linha preta), MagNP@SiO₂-APTS/GDH (linha verde claro) e MagNP@CMC/GDH (linha verde escuro)

11.5.5.2 Influência da temperatura

As diferentes temperaturas reacionais também possuem uma grande influência na catálise, como mostrado na Figura 143. A GDH livre (linha azul, Figura 143) apresenta 100% de conversão a 47°C, enquanto a MagNP-APTS/GDH (linha preta, Figura 143) possui a melhor conversão, de 21% a 25°C. Tal temperatura ótima também é encontrada para o sistema MagNP@SiO₂-APTS/GDH (linha verde claro, Figura 143), com 30% de conversão de glutamato em α -ceto-glutarato. A imobilização via múltiplos pontos pela glioxil-agarose (linha vermelha, Figura 143) possui o seu máximo de conversão de 40% a 32°C, enquanto a catálise pela MagNP@CMC/GDH (linha verde escuro, Figura 143) apresenta dois máximos, um em 25°C e o outro em 47°C com conversões próximas a 70%, como se fosse um misto dos comportamentos da MagNP-APTS/GDH e da GDH livre.

Figura 143. Relação entre a temperatura reacional e a conversão catalítica para GDH livre (linha azul), MagNP-APTS/GDH (linha preta), MagNP@SiO₂-APTS/GDH (linha verde claro) e MagNP@CMC/GDH (linha verde escuro).

11.5.5.3 Alostéria

Uma proteína é considerada alostérica quando a ligação do substrato interfere as propriedades de ligação em outro sítio da mesma proteína. A glutamato desidrogenase

apresenta alosteria para ADP e GTP, sendo o ADP um ativador e o GTP um inibidor enzimático.²⁴⁰ Ao realizarmos os estudos de inibição e ativação com as enzimas imobilizadas, verificou-se que apenas a MagNP@SiO₂-APTS/GDH e a MagNP@CMC/GDH apresentaram o padrão de ativação com a adição de concentrações crescentes de ADP (Figura 144 C e E), enquanto o sistema MagNP-APTS/GDH apresentou inibição na presença de ADP (Figura 144B) e a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (Figura 144 D) não teve a sua cinética modificada na presença de ADP.

Na presença de concentrações crescentes de GTP, Figura 145, a GDH livre apresenta um leve decaimento da velocidade inicial da reação (Figura 145 A). Esta característica de inibição é mantida apenas para a MagNP@CMC/GDH (Figura 145 E), enquanto os outros três sistemas são ativados na presença de GTP.

Este comportamento completamente inesperado das enzimas imobilizadas nos fez pensar sobre os sítios alostéricos de GTP e ADP. O GTP se liga principalmente pelos fosfatos em seu sítio e não consegue se ligar à forma apo da glutamato desidrogenase, sendo que a base de complexação se dá pela Iso216 e Ser 217.²⁸⁵ Já o ADP se liga à forma apo e holo da GDH com a Arg463 como responsável pela ligação do ADP. A parte adenosina do ADP se liga a um sítio hidrofóbico com os grupos fosfato apontando para cima, na direção de uma hélice principal, chamada antena.²⁸⁵ A alosteria na GDH só é possível devido à antena, pois o fechamento de uma subunidade requer que a parte de trás da hélice principal sofra uma distorção, entrando na antena de outra subunidade, sendo que a inibição pelo GTP necessita desta deformação da antena enquanto ela se fecha. Desta forma, analisando estes dados, pensou-se que ao realizarmos a cinética enzimática com ATP, molécula que possui tanto a parte adenosina do ADP e a parte trifosfato do GTP, conseguiríamos entender por que parte da molécula havia uma ativação/inibição inesperada nos sistemas imobilizados.

Figura 144. Cinética da glutamato desidrogenase na presença de diferentes concentrações de ADP: 0 μM de ADP (pontos pretos), 10 μM de ADP (pontos vermelhos), 50 μM de ADP (pontos azuis) e 100 μM de ADP (pontos rosa). (A) GDH livre; (B) MagNP-APTS/GDH; (C) MagNP@SiO₂-APTS/GDH; (D) MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH e (E) MagNP@CMC/GDH.

Figura 145. Cinética da glutamato desidrogenase na presença de diferentes concentrações de GTP: 0 μM de GTP (pontos pretos), 10 μM de GTP (pontos vermelhos), 50 μM de GTP (pontos azuis) e 100 μM de GTP (pontos rosa). (A) GDH livre; (B) MagNP-APTS/GDH; (C) MagNP@SiO₂-APTS/GDH; (D) MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH e (E) MagNP@CMC/GDH.

Deve-se lembrar de que o ATP apresenta inibição da GDH em baixas (1-100 μM) e altas concentrações (1-10 mM), pois se liga ao sítio do GTP, já em concentrações intermediárias (100 μM a 1 mM) o ATP apresenta ativação da GDH, por conseguir se ligar ao sítio do ADP.²⁸⁶ Tendo isto em mente, a Figura 146 mostra a cinética da GDH livre e imobilizada antes e depois da adição de ATP (concentrações finais 100 μM e 1 mM). Nesta região de concentração a GDH deveria apresentar ativação na presença de

ATP e é exatamente o que se observa para GDH livre (Figura 146A), MagNP@SiO₂-APTS/GDH (Figura 146C), MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (Figura 146D) e MagNP@CMC/GDH (Figura 146E). Porém, o sistema MagNP-APTS/GDH (Figura 146B) apresenta uma inibição na presença de ATP. Em concentrações acima de 1 mM de ATP, Figura 147, observa-se uma inibição de todos os sistemas, porém, para a MagNP-APTS/GDH (Figura 147 B) na concentração de 10 mM há um aumento da atividade, acima desta concentração, há a inibição.

Figura 146. Cinética da glutamato desidrogenase na presença de diferentes concentrações de ATP: 0 μ M de ATP (pontos pretos), 100 μ M de ATP (pontos vermelhos), 1 mM de ATP (pontos azuis). (A) GDH livre; (B) MagNP-APTS/GDH; (C) MagNP@SiO₂-APTS/GDH; (D) MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH e (E) MagNP@CMC/GDH.

Figura 147. Cinética da glutamato desidrogenase na presença de diferentes concentrações de ATP: 0 μ M de ATP (pontos pretos), 100 mM de ATP (pontos azuis), 100 mM de ATP (pontos rosa). (A) GDH livre; (B) MagNP-APTS/GDH; (C) MagNP@SiO₂-APTS/GDH; (D) MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH e (E) MagNP@CMC/GDH.

Neste ponto, partiu-se para a digestão enzimática com tripsina para a verificação das quebras principais, como análise de uma possível conformação estrutural da GDH na superfície das partículas magnéticas. A digestão enzimática foi feita na presença e na ausência das moléculas alostéricas. Os fragmentos foram analisados por MALDI-TOF e

estão em anexo. Observou-se que a GDH sozinha na ausência de ADP e GTP possui a quebra principal entre os aminoácidos 1 e 11 (m/z 1353), seguido da quebra entre os aminoácidos 450-469 (m/z 2311) e 291-305 (m/z 1714). Na presença de ADP e GTP, a quebra 1-11 permanece favorável, porém em menor intensidade. O GTP expõe o fragmento 12-19 (m/z 1000) e o 28-33 (m/z 715), sendo fragmentos opostos ao sítio de ligação do GTP. Já o ADP faz com que o fragmento 450-469, oposto ao seu sítio de ligação seja favorecido à quebra. A Figura 148 dá uma visão melhor das quebras.

Figura 148. Esquemática das principais quebras feitas na digestão da GDH por tripsina antes e depois da adição de ADP e GTP. Em laranja estão as quebras principais, em verde as segundas mais intensas e em azul as menos intensas dentre as quebras mais intensas.

Quando imobilizada em MagNP-APTS a GDH apresenta a quebra do fragmento 9-40 e 28-33 como quebras principais. O que nos indica que há uma mudança conformacional considerável ao se imobilizar a GDH em MagNP-APTS, expondo sítios mais internos para a digestão com a tripsina. Sugere-se que a MagNP-APTS esteja ligada próxima à antena da GDH de maneira a expor o interior da GDH para a solução e modificar a alosteria da GDH livre.

A adição de GTP, como observado anteriormente, ao invés de inibir, ativa a MagNP-APTS/GDH. Pelo ensaio de digestão trípica, verifica-se que a adição de GTP diminui consideravelmente a digestão dos fragmentos 9-40 e 28-33, aumentando a digestão do fragmento 1-11, o qual é preferencial na conformação da GDH favorável à

catálise. O fragmento 291-305 aparece em grande quantidade também, igualmente à digestão da GDH livre na presença de ADP.

Ao adicionarmos ADP à MagNP-APTS/GDH, observa-se que há uma inibição da conversão catalítica. A digestão com tripsina nos mostra que o fragmento 12-19 é favorecido, o que indica que o ADP deve se ligar ao seu sítio, porém, como a partícula está situada na antena, a conformação não é a esperada para que haja a ativação da MagNP-APTS/GDH, já que a ligação do ADP necessita de uma rotação da antena no sentido horário e a MagNP-APTS deve estar dificultando esta rotação, fazendo com que o fragmento 12-19 seja exposto em detrimento do 450-469. Uma esquematização das digestões da MagNP-APTS/GDH está mostrada na Figura 149.

Figura 149. Esquematização das principais quebras feitas na digestão da MagNP-APTS/GDH por tripsina antes e depois da adição de ADP e GTP. Em laranja estão as quebras principais, em verde as segundas mais intensas e em azul as menos intensas dentre as quebras mais intensas.

Quando imobilizada na MagNP@SiO₂-APTS, a GDH apresenta o fragmento 12-19 como fragmento principal. Após a adição de GTP, a proporção do fragmento 156-174 aumenta consideravelmente devido à torção da antena, mostrando que o sítio do GTP deve estar bloqueado, causando uma exposição do fragmento 156-174 e aumentando a digestão do fragmento 1-11.

A adição de ADP à MagNP@SiO₂-APTS/GDH faz com que o fragmento 1-11 seja aumentada, juntamente com o fragmento 291-305. Isto provavelmente ocorre devido à deformação da GDH para acomodar o ADP. Deve-se dizer também que o fragmento 476-501 aparece tanto na presença de ADP quanto na presença de GTP. Este fragmento é da parte interna da parte enzimática que liga estas moléculas alostéricas. Ou seja, quando tentamos ligar a enzima com ADP e GTP este fragmento se torna mais exposto. A Figura 150 esquematiza as fragmentações principais ocorridas para MagNP@SiO₂-APTS/GDH.

Figura 150. Esquematização das principais quebras feitas na digestão da MagNP@SiO₂-APTS/GDH por tripsina antes e depois da adição de ADP e GTP. Em laranja estão as quebras principais, em verde as segundas mais intensas e em azul as menos intensas dentre as quebras mais intensas.

A imobilização em MagNP-APTS/Glioxil-Agarose faz com que a quebra preferencial seja entre os aminoácidos 291 e 305, como se a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose estivesse no sítio do ADP, expondo o 291-305. Desta forma, acredita-se que a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH esteja imobilizada na sua conformação ativa. Ao adicionar GTP, observa-se que há um leve aumento da quantidade dos fragmentos 12-19 e 156-174, devido à torção do domínio de ligação de NAD no eixo da hélice pivot.

Este processo praticamente não interfere na catálise, como foi observado nas cinéticas da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH na presença de GTP.

Porém, ao adicionarmos ADP, a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH é inibida ao invés de ativada. Pela digestão trípica, verifica-se que há um aumento maior dos fragmentos 12-19, 156-174 e 9-40. A mudança conformacional é maior neste caso, já que a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose está bloqueando o sítio do ADP, fazendo com que a GDH tenha que se distorcer em maior escala para que o ADP entre no seu sítio. Quando esta mudança conformacional ocorre, há uma exposição grande dos grupos mais internos da enzima. É possível que a inibição venha de uma conformação desfavorável à ligação do glutamato à enzima. Na Figura 151 está esquematizado as principais fragmentações ocorridas na digestão trípica da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH.

Figura 151. Esquematização das principais quebras feitas na digestão da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH por tripsina antes e depois da adição de ADP e GTP. Em laranja estão as quebras principais, em verde as segundas mais intensas e em azul as menos intensas dentre as quebras mais intensas.

Por fim, quando a GDH é imobilizada na MagNP@CMC a maior quebra observada é do fragmento 1-11, sendo este o mesmo fragmento favorecido para a GDH livre. Há também uma inversão na preferência dos fragmentos 291-305 e 450-469 quando comparamos com a GDH livre. Isto indica uma pequena mudança

conformacional, podendo ser que a MagNP@CMC também tenha se ligado à parte externa das subunidades ou no meio da estrutura. Ao adicionarmos GTP à MagNP@CMC/GDH, observa-se na digestão trípica um aumento da contribuição do fragmento 450-469, indicando que há uma exposição do sítio ativo, o que é desfavorável para a reação, causando uma inibição enzimática.

Com a adição de ADP, há o aumento da contribuição do fragmento 137-154, o que expõe a parte interna de conexões entre subunidades. O que indica que a ADP pôde entrar em seu sítio e agir como ativante, mantendo a “fissura” enzimática aberta. Na Figura 152 estão esquematizadas as principais fragmentações na digestão trípica da MagNP@CMC/GDH.

Figura 152. Esquematização das principais quebras feitas na digestão da MagNP@CMC/GDH por tripsina antes e depois da adição de ADP e GTP. Em laranja estão as quebras principais, em verde as segundas mais intensas e em azul as menos intensas dentre as quebras mais intensas.

Para concluir esta parte, podemos dizer que:

- a) a MagNP@CMC/GDH se comporta de maneira semelhante à GDH livre quanto à presença de ADP, GTP e ATP, apesar de apresentar fragmentos diferentes na digestão com tripsina.
- b) Se o sítio de ligação do ADP estiver bloqueado na MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH, como indicam as fragmentações, a alosteria se dá pela adenosina,

pois o ATP em qualquer concentração, inibe a MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH e o GTP não afeta a atividade enzimática inicial.

- c) Pela digestão com tripsina, verifica-se que o ADP na MagNP-APTS/GDH se liga ao seu sítio, porém não existe uma conformação necessária para a ativação da GDH. Isto pode ser devido à ligação da MagNP-APTS à antena.
- d) O GTP ativa a MagNP-APTS/GDH, porém, deve ser pelo fato de ele se ligar ao sítio do ADP, pois a digestão trípica mostra uma quebra similar à da GDH livre na presença de ADP. O GTP por ser maior, deve se inserir melhor no novo sítio de alosteria.
- e) A MagNP@SiO₂-APTS/GDH não apresenta muitas mudanças com a digestão trípica na presença e na ausência de ADP e GTP. Provavelmente, o sítio do GTP está bloqueado, porém, a partir de certa concentração, este passa a inibir a MagNP@SiO₂-APTS/GDH, juntamente com a ATP, que está acima deste nível de concentração.

11.5.5.4 Reciclagem

Em termos de reciclagem tanto a MagNP-APTS/GDH (colunas vermelhas, Figura 153) quanto a MagNP@SiO₂-APTS/GDH (coluna laranja, Figura 153) apresentam atividade catalítica apenas na primeira reação. O sistema MagNP@CMC/GDH (colunas azuis, Figura 153) apesar de apresentar a melhor conversão no primeiro ciclo catalítico, quando submetido a um teste de reciclagem apresenta um decaimento da conversão para aproximadamente 30% após a primeira reação, mantendo este comportamento até a décima reação. O sistema mais estável dentre os sistemas imobilizados é o da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (colunas

verdes, Figura 153), mantendo a sua atividade ao redor de 40% durante os 10 ciclos catalíticos.

Figura 153. Reciclagem dos sistemas MagNP-APTS/GDH (barras vermelhas), MagNP@SiO₂-APTS/GDH (barras laranjas), MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (barras verdes) e MagNP@CMC/GDH (barras azuis).

11.6 Catálise multi-enzimática

Na Natureza, as enzimas atuam em sistemas sequenciais e, portanto partimos para a síntese de metanol à partir de CO₂ com o sistema multi-enzimático. Para este sistema, as melhores enzimas obtidas através da imobilização foram utilizadas.

Inicialmente, pensou-se em utilizar as quatro enzimas em um sistema à pressão ambiente, porém, notou-se que o borbulhamento de CO₂ à solução, acarretou em uma desnaturação enzimática. Desta forma, pensou-se que ao utilizar as quatro enzimas em um mesmo reator de alta pressão, a reação poderia ser forçada na direção do produto desejado, no caso, metanol. Variando-se o tempo de reação, verificou-se que a maior quantidade de metanol é obtida em 30 minutos reacionais, como mostrado na Figura

154. Desta forma, optou-se por fazer o estudo de pressão de CO_2 com este tempo reacional.

Para se ter uma noção da dinâmica da reação devemos observar a Figura 154, a qual nos mostra que a concentração de formaldeído formada sempre se mantém igual após 15 minutos de reação. Considerando que a concentração de metanol não sofre grandes variações, podemos dizer que ainda há muito ácido fórmico no meio reacional devido à grande quantidade de NAD^+ formado. Este NAD^+ passa a ser consumido com 1 hora de reação, possivelmente pela glutamato desidrogenase, gerando NADH e α -cetoglutarato.

Figura 154. Relação entre o tempo de reação multi-enzimática e a concentração de NAD^+ (linha preta), metanol (linha vermelha) e formaldeído (linha azul) formados.

Ao variar a pressão, obteve-se um decaimento das concentrações de metanol e formaldeído formados, como pode ser visto na Figura 155, sendo a pressão de 26 psi a pressão ideal a ser utilizada. A concentração de NAD^+ formada apresenta um máximo em 54 psi, decaindo a partir desta pressão. Isto nos indica que em até 54 psi muito ácido fórmico, metanol e formaldeído é formado, enquanto a partir desta pressão, além de pouco metanol e formaldeído serem formados, acredita-se que a enzima GDH trabalhe

melhor em pressões mais elevadas do que as outras enzimas, ocasionando em um acréscimo de NADH e pouca conversão catalítica do CO_2 em seus produtos de redução.

Figura 155. Relação entre a pressão utilizada na reação multi-enzimática e a concentração de NAD^+ (linha preta), metanol (linha vermelha) e formaldeído (linha azul).

Mantendo-se a pressão em 25 psi e o tempo de reação em 30 minutos, variou-se a temperatura reacional. Observa-se na Figura 156 que o incremento na temperatura ocasiona um leve aumento na concentração de metanol formado e um decaimento na concentração de formaldeído formado. A curvatura do NAD^+ formado indica que muito ácido fórmico é gerado em 35°C, já que pouco metanol e formaldeído são formados e o NAD^+ só poderia vir da reação de CO_2 para ácido fórmico.

Figura 156. Relação entre a temperatura utilizada na reação multi-enzimática e a concentração de NAD^+ (linha preta), metanol (linha vermelha) e formaldeído (linha azul).

Escolheu-se manter a temperatura em 25 °C por haver certa conversão de formaldeído em metanol e ainda haver muito formaldeído no meio reacional. Com relação à reciclagem deste sistema multi-enzimático, verifica-se na Figura 157 que a concentração de todos os produtos vai decaindo a cada reação. Na escala de reação que foi feita, chegamos ao limite de detecção do aparelho, portanto considerou-se que o sistema pode ser reciclado até quatro vezes.

Figura 157. Estudo de reciclagem do sistema multi-enzimático.

11.7 Filosofando: o que é o tempo ótimo de imobilização?

Todos os sistemas que utilizam a imobilização de enzimas devem iniciar o processo de verificação das melhores condições de imobilização para se obter a melhor atividade enzimática. Desta forma, varia-se a quantidade de reagentes adicionados e o tempo de imobilização. Para todos os sistemas utilizados nesta tese, a partir de um determinado tempo, o aumento na duração da imobilização ou não acarreta em nenhum incremento na atividade catalítica ou faz com que a atividade enzimática decaia. Mas afinal, o que é o tempo ótimo de imobilização?

Para responder esta pergunta, estudou-se a imobilização da enzima álcool desidrogenase em diferentes tempos de imobilização. Escolheu-se a ADH devido ao

fato de ser a enzima mais estudada na literatura, por apresentar um tamanho de enzima razoável quando comparada com as outras e por ser uma enzima barata. Novamente, devemos olhar para o gráfico da influência do tempo de imobilização na conversão enzimática de etanol em acetaldeído (Figura 158) : Neste gráfico, observa-se que o sistema MagNP-APTS/ADH apresenta um máximo de conversão catalítica com 10 minutos de imobilização, apresentando uma pequena queda de 5 % de conversão para tempos maiores de imobilização; Já o sistema MagNP@SiO₂-APTS/ADH apresenta uma queda brusca de conversão catalítica quando utilizamos 20 minutos a mais do tempo ótimo de imobilização e para o sistema MagNP-APTS/Agarose/ADH é ainda mais evidente a existência de um tempo ótimo de imobilização, decaindo em 60% de sua atividade catalítica máxima ao excedermos a duração de imobilização em 5 minutos. Isto leva a crer que tempos maiores, acarretam em novas conformações enzimáticas que não são tão favoráveis à catálise, porém, para afirmarmos isto, devemos estudar um pouco mais a fundo os três sistemas imobilizados (MagNP-APTS/ADH, MagNP@SiO₂-APTS/ADH e MagNP-APTS/Agarose/ADH) em três tempos de imobilização diferentes: antes do tempo ótimo, no tempo ótimo e após o tempo ótimo.

Figura 158. Influência do tempo de imobilização da ADH na conversão de etanol à acetaldeído para : MagNP-APTS/ADH (linha vermelha), MagNP@SiO₂-APTS/ADH (linha preta) e MagNP-APTS/Agarose/ADH (linha azul).

Observa-se na Tabela 13 que o sistema MagNP-APTS/ADH apresenta uma diminuição da entalpia de transição e um aumento da entropia de transição com o aumento da duração do tempo de imobilização, o que sugere que com o incremento no tempo de imobilização há um aumento na mobilidade da ADH imobilizada na superfície da MagNP-APTS e com isto, uma exposição do sítio ativo da ADH para a solução, o que seria desfavorável para a conversão catalítica. Já os sistemas MagNP@SiO₂-APTS/ADH e MagNP-APTS/Agarose/ADH se comportam de maneira diferente, aumentando tanto a entalpia quanto a entropia de transição até o tempo ótimo de imobilização, o que se caracterizaria pela formação gradativa de uma enzima menos rígida, porém, com o sítio ativo mais interno. A partir do tempo ótimo de imobilização, há um decaimento tanto da entropia quanto da entalpia de transição, o que como observado pela conversão catalítica (Figura 158, linha preta e linha azul), é desfavorável para a catálise.

Tabela 13. Comparação entre a entalpia e a entropia do estado de transição dos diferentes sistemas da ADH com tempos de imobilização distintos.

Sistema	$\Delta H^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
ADH livre	57.9	28
MagNP-APTS/ADH - 5 minutos	93.8	8.5
MagNP-APTS/ADH - 10 minutos	82.7	170
MagNP-APTS/ADH - 15 minutos	10.9	262
MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH - 45 minutos	94.5	16.3
MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH - 60 minutos	108.5	257
MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH - 75 minutos	59.2	105
MagNP-APTS/Agarose/ADH - 5 minutos	45.2	148.3
MagNP-APTS/Agarose/ADH - 10 minutos	131.2	326
MagNP-APTS/Agarose/ADH - 15 minutos	65.9	-86

A partir destes dados, tem-se uma dúvida a ser eliminada: Será que o sítio ativo realmente se torna mais exposto à solução nos sistemas com elevada entropia de transição? Como será a conformação da ADH nos diferentes tempos de imobilização para cada tipo de suporte? Uma tentativa de visualização da conformação enzimática foi feita com a fluorescência, Figura 159, na qual, pode-se ver que com o aumento do tempo de imobilização há um aumento progressivo da fosforescência do triptofano (W_{172}) e uma diminuição da fluorescência dos triptofanos para todos os sistemas. Estes dados apenas nos indicam que o W_{172} está inserido mais no interior da estrutura da ADH, não nos dando mais informações sobre a conformação enzimática.

Figura 159. Fluorescência dos sistemas MagNP-APTS/ADH, MagNP@SiO₂-APTS/ADH e MagNP-APTS/Agarose/ADH com diferentes tempos de imobilização: antes do tempo ótimo

(linha preta), no tempo ótimo (linha vermelha) e após o tempo ótimo (linha verde). O espectro em azul é da ADH livre.

Desta forma, realizou-se uma análise dos aminoácidos que são “enxergados” por nanopartículas de ouro, como já mostrado anteriormente, para verificarmos que tipo de aminoácidos estão expostos à solução. Cada espectro foi comparado com os espectros dos aminoácidos imobilizados e observou-se que o sistema MagNP-APTS/ADH apresenta sempre um espectro similar à iso-leucina (anexo 110). Enquanto para o sistema MagNP@SiO₂-APTS/ADH no tempo de 45 minutos de imobilização, não é possível correlacionar com nenhum aminoácido, porém, para 60 e 75 minutos de imobilização, observamos triptofano como um aminoácido “enxergado” pelas nanopartículas de ouro, com menor intensidade para 75 minutos de imobilização (anexo 111). Por fim, o sistema MagNP-APTS/Agarose/ADH apresenta sempre um espectro similar à isoleucina, com menor extensão no tempo ótimo de imobilização (anexo 112).

Estes dados juntos nos fazem acreditar que à medida que o tempo de imobilização aumenta para o sistema MagNP-APTS/ADH, as partículas magnéticas vão se inserindo na região próxima aos triptofanos 50, 64, 82 e 92, acarretando na supressão de fluorescência destes triptofanos. A colocação da partícula nesta região, deve forçar um movimento de “abertura” da superfície da ADH, o que acarreta na exposição de muitas iso-leucinas à solução e na introdução do triptofano 172 no interior da ADH, como mostrado na Figura 160. Esta movimentação de fato expõe o centro catalítico, o que faz com que haja uma diminuição da entalpia de transição, porém, apesar da diminuição da barreira energética, a exposição do sítio catalítico faz com que o intermediário não permaneça tempo suficiente no sítio ativo, diminuindo a conversão catalítica.

Figura 160. Representação esquemática da possível estruturação da MagNP-APTS/ADH. Em vermelho estão os triptofanos e em rosa as isoleucinas. As setas pretas indicam uma possível movimentação enzimática durante a imobilização.

O sistema MagNP-APTS/Agarose/ADH, Figura 161, parece que também apresenta este tipo de movimentação, pois também apresenta o espectro de isoleucina, porém, a partícula não deve estar muito próxima dos triptofanos 50, 54, 82 e 92 já que não há uma supressão total da fluorescência mesmo em tempos maiores. Após o tempo ótimo de imobilização, há uma rigidificação brutal do sistema, juntamente com a diminuição da entalpia de ativação. Acredita-se que até 10 minutos de imobilização, o sistema está se reorganizando, apresentando um aumento de entropia e inserindo o sítio ativo mais internamente na ADH, porém, tempos maiores de imobilização podem contribuir com a imobilização de mais partículas ao redor da enzima. Esta imobilização de muitas partículas ao redor da enzima faz com que a ADH fique muito rígida, desfavorecendo as movimentações necessárias para a catálise acontecer.

Figura 161. Representação esquemática da possível estruturação da MagNP-APTS/Agarose/ADH. Em vermelho estão os triptofanos e em rosa as isoleucinas. As setas pretas indicam uma possível movimentação enzimática durante a imobilização.

Já para o sistema MagNP@SiO₂-APTS/ADH, pode ser que a partícula magnética esteja na região oposta aos triptofanos 50, 54, 82 e 92, fazendo com que haja uma movimentação no sentido de expor estes triptofanos para a solução, tornando-os de fácil detecção pelas nanopartículas de ouro. A movimentação deve ser capaz de inserir o triptofano 172 em uma região hidrofóbica interna da ADH, de forma a gerar a fosforescência. Até 1 hora de imobilização, acredita-se que a álcool desidrogenase esteja em constante movimentação para assumir a melhor conformação, escondendo o sítio ativo, pois se observa um aumento na energia de ativação. Após 1 hora de imobilização a ADH deve se tornar muito móvel, fazendo com que uma conformação não favorável à catálise seja atingida e a imobilização a partir deste ponto se torna uma imobilização de uma estrutura mais caótica.

Figura 162. Representação esquemática da possível estruturação da MagNP@SiO₂-APTS/ADH. Em vermelho estão os triptofanos. As setas pretas indicam uma possível movimentação enzimática durante a imobilização.

Com estes dados, pôde-se ter uma ideia da dinâmica de imobilização de enzimas, na qual, inicialmente há um aumento da rigidez do sistema devido à interação enzima-partícula, como pode ser visto na Figura 163. Após esta ligação, a partícula passa a induzir uma movimentação enzimática, que pode ser tanto favorável, quanto desfavorável para a catálise enzimática. A partir deste período, duas coisas podem ocorrer: ou mais partículas se imobilizam à enzima, ou mais movimentação da conformação enzimática ocorre. Ambas são desfavoráveis à obtenção de um sistema ótimo enzima-partícula.

Conclui-se que sempre que houver imobilização, sempre haverá uma mudança conformacional da enzima, que podem tanto favorecer, quanto desfavorecer a catálise alvo. Porém, como já dito anteriormente, é difícil prever que tipo de interação vai ocorrer com cada enzima e cada nanopartícula e que duração do processo de imobilização será o mais adequado para cada tipo de enzima. As enzimas são dinâmicas, portanto, conferir muita rigidez à elas, não é favorável, da mesma maneira o

é, a movimentação excessiva, pois acarreta em menor estabilização do intermediário da reação.

Figura 163. Dinâmica da imobilização de enzimas ao longo do tempo.

12. Conclusão específica

A imobilização das enzimas álcool desidrogenase, formaldeído desidrogenase, formato desidrogenase e glutamato desidrogenase foi realizada com sucesso em três tipos de suporte magnético (MagNP-APTS, MagNP@SiO₂-APTS e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose).

Para a enzima álcool desidrogenase de *Sacharomyces cerevisie* o melhor método de imobilização constituiu de MagNP@SiO₂-APTS e glutaraldeído como agente acoplante. Este sistema apresentou uma mudança conformacional grande, a qual foi

evidenciada pela emissão de triptofano. No sentido de rigidez e mobilidade, a estabilidade da ADH imobilizada foi maior para os sistemas menos rígidos, já que a MagNP-APTS/Agarose/ADH manteve 70% de sua atividade inicial, enquanto o sistema mais rígido, MagNP-APTS/ADH, obteve apenas 15 % da atividade inicial após 10 ciclos de reação. No caso da MagNP@SiO₂-APTS/ADH, houve uma mudança da estrutura terciária da enzima, pois possui um espectro de pH e temperatura maior do que para os outros sistemas.

A imobilização da enzima formato desidrogenase de *Candida boidinii* resultou em um ganho de estabilidade e atividade enzimática. As partículas MagNP@SiO₂-APTS resultaram nas melhores conversões de formato à CO₂, entretanto, em termos de reciclagem, a MagNP-APTS resultou em um sistema mais estável, com conversões em torno de 40% por 10 ciclos catalíticos sucessivos. O sistema com MagNP-APTS/Glioxil-Agarose foi consistentemente o pior sistema de imobilização para a FDH, exibindo conversões menores que 30% e baixa estabilidade térmica. Com a FDH pudemos utilizar os resíduos de triptofano como sondas internas, verificando-se o comportamento atividade-estrutura na presença de formato e NAD⁺. Neste estudo, o que se revelou foi uma interação forte entre as partículas magnéticas MagNP-APTS e a enzima. No caso da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH, o triptofano não pôde ser utilizado como sonda, devido à uma supressão de fluorescência não específica.

Para a formaldeído desidrogenase de *Pseudomonas putida* foi observado uma excelente atividade enzimática com a MagNP@SiO₂-APTS, exibindo uma eficiência de 100% de conversão de formaldeído à formato à temperaturas amenas e pH fisiológico. Os outros dois sistemas não puderam ser reciclados e apresentaram atividades enzimáticas muito pequenas, possivelmente devido à maiores mudanças conformacionais.

A glutamato desidrogenase, por ser uma enzima muito grande (342 kDa) é melhor estabilizada por sistemas de imobilização por múltiplos pontos, como a MagNP-APTS/glioxil-agarose e MagNP@CMC. Com a imobilização, a MagNP-APTS/GDH apresentou uma resposta alostérica quanto ao ADP, GTP e ATP contrária à resposta da GDH livre, indicando mudanças conformacionais que possivelmente são a causa da sua baixa atividade.

Com estes estudos, mostra-se a importância do entendimento da conformação enzimática antes da imobilização, pois pode acarretar em um grande impacto na escolha de um suporte, já que a imobilização pode resultar em diferentes conformações enzimáticas pelo simples uso de suportes diferentes.

Nesta tese também foi feita a catálise multi-enzimática para obter metanol e formaldeído, mostrando os primeiros passos para estudos futuros de conversão catalítica enzimática do gás carbônico em produtos de maior valor agregado. Verificou-se também, que apesar das enzimas atuarem em sequência na Natureza o controle de suas atividades em um sistema *in vitro* é extremamente complicado, necessitando de diversos estudos sobre o sistema.

13. Conclusões gerais

No período desta tese, diversos estudos de síntese e caracterização de complexos bimetalícos e imobilização de enzimas em partículas magnéticas foram feitos. A ideia principal destes estudos era encontrar o melhor método para a redução catalítica do gás carbônico. Verificou-se que dos complexos sintetizados, apenas três apresentaram atividade catalítica quanto à redução do CO₂. Além disto, o rendimento das reações de acoplamento C-C variou de 1 a 5%, obtendo-se poucas quantidades de produto.

Com relação às enzimas, verificou-se que o uso em conjunto dos quatro sistemas imobilizados foi possível, porém, assim como para a redução via química, a redução enzimática do gás carbônico obteve rendimentos de 0.1% para a produção de metanol e de 1% para a produção de formaldeído.

Os dois processos estudados possuem custos energéticos equivalentes e abrem possibilidades de estudos e aperfeiçoamento no uso dos complexos bimetalícos e das enzimas imobilizadas na redução de CO₂, fundamentais para que o seu uso seja possível no futuro.

14. Referências

- (1) Spinoza, B. *Ética*; D. VAN NOSTRAND: Nova Iorque, 1876; Vol. 1.
- (2) VENTURI, L. A. B., Discussões sobre conceito de Recurso Natural com as turmas de 2005 e 2006 da FFLCH.
- (3) Bird, A. *Philosophy of Science*; UCL Press: Londres, 1998.
- (4) Bent, H. A. *Journal of Chemical Education* 1987, 64, 167.
- (5) Almqvist, E. *History of industrial gases*; Kluwer Academic: New York, 2003.
- (6) Stillman, J. M. *The Story of Early Chemistry*; D. Appleton and Company: Londres, 1924.
- (7) Sicca, N. A. L.; Gonçalves, P. W. *Química Nova* 2002, 25, 689.
- (8) More, C. *Understanding the Industrial Revolution*; Routledge: Londres, 2000.
- (9) Arrhenius, S. *Philosophical Magazine* 1896, 41, 237
- (10) Abelson, P. H. *Science* 1986, 231, 1233.
- (11) Sawyer, J. S. *Nature* 1972, 239, 23.
- (12) Chan, Y.-H. O., J. S.; Emanuel, W. R. *Environment International* 1980, 4, 189.
- (13) *Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide*; The Royal Society, 2005.
- (14) Friis-Christensen, E. *Space Science Reviews* 2000, 94, 411.
- (15) Forbush, S. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1957, 43, 28.
- (16) Svensmark, H.; Friis-Christensen, E. *J. Atmos. Solar-Terr. Phys.* 1997, 59, 1225.
- (17) Svensmark, H. *Phys. Rev. Lett.* 1998, 81, 5027.
- (18) Friis-Christensen, E. *Climatic Change* 2000, 47, 1.
- (19) Shaviv, N. J. *Journal of Geophysical Research* 2003, 108, 1437.
- (20) Shaviv, N. J. *Journal of Geophysical Research* 2008, 113, A11101.
- (21) Caldeira, K.; Kasting, J. F. *Nature* 1992, 360, 721.
- (22) Lovelock, J. E.; Whitfield, M. *Nature* 1982, 296, 561.
- (23) Thompson, A. B. *Contr. Mineral. and Petrol.* 1971, 33, 145.
- (24) Svensmark, H.; Friis-Christensen, E. *Danish National Space Center Scientific Report* 2007, 3.
- (25) Lockwood, M.; Fröhlich, C. *Proc. R. Soc. A* 2007, 463, 2447.
- (26) *IPCC Special Report on Carbon Dioxide Capture and Storage*; CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS: Nova Iorque, 2005.
- (27) TRIVEDIAND, J.; BABADAGLI, T. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 5473.
- (28) Keller, K. M., D.; Bradford, D. F. *Climatic Change* 2008, 88, 267.
- (29) Wang, S. C., J.M.; Jub, W.M. ;Fenga, X.; Chenb, M.; Chena, P.; Yua G. *Journal of Environmental Management* 2007, 85, 524.
- (30) MATTHEWS, H. D. *Global Change Biology* 2007, 13, 1068.
- (31) Fang, J., Chen, A., Peng, C., Zhao, S., Chi, L. *Science* 2001, 292, 2320.
- (32) Badeck , F.-W. T., G.; Nogués, S.; Piel C.; Ghashghaie, J. *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY* 2005, 19, 1381.

- (33) McKenneya, D. W. Y., D.; Foxb, G.; Ramlal, E. *Forest Policy and Economics* 2004, 6, 345.
- (34) Yeung, C. S.; Dong, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 7826.
- (35) Tanaka, R.; Yamashita, M.; Nozaki, K. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 14168.
- (36) Imaoka, T. T., R.; Yamamoto, K. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer chemistry* 2006, 44, 5229.
- (37) Huang, K.; Sun, C.-L.; Shi, Z.-J. *Chem.Soc.Rev.* 2011, 40, 2435.
- (38) Swiegers, G. F. *Mechanical Catalysis*; John Wiley & Sons: New Jersey, 2008.
- (39) Sugimoto, H. K., K. *Macromolecules* 2008, 41, 312.
- (40) Ren, W.-M.; Liu, Z.-W.; Wen, Y.-Q.; Zhang, R.; Lu, X.-B. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 11509.
- (41) Klaus, S.; Lehenmeier, M. W.; Anderson, C. E.; Rieger, B. *Coordination Chemistry Reviews* 2011, 255, 1460.
- (42) Xiao, Y. W., Z.; Ding, K. *Macromolecules* 2006, 39, 128.
- (43) Sakakura, T. C., J.-C.; Yasuda, H. *Chemical Reviews* 2007, 107, 2365.
- (44) Song, C. *Catalysis Today* 2006, 115, 2.
- (45) Bond, G. M.; Stringer, J.; Brandvold, D. K.; Simsek, F. A.; Medina, M.-G.; Egeland, G. *Energy & Fuels* 2001, 15, 309.
- (46) Wieser, M.; Yoshida, T.; Nagasawa, T. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2001, 11, 179.
- (47) Aresta, M.; Quaranta, E.; Liberio, R.; Dileo, C.; Tommasi, I. *Tetrahedron* 1998, 54, 8841.
- (48) Ohno, Y.; Nakamori, T.; Zheng, H.; Suye, S.-I. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, 72, 1278.
- (49) Lu, Y.; Jiang, Z.-I.; Xu, S.-W.; Wu, H. *Catalysis Today* 2006, 115, 263.
- (50) Anderson, V. E. In *eLS*; John Wiley & Sons, Inc.: 2001.
- (51) Kürti, L. C., B. *Strategic applications of named reactions in organic synthesis*; Elsevier: San Diego, 2005.
- (52) Stepanov, A. G. L., M. V. ; Romannikov, V. N.; Sidelnikov, V. N.; Zamaraevy, K. I. *JOURNAL OF CATALYSIS* 1996, 164, 411.
- (53) Haff, W.; Koch, H. *Justus Lzebig's Ann. Chem* 1960, 638, 122.
- (54) SOUMA, Y.; SANO, H. *Journal of organic chemistry* 1973, 38, 3633.
- (55) Beller, M. T., A. M. *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds*; Wiley: Weinheim, 2002; Vol. 1.
- (56) Sommer, J. *Stable Carbocation Chemistry*; John Wiley & Sons: Nova Iorque, 1997.
- (57) Janowicz, A. H.; Bergman, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 352.
- (58) Fujiwara, Y.; Taniguchi, H.; Takaki, K.; Kurioka, M.; Jintoku, T.; Kitamura, T. *Studies in Surface Science and Catalysis* 1997, 107, 275.
- (59) Zerella, M.; S., M.; Bell, A. T. *Organic Letters* 2003, 5, 3193.
- (60) Wilcox, E. M.; Roberts, G. W.; Spivey, J. J. *Applied Catalysis A: General* 2002, 226 317.
- (61) Ding, Y.-H. H., W.; Wang, Y.-G. *Fuel Processing Technology* 2007, 88, 319.
- (62) Werner, A. *Zeitschrift für anorganische Chemie* 1896, 21.
- (63) Odling, W. *Philosophical Magazine Series 4* 1858, 16.

- (64) Kauffman, G. *Proceeding of the Pacific Southwest Association of Chemistry Teachers* 1959, 36, 521.
- (65) Kauffman, G. B. *Journal of Chemical Education* 1972, 49, 813.
- (66) Korol'kov, D. V. *Russian Journal of General Chemistry* 2002, 72, 523.
- (67) Vol'Pin, M. E.; Kolomnikov, I. S. *Pure Appl. Chem.* 1973, 33, 567.
- (68) Gibson, D. H. *Coordination Chemical Reviews* 1999, 185-186, 335.
- (69) Gibson, D. H. *Chemical Reviews* 1996, 96, 2063.
- (70) G. Fachinetti, C. F., P. F. Zanazzi, *J. Am. Chem. Soc.* 1978, 100, 7405.
- (71) Lehninger, A. L. *Principles of biochemistry*; 4^a ed., 2006.
- (72) Badger, M. R.; Price, G. D. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1994, 45, 369.
- (73) Cotelesage, J. J. H.; Puttick, J.; Goldie, H.; Rajabi, B.; Novakovski, B.; Delbaere, L. T. J. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007, 39, 1204.
- (74) Cheng, K.-C.; Nowak, T. *The Journal of Biological Chemistry* 1989, 264, 3317.
- (75) Sudom, A.; Walters, R.; Pastushok, L.; Goldie, D.; Prasad, L.; Delbaere, L. T. J.; Goldie, H. *Journal of Bacteriology* 2003, 185, 4233.
- (76) Vorholt, J. A.; Thauer, R. K. *Eur. J. Biochem.* 1997, 248, 919.
- (77) Schmitz, R. A.; Albracht, S. P. J.; Thauer, R. K. *Eur. J. Biochem.* 1992, 209, 1013.
- (78) Aresta, M.; Nobile, C. F. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1975, 15, 636.
- (79) Himmel, H.-J. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 2007, 633, 2191.
- (80) Morales-Morales, D.; Jensen, C. *The Chemistry of Pincer Compounds* Elsevier Science: Amsterdam, 2007.
- (81) Inoue, Y.; Izumida, H.; Sasaki, Y. *Chemistry Letters* 1976, 863.
- (82) Himeda, Y.; Onozawa-Komatsuzaki, N.; Sugihara, H.; Kasuga, K. *Organometallics* 2007, 26, 702.
- (83) Ogo, S.; Kabe, R.; Hayashi, H.; Harada, R.; Fukuzumi, S. *Dalton Transactions* 2006, 4657.
- (84) Tsai, J.-C.; Nicholas, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 5117.
- (85) Graf, E.; Leitner, W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992, 623.
- (86) Gassner, F.; Leitner, W. *Journal of the Chemical Society* 1993, 19, 1465.
- (87) Angermund, K.; Baumann, W.; Dinjus, E.; Fornika, R.; Grolls, H.; Kessler, M.; Kruger, C.; Leitner, W.; Lutz, F. *Chem. Eur. J.* 1997, 3, 755.
- (88) Jessop, P. G.; Ikaiya, T.; Noyori, R. *Nature* 1994, 368, 231.
- (89) Jessop, P. G.; Hsiao, Y.; Ikaiya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 344.
- (90) Munshi, P.; Main, A. D.; Linehan, J. C.; Tai, C.-C.; Jessop, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 7963.
- (91) Behr, A. *Angewandte Chemie International Edition* 1988, 27, 661.
- (92) Dinjud, E.; Kaiser, J.; Sieler, J.; Walthe, D. *Z. anorg. allg. Chem* 1981, 483, 63.
- (93) Ji, D.; Lu, X.; He, R. *Applied Catalysis A: General* 2000, 203, 329.
- (94) Johanson, R.; Wendt, O. F. *Dalton Transactions* 2007, 488.
- (95) Zhang, Y.; Riduan, S. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 6210
- (96) Giri, R.; Mangel, N.; Foxman, B. M.; Yu, J.-Q. *Organometallics* 2008, 27, 1667.

- (97) Balcells, D.; Raynaud, C.; Crabtree, R. H.; Eisenstein, O. *Chem. Commun.* 2008, 744.
- (98) Crabtree, R. H. *Journal of Organometallic chemistry* 2004, 689, 4083.
- (99) Chen, M. S.; White, M. C. *Science* 2007, 318, 783.
- (100) Chen, M. S.; White, M. C. *Science* 2010, 327, 566.
- (101) Pierpont, A. W.; Cundari, T. *Inorganic Chemistry* 2010, 49, 2038.
- (102) Crabtree, R. H. *Photosensitization and photocatalysis using inorganic and organometallic compounds*; Kluwer Academic Publishers: Amsterdam, 1993.
- (103) Holton, J.; Lappert, M. F.; Pearce, R.; Yarrow, P. I. W. *Chem. Rev.* 1983, 83, 135.
- (104) Fernández-Anca, D.; García-Seijo, M. I.; Castiñeiras, A.; García-Fernández, M. E. *Inorganic Chemistry* 2008, 47, 5685.
- (105) Crabtree, R. H.; Das, S.; Brudvig, G. W. *Chemical Communications* 2008, 413.
- (106) Johnson, M. T.; Johansson, R.; Kondrashov, M. V.; Steyl, G.; Ahlquist, M. S. G.; Roodt, A.; Wendt, O. F. *Organometallics* 2010, 29, 3521.
- (107) Zhou, Y.; Wang, W.-H.; Dou, W.; Tang, X.-L.; Liu, W.-S. *Chirality* 2008, 20, 110.
- (108) Wang, P.-A. L., Wen-Min; Sun, Xiao-Li *Organic Preparations and Procedures International* 2011, 43, 477.
- (109) Huy, P. S., Hans-Guenther *Synthesis* 2011, 6, 954.
- (110) Takahashi, H. K., Akihiro; Higashiyama, Kimio *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1987, 35, 1604.
- (111) Corey, E. J. B., Raman K.; Shibata, Saizo; Chen, Chung Pin; Singh, Vinod K. *Journal of the American Chemical Society* 1987, 109, 7925.
- (112) Das, S.; Brudvig, G. W.; Crabtree, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 1628.
- (113) Gerloch, M.; Constable, E. C. *Transition Metal Chemistry*; VCH: Weinheim, 1994.
- (114) Vallet, V.; Wahlgren, U.; Grenthe, I. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 14941.
- (115) Breslow, R.; Belvedere, S.; Gershell, L.; Leung, D. *Pure Appl. Chem.* 2000, 72, 333.
- (116) Dey, S.; Pal, K.; Sarkar, S. *Tetrahedron Letters* 2007, 48, 5481.
- (117) Tang, C.-W.; Chen-BinWang; Chien, S.-H. *Thermochimica Acta* 2008, 473, 68.
- (118) Sathyanarayana, D. N. *Electronic Absorption Spectroscopy and Related Techniques*; Universities Press (India): Hyderabad, 2001.
- (119) Xavier, J. L. N.; Ortega, E.; Ferreira, J. Z.; Bernardes, A. M.; Pérez-Herranz, V. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2011, 6, 622
- (120) Ilangoan, S.; Natarajan, P. *Proc. Indian Acad. Sci.(Chem. Sci.)* 1986, 97, 417.
- (121) Nguyen, M. T. D.; Charlot, M.-F.; Aukauloo, A. *J. Phys. Chem. A* 2011, 115, 911.
- (122) Yilmaz, I.; Koçak, M. B. *Polyhedron* 2004, 23, 1279.
- (123) Fortier, S.; Moral, O. G.-d.; Chen, C.-H.; Pink, M.; Roy, J. J. L.; Murugesu, M.; Mindiola, D. J.; Caulton, K. G. *Chem. Commun.* 2012, 48, 11082.
- (124) Marcus, R. A.; Sutin, N. *Biochimica et Biophysica Acta* 1985, 811, 265.

- (125) Liang, Z.-H.; Zhu, Y.-J.; Hu, X.-L. *The Journal of Physical Chemistry B* 2004, *108*, 3488.
- (126) Hay, P. J.; Thiebeault, J. C.; Hoffmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, *97*, 4884.
- (127) Bartecki, A.; Burgess, J.; Kurzak, K. *The Colour of Metal Compounds*; 1^a ed.; Taylor & Francis: Florida, 2000.
- (128) Chandramouli, G. V. R.; Manoharan, P. T. *Inorganic Chemistry* 1987, *26*, 3291.
- (129) Lampeka, Y. D.; Gavrish, S. P. *Polyhedron* 2000, *19*, 2533.
- (130) McCleverty, J. A.; Ward, M. D. *Acc. Chem. Res.* 1998, *31*, 842.
- (131) Feth, M. P., Bolm, C., Hildebrand, J. P., Köhler, M., Beckmann, O., Bauer, M., Ramamonjisoa, R. and Bertagnolli, H. *Chem. Eur. J.* 2003, *9*, 1348.
- (132) Pace, R. J.; Jin, L.; Stranger, R. *Dalton Transactions* 2012, *41*, 11145.
- (133) Neves, A.; Erthal, S. M. D.; Vencato, I.; Ceccato, A. S. *Inorganic Chemistry* 1992, *31*, 4749.
- (134) Romanowski, S. M. d. M.; MachadoII, S. P.; Friedermann, G. R.; Mangrich, A. S.; Hermann, M. d. F.; LimaI, H. O.; Nakagak, S. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2010, *21*, 103.
- (135) Lemke, F. R.; Kubiak, C. P. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1985, 1729.
- (136) Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Spectrometric identification of organic compounds*; John Wiley e Sons, inc.: Nova Iorque, 1991.
- (137) Khusnotdinova, J. R.; Rath, N. P.; Mirica, L. M. *Angewandte Chemie International Edition* 2011, *50*, 5532.
- (138) Powers, D. C.; Ritter, T. *Top Organomet Chem* 2011, *35*, 129.
- (139) McAuley, A.; Whitcombe, T. W. *Inorganic Chemistry* 1988, *27*, 3090.
- (140) Yao, C.-L.; He, L.-P.; Korp, J. D.; Bear, J. L. *Inorganic Chemistry* 1988, *27*, 4389.
- (141) Canty, A. J. *Palladium Complexes Containing Pd(I), Pd(III), or Pd(IV), in Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis* John Wiley & Sons, Inc.: Nova Iorque, 2003.
- (142) Saha, C. R. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* 1980, *42*, 159.
- (143) Serra, O. A.; Pitombo, L. R. M. *Inorganica Chimica Acta* 1978, *31*, 49.
- (144) Kashimura, S.; Yamashita, H.; Murai, Y.; Kera, Y.; Yamashita, N.; Murase, H.; Ishifune, M. *Electrochimica Acta* 2002, *48*, 7.
- (145) Raman, N.; Ravichandran, S.; Thangaraja, C. *J. Chem. Sci.* 2004, *116*, 215.
- (146) Sastri, V. S.; Langfo, C. H. *Canadian Journal of Chemistry* 1969, *47*, 4237.
- (147) Mitra, S.; Holz, R. *J Biol Chem.* 2007, *282*, 7397.
- (148) Noveron, J. C.; Olmstead, M. M.; Mascharak, P. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, *121*, 3553.
- (149) Tyler, L. A.; Noveron, J. C.; Olmstead, M. M.; Mascharak, P. K. *Inorganic Chemistry* 2000, *39*, 357.
- (150) Chatel, S.; Rat, M.; Dijols, S.; Leduc, P.; Tuchagues, J. P.; Mansuy, D.; Artaud, I. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2000, *80*, 239.

- (151) Brines, L. M.; Villar-Acevedo, G.; Kitagawa, T.; Swartz, R. D.; Lugo-Mas, P.; Kaminsky, W.; Benedict, J. B.; Kovacs, J. A. *Inorganica Chim Acta* 2008, **361**, 1070.
- (152) Benini, S.; Rypniewski, W. R.; Wilson, K. S.; Miletto, S.; Ciurli, S.; Mangani, S. *Structure* 1999, **7**, 205.
- (153) Carlsson, H.; Nordlander, E. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2010, doi:10.1155/2010/364891.
- (154) Chelikani, P.; Fita, I.; Loewen, P. C. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004, **61**, 192.
- (155) Yang, J. Y.; Nocera, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, **129**, 8192.
- (156) Gray, T. G.; Veige, A. S.; Nocera, D. G. *Journal of American Chemical Society* 2004, **126**, 9760.
- (157) Oliveri, I. P.; Maccarrone, G.; Bella, S. D. *J. Org. Chem.* 2011, **76**, 8879–8884.
- (158) Oppolzer, W.; Schröder, F. *Tetrahedron Letters* 1994, **35**, 7939.
- (159) Wei, G.; Chalker, J. M.; Cohen, T. *Journal of Organic Chemistry* 2011, **76**, 7912.
- (160) Lehmkuhl, H.; Nehl, H. *Journal of Organometallic Chemistry* 1973, **60**, 1.
- (161) Deng, K.; Chalker, J.; Yang, A.; Cohen*, T. *Organic Letters* 2005, **7**, 3637.
- (162) Dyson, P. J.; McIndoe, J. S. *Transition Metal Carbonyl Cluster Chemistry*; Gordon and Breach Science Publishers: Amsterdam, 2000.
- (163) Lehninger *Principles of Biochemistry*; 4th ed.
- (164) Boyer, P. D. *Annu. Rev. Biochem.* 1960, **29**, 15.
- (165) Eisenmesser, E. Z.; Bosco, D. A.; Akke, M.; Kern, D. *Science* 2002, **295**.
- (166) Yon, J.; Perahia, D.; Ghélis, C. *Biochimie* 1998, **80**, 33.
- (167) Veliky, I. A.; McLean, R. J. C. *Immobilized Biosystems: Theory and practical applications*; Blackie Academic & Professional: Glasgow, 1994.
- (168) Kim, D. K.; Mikhaylova, M.; Zhang, Y.; Muhammed, M. *Chemistry of Materials* 2003, **15**, 1617.
- (169) Kittel, C. *Physical Review* 1946, **70**, 965.
- (170) Kittel, C. *Introduction to solid state physics*; 7 ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New York, 1996.
- (171) McCurrie, R. A. *Ferromagnetic Materials - structure and properties*; Academic Press: Bradford, Inglaterra, 1994.
- (172) Dattagupta, S. *A paradigm called magnetism*; World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Cingapura, 2008.
- (173) É. du Trémolet de Lacheisserie; D. Gignoux; M. Schlenker *Magnetism fundamentals*; Springer: Nova Iorque, 2005.
- (174) Knobel, M. *Revista Brasileira de Ensino de Física* 2000, **22**, 387.
- (175) *Immobilization of enzymes and cells*; 2nd ed.; Humana Press Inc.: New Jersey, 2006.
- (176) Kim, J.; Grate, J. W.; Wang, P. *Chemical Engineering Science* 2006, **61**, 1017.
- (177) Sharma, A.; Qiang, Y.; Antony, J.; Meyer, D.; Kornacki, P.; Paszczyński, A. *IEEE Transactions on Magnetics* 2007, **43**, 2418.
- (178) Joshi, M. D.; Sidhu, G.; Pot, I.; Brayer, G. D.; Withers, S. G.; McIntosh, L. P. *Journal of Molecular Biology* 2000, **299**, 255.

- (179) Ge, J.; Lu, D.; Liu, Z.; Liu, Z. *Biochemical Engineering Journal* 2009, 44, 53.
- (180) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme and Microbial Technology* 2007, 40, 1451.
- (181) Bahar, T.; Çelebi, S. S. *Enzyme and Microbial Technology* 1998, 23, 301.
- (182) Schultz, N.; Metreveli, G.; Franzreb, M.; Frimmel, F. H.; Syltatk, C. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2008, 66, 39.
- (183) Kondo, A.; Fukuda, H. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1997, 84, 337.
- (184) Bílková, Z.; Slováková, M.; Horák, D.; Lenfeldc, J.; Churáček, J. *Journal of Chromatography B* 2002, 770, 177.
- (185) Hong, J.; Xu, D.; Gong, P.; Ma, H.; Dong, L.; Yao, S. *Journal of Chromatography B* 2007, 850, 499.
- (186) Sulek, F.; Drofenik, M.; Habulin, M.; Knez, Z. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2010, 322, 179.
- (187) Demirel, D.; Mutlu, M. *Journal of Food Engineering* 2005, 70, 1.
- (188) Demirel, D.; Özdural, A. R.; Mutlu, M. *Journal of Food Engineering* 2004, 64, 417.
- (189) Zeng, L.; Luo, K.; Gong, Y. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2006, 38, 24.
- (190) Guo, Z.; Bai, S.; Sun, Y. *Enzyme and Microbial Technology* 2003, 32, 776.
- (191) Iman, M.; Çelebi, S. S.; Özdural, A. R. *Reactive Polymers* 1992, 17, 325.
- (192) Pan, C.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Ye, H.; Zeng, X. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2009, 61, 208.
- (193) Hsieh, H.-C.; Kuan, I.-C.; Lee, S.-L.; Tien, G.-Y.; Wang, Y.-J.; Yu, C.-Y. *Biotechnology Letters* 2009, 31, 557.
- (194) Wang, W.; Deng, L.; Peng, Z. H.; Xiao, X. *Enzyme and Microbial Technology* 2007, 40, 255.
- (195) Lei, L.; Bai, Y.; Li, Y.; Yi, L.; Yang, Y.; ChunguXia *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2009, 321, 252.
- (196) Chen, J.-P.; Lin, W.-S. *Enzyme and Microbial Technology* 2003, 32, 801.
- (197) Kuroiwa, T.; Noguchi, Y.; Nakajima, M.; Sato, S.; Mukataka, S.; Ichikawa, S. *Process Biochemistry* 2008, 43, 62.
- (198) Öztürk, N.; Akgöl, S.; Arısoy, M.; Denizli, A. *Separation and Purification Technology* 2007, 58, 83.
- (199) Valdés-Solís, T.; Rebolledo, A. F.; Sevilla, M.; Valle-Vigón, P.; Bomatí-Miguel, O.; Fuertes, A. B.; Tartaj, P. *Chemistry of Materials* 2009, 21, 1806.
- (200) Liang, Y.-Y.; Zhang, L.-M.; Li, W.; Chen, R.-F. *Colloid & Polymer Science* 2007, 285, 1193.
- (201) Jeong, J.; Ha, T. H.; Chung, B. H. *Analytica Chimica Acta* 2006, 569, 203.
- (202) Bayramoglu, G.; Yilmaz, M.; Arica, M. Y. *Bioresource Technology* 2010, 101, 6615.
- (203) Wang, F.; Guo, C.; Liu, H.-Z.; Liu, C.-Z. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2007, 48, 1.

- (204) Akgöl, S.; Denizli, A. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2004, 28, 7.
- (205) Vinals, C.; Depiereux, E.; Feytmans, E. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993, 1, 182.
- (206) Chistoserdova, L.; Laukel, M.; Portais, J.-C.; Vorholt, J. A.; Lidstrom, M. E. *Journal of Bacteriology* 2004, 186, 22.
- (207) Labrou, N. E.; Rigden, D. J. *Biochem. J.* 2001, 354, 455.
- (208) Andreadeli, A.; Platis, D.; Tishkov, V.; Popov, V.; Labrou, N. E. *FEBS Journal* 2008, 275, 3859.
- (209) Schmidt, T.; Michalik, C.; Zavrel, M.; Spieß, A.; Marquardt, W.; Ansorge-Schumacher, M. B. *Biotechnol. Prog.* 2010, 26, 73.
- (210) Yoshimoto, M.; Yamasaki, R.; Nakao, M.; Yamashita, T. *Enzyme and Microbial Technology* 2010, 46, 588.
- (211) Talaie, A.; Boger, Z.; Romagnoli, J. A.; Adeloju, S. B.; Yuan, Y. J. *Synthetic Metals* 1996, 83, 21.
- (212) Yuan, Y. J.; Zhao, H.; Wallace, G. G.; Adeloju, S. B. *Electrochemistry Communications* 2000, 2, 27.
- (213) Maka, K. K. W.; Wollenberger, U.; Scheller, F. W.; Renneberg, R. *Biosensors and Bioelectronics* 2003, 18, 1095.
- (214) Wichmann, R.; Wandrey, C.; Bückmann, A. F.; Kula, M.-r. *Biotechnology and Bioengineering* 1981, 23, 2789.
- (215) Hofstetter, K.; Lutz, J.; Lan, I.; Witholt, B.; Schmid, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 2163
- (216) Mädje, K.; Schmölzer, K.; Nidetzky, B.; Kratzer, R. *Microbial Cell Factories* 2012, 11, 7.
- (217) Kuwabata, S.; Tsuda, R.; Nishida, K.; Yoneyama, H. *Chemistry Letters* 1993, 1631.
- (218) Amao, Y.; Watanabe, T. *Chemistry Letters* 2004, 33, 1544.
- (219) Kaiser, R.; Holmquist, B.; Hempel, J.; Vallee, J. B. L.; Jornvall, H. *Biochemistry* 1988, 27, 1132.
- (220) Persson, B.; Hedlund, J.; Jörnvall, H. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008, 65 3879
- (221) Tanaka, N.; Kusakabe, Y.; Ito, K.; Yoshimoto, T.; Nakamura, K. T. *J. Mol. Biol.* 2002, 324 519.
- (222) Tsuru, D.; Oda, N.; Matsuo, Y.; Ishikawa, S.; Ito, K.; Yoshimoto, T. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1997, 61, 1354.
- (223) Imamura, C.; Shigemori, Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010, 74, 1462.
- (224) Badihi-Mossberg, M.; Buchner, V.; Rishpon, J. *Electroanalysis* 2007, 19, 2015
- (225) Klotzbach, T. L.; Watt, M.; Ansari, Y.; Minteer, S. D. *Journal of Membrane Science* 2008, 311, 81.
- (226) Addo, P. K.; Arechederra, R. L.; Minteer, S. D. *Electroanalysis* 2010, 22, 807
- (227) Jiang, Z.; Wu, S. X. a. H. *Studies in Surface Science and Catalysis* 2004, 153, 475.
- (228) Madhusudhana, M. C.; Raghavarao, K. S. M. S.; Nene, S. *Biochemical Engineering Journal* 2008, 38, 414.
- (229) Elinman, J. P.; Welsh, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976, 70, 878.

- (230) Magonet, E.; Hayen, P.; Delforge, D.; Delaive, E.; Remacle, J. *Biochem. J.* 1992, 287, 361.
- (231) Veillon, C.; Sytkowski, A. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975, 67, 1494.
- (232) Saboury, A. A.; Miroliaie, M.; Nemat-Gorgani, M.; Moosavi-Movahedi, A. A. *Thermochimica Acta* 1999, 326, 127.
- (233) Lundquist, F. *Methods of Biochemical Analysis* 1959, 7, 217.
- (234) Kristoffersen, L.; Smith-Kielland, A. *Journal of Analytical Toxicology* 2005, 29, 387.
- (235) Cornell, N. W.; Veech, R. L. *Analytical Biochemistry* 1983, 132, 418.
- (236) Peterson, R. L.; Rodgerson, D. O. *Clinical Chemistry* 1974, 20, 820.
- (237) Leth, P. M.; Gregersen, M. *Forensic Science International* 2005, 155, 179.
- (238) Irwin, A. J.; Jones, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 556.
- (239) Drauz, K.; Gröger, H.; May, O. *Enzyme Calysis in Organic Synthesis* Wiley VCH: Weinheim, 2012; Vol. 1.
- (240) Smith, E. L.; Landon, M.; Piskiewicz, D.; Brattin, W. J.; Langley, T. J.; Melamed, M. D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1970, 67, 724.
- (241) Engel, P. C.; Chen, S.-S. *Biochem. J.* 1975, 151, 305.
- (242) Zantema, A.; Vogel, H. J.; Robillard, G. T. *Eur. J. Biochem.* 1979, 96, 453.
- (243) Rife, J. E.; Cleland, W. W. *Biochemistry* 1980, 19, 2321.
- (244) Ödman, P.; Wellborn, W. B.; Bommarius, A. S. *Tetrahedron: Asymmetry* 2004, 15, 2933.
- (245) El-Zahab, B.; Donnelly, D.; Wang, P. *Biotechnology and Bioengineering* 2008, 99, 508.
- (246) Pasco, N.; Jeffries, C.; Davies, Q.; Downard, A. J.; Roddick-Lanzilott, A. D.; Gorton, L. *Biosensors and Bioelectronics* 1999, 14, 171.
- (247) Tang, L.; Zhu, Y.; Xu, L.; Yang, X.; Li, C. *Talanta* 2007, 73, 438.
- (248) Azmi, N. E.; Ahmad, M.; Abdullah, J.; Sidek, H.; Heng, L. Y.; Karuppiyah, N. *Analytical Biochemistry* 2009, 388, 28.
- (249) Stöber, W.; Fink, A. *Journal of Colloid and Interface Science* 1968, 26, 62.
- (250) Du, G. H.; Liu, Z. L.; Xia, X.; Chu, Q.; Zhang, S. M. *Journal of Sol-Gel Science Technology* 2006, 39, 285.
- (251) Nash, T. *Biochem. J.* 1953, 55, 416.
- (252) Ma, M.; Zhang, Y.; Yu, W.; Shen, H.-y.; Zhang, H.-q.; Gu, N. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2003, 212, 219.
- (253) Tynan-Connolly, B. M.; Nielsen, J. E. *Protein Science* 2007, 16, 239.
- (254) Vivian, J. T.; Callis, P. R. *Biophysical Journal* 2001, 80, 2093.
- (255) Saviotti, M. L.; Galley, W. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1974, 71, 4154.
- (256) Gabellieri E; Strambini GB; P., G. *Biophys. Chem.* 1988, 30, 61.
- (257) Tamayo, J.; García, R. *Appl. Phys. Lett.* 1997, 71, 2394.
- (258) Leskovac, V.; Trivic, S.; Pericin, D.; Popovic, M.; Kandrak, J. J. *Serb. Chem. Soc.* 2010, 75, 185.
- (259) Schellenger, K. A. *J. Biol. Chem.* 1965, 240, 1165.
- (260) Schellenberg, K. A. *J. Biol. Chem.* 1966, 241, 2446.
- (261) Schellenberg, K. A. *J. Biol. Chem.* 1967, 242, 1815.

- (262) Biellmann, J.-F.; Jung, M. J. *Eur. J. Biochem.* 1971, 19, 130.
- (263) Cook, P. F.; Cleland, W. W. *Biochemistry* 1981, 20, 1805.
- (264) Klinman, J. P. *The Journal of Biological Chemistry* 1975, 250, 2569.
- (265) Kiralp, S.; Topcu, A.; Bayramoglu, G.; Arica, M. Y.; Toppare, L. *Sensors and Actuators B* 2008, 128, 521.
- (266) Klinman, J. P. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 1981, 10, 39.
- (267) Nagel, Z. D.; Meadows, C. W.; Dong, M.; Bahnson, B. J.; Klinman, J. P. *Biochemistry* 2012, 51, 4147–4156.
- (268) Andersson, P.; Kvassman, J.; Lindstrom, A.; Olden, B.; Pettersson, G. *Eur. J. Biochem.* 1981, 113, 425.
- (269) Dickinson, F. M. *Biochem. J.* 1970, 120, 821.
- (270) Lineweaver, H.; Burk, D. J. *Am. Chem. Soc.* 1934, 56, 658.
- (271) Mortimer, R. G.; Eyring, H. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America- Physical Sciences* 1980, 77, 1728.
- (272) Adams, P. D.; Chen, Y.; Ma, K.; Zagorski, M. G.; Sönnichsen, F. D.; McLaughlin, M. L.; Barkley, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 9278.
- (273) D'Auria, S.; Lakowicz, J. R. *Analytical biotechnology* 2001, 12, 99.
- (274) Chen, S.; Burgner, J. W.; Krahn, J. M.; Smith, J. L.; Zalkin, H. *Biochemistry* 1999, 38, 11659.
- (275) Blanchard, J. S.; Cleland, W. W. *Biochemistry* 1980, 19, 3543.
- (276) Alekseeva, A. A.; Savin, S. S.; Tishkov, V. I. *Acta Naturae* 2011, 3, 38.
- (277) Wharton, C. W. *Biochem. J.* 1986, 233, 25.
- (278) Tuma, R. *Journal of Raman Spectroscopy* 2005, 36, 307.
- (279) Carey, P. R.; Storer, A. C. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1984, 13, 25.
- (280) Carey, P. R.; Tonge, P. J. *Acc. Chem. Res.* 1995, 28, 8.
- (281) Netto, C. G. C. M.; Nakamatsu, E. H.; Netto, L. E. S.; Novak, M. A.; Zuin, A.; Nakamura, M.; Araki, K.; Toma, H. E. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2011, 105, 738.
- (282) Bigdeli, S.; Talasaz, A. H.; Stahl, P.; Persson, H. H. J.; Ronaghi, M.; Davis, R. W.; Nemat-Gorgani, M. *Biotechnology and Bioengineering* 2008, 100, 19.
- (283) Fisher, H. F.; Tally, J. *Biochemistry* 1997, 36, 10807.
- (284) Peterson, P. E.; Smith, T. J. *Structure* 1999, 7, 769.
- (285) Smith, T. J.; Schmidt, T.; Fang, J.; Wu, J.; Siuzdak, G.; Stanley, C. A. *Journal of Molecular Biology* 2002, 318, 765.
- (286) Fang, J.; Hsu, B. Y. L.; Macmullen, C. M.; Poncz, M.; Smith, T. J.; Stanley, C. A. *Biochem. J.* 2002, 363.
- (287) Trost, B. M. *Comprehensive Organic Synthesis*; Pergamon: Oxford, 1991; Vol. 8.

15.APENDICE

15.1.Ligante simétrico, BPP(OH,OH)

O ligante BPP(OH,OH) foi sintetizado a partir dos compostos **(4)** e **(8)** por uma reação de substituição nucleofílica do tipo S_N2 em DMF seco na presença de carbonato de potássio. Após a purificação do produto em coluna cromatográfica, obteve-se um rendimento de 35% do ligante na forma de um sólido amarelado, o qual foi analisado por ¹H RMN, ¹³C RMN, COSY, NOESY, HSQC, espectrometria de massas, espectrofotometria no infravermelho e termogravimetria.

Pelo espectro de ¹H RMN, Figura 164, observa-se em 1.2 ppm um singlete com integração igual a 3 referente à metila do fenol, seguido de um multipeto em 1.5 ppm de integração 2, referente a um dos hidrogênios do carbono γ do anel pirrolidínico. O segundo multipeto está em 1.6 ppm, com integração igual a 2, referente ao segundo hidrogênio presente no carbono γ do anel pirrolidínico. Um terceiro multipeto com integração igual a 2, está presente em 1.8 ppm devido a um hidrogênio presente no carbono β do anel pirrolidínico. Um quarto multipeto com centro em 2.0 ppm e integral 2 é devido ao segundo hidrogênio do carbono β do anel pirrolidínico. Há então, um singlete com integral igual a 2 em 2.15 ppm resultante dos alcoóis não fenólicos. Mais a frente, observa-se dois multipetos, um situado em 2.39 ppm e o outro em 2.82 ppm, cada um com integral igual a 2, correspondendo aos hidrogênios do carbono δ do anel pirrolidínico. Um singlete com integração igual a 1 em 3.24 ppm é devido ao –OH

fenólico. Junto deste singlete, há um conjunto de sinais parecido com um quarteto, porém, não se caracteriza um quarteto, pois o acoplamento entre os sinais é de 20 e 60. A integração destes sinais é igual a 4, indicando que há um acoplamento entre os metilenos do fenol e o anel pirrolidínico. Um duplo dubleto é encontrado em 3.97 ppm, com integral igual a 2 e $J_1 = 9.1$ e $J_2 = 4.7$, resultante do hidrogênio quiral do anel pirrolidínico. Em 6.6 ppm um singlete correspondente aos hidrogênios do fenol possui integração 2. Na região dos aromáticos, quatro tripletos (7.15, 7.17, 7.20, 7.23 ppm, $J = 2$), cada um com integral igual a 1, correspondem aos hidrogênios da posição *para* das fenilas. Um multipletto com integral igual a 8 e constante de acoplamento igual a 3, indicam os hidrogênios meta das fenilas. Finalmente, dois multipletos situados em 7.58 ppm e 7.71 ppm, com integrações igual a 4 e constante de acoplamento de 10, correspondem aos hidrogênios na posição *orto* das fenilas.

O espectro de ^{13}C RMN, **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, apresenta um pico em 23.97 ppm devido à metila do fenol, um pico em 24.85 ppm e outro em 28.95 ppm correspondendo aos carbonos γ e β do anel pirrolidínico, respectivamente. Em 45.98 ppm está situado um sinal do metileno ligado ao grupo fenol. O carbono ligado diretamente ao nitrogênio do anel pirrolidínico possui um pico em 54.94 ppm, já o carbono α do anel está situado em 69.20 ppm. Em 85.80 ppm aparece o pico do carbono quaternário. Seguindo no espectro, os próximos sinais estão na região dos aromáticos, devido às fenilas e ao fenol do BPP(OH,OH). Em 125.43 ppm estão os carbonos *orto* do fenol. Com relação às fenilas, os sinais aparecem em 125.91 ppm, 125.91 ppm e 128.26 ppm devido aos carbonos *para*, *orto* e *meta*, respectivamente. Já os carbonos *para* e *meta* do fenol aparecem em 128.52 ppm e 140.22 ppm, respectivamente. Em 143.25 ppm estão os carbonos fenílicos ligados ao carbono quaternário e por fim, em 160.41 ppm está o sinal do carbono ligado ao $-\text{OH}$ do fenol.

Existem pequenos picos localizados próximos aos picos principais neste espectro de ^{13}C RMN devido a outras conformações do BPP(OH,OH).

Figura 164. Espectro ^1H RMN do ligante BPP(OH,OH).

Figura 165. Espectro de ^{13}C RMN do ligante BPP(OH,OH).

O espectro HETCOR indica que as atribuições feitas para ^{13}C e ^1H foram corretas: como pode ser visto na Figura 166, a linha preta indica a metila do fenol, a linha azul clara, o carbono β e seus respectivos hidrogênios, a linha verde, o carbono γ , a linha vermelha, o carbono δ . Já a linha rosa corresponde aos metilenos ligados ao fenol e a linha roxa ao carbono α do anel pirrolidínico. As linhas cinza indicam as correspondências aromáticas e por saírem encavaladas, não foram atribuídas por HETCORR.

Figura 166. Espectro HETCORR do ligante BPP(OH,OH).

O espectro COSY indica o acoplamento entre o hidrogênio do carbono α com os dois hidrogênios do carbono γ do anel pirrolidínico, mostrado em rosa na Figura 167. Já os hidrogênios do carbono β acoplam com os hidrogênios do carbono δ , como indicado na Figura 167 em verde. Os hidrogênios do carbono δ , também acoplam com os

hidrogênios dos metilenos ligados ao fenol, assim indicado em azul escuro na Figura 167. Os hidrogênios do carbono β , também acoplam com os hidrogênios do carbono γ , como indicado em azul claro na Figura 167.

Figura 167. Espectro COSY do ligante BPP(OH,OH).

Foi possível atribuir a estrutura tridimensional do ligante BPP(OH,OH) através da análise do espectro NOESY (Figura 168), em que um dos hidrogênios do carbono γ acopla com os hidrogênios do carbono α , do metileno, do carbono β e do carbono γ (Figura 168, em rosa). Um dos hidrogênios do carbono γ acopla com o hidrogênio do carbono α (Figura 168, em azul). O hidrogênio do carbono β acopla com um hidrogênio do carbono δ e com um hidrogênio do metileno ligado ao fenol (Figura 168, em preto). O hidrogênio do carbono α também acopla com dois hidrogênios fenílicos, indicando a sua proximidade a estes grupos (Figura 168, em marrom). O hidrogênio do carbono γ também acopla com um hidrogênio aromático, porém, com o

aromático do fenol (Figura 168 em vermelho), o qual acopla com um hidrogênio da metila do fenol (Figura 168 em cinza).

Figura 168. Espectro NOESY do ligante BPP(OH,OH). Abaixo pode ser visto a ampliação na região entre 1 e 4.5 ppm.

Pelo espectro de massas de alta resolução, Figura 169, observa-se a massa do íon $C_{43}H_{47}N_2O_3^+$ em m/z 639.3578, com apenas 1.2 ppm de diferença entre a massa teórica (m/z teórico= 639.3586), caracterizando a formação do ligante BPP(OH,OH) como esperado.

Figura 169. Espectro de massas ESI⁺ de alta resolução do BPP(OH,OH).

Já o espectro no infravermelho do ligante BPP(OH,OH), Figura 170, apresenta bandas de estiramento C-H entre 3088 e 3000 cm^{-1} , indicando a presença de carbonos aromáticos e alifáticos. A banda de estiramento C-O fenólico está centrada em 1249 cm^{-1} . Em 1060 cm^{-1} situa-se uma banda de estiramento C-N. Nota-se também a presença de uma banda não muito intensa em 1729 cm^{-1} , a qual foi atribuída como deformação de O-H. Esta banda é de grande importância para a análise dos espectros de infravermelho dos complexos metálicos, pois provável que esta banda seja deslocada para números de onda menores nos complexos devido à complexação dos álcoois com os metais.

Figura 170. Espectro no infravermelho do ligante BPP(OH,OH).

Uma análise termogravimétrica também foi feita para que se soubesse a estabilidade térmica do ligante e que pudéssemos comparar com a estabilidade térmica dos complexos obtidos com este ligante. Verifica-se que o ligante é estável até 64 °C, havendo uma perda de 5 % em massa entre 65 °C e 170 °C devido à saída de água. Após este ponto, o restante da parte orgânica é degradado como pode ser visto na Figura 171.

Figura 171. Termogravimetria do ligante BPP(OH,OH) (linha preta) de 20°C a 700°C em ar sintético e sua primeira derivada (linha vermelha).

Com isto, podemos afirmar que o ligante BPP(OH,OH) foi obtido com sucesso e conseguimos seguir a diante para a análise comparativa com os outros ligantes e também para posterior uso em complexação de metais.

15.2 Ligante simétrico, BPP(OPPh₂,OPPh₂)

O ligante BPP(OPPh₂,OPPh₂) foi sintetizado a partir da redução de seu derivado oxidado (**10**) com níquel de Raney, o qual é utilizado para a remoção de enxofre em moléculas orgânicas.²⁸⁷ Devido ao fato do fosfinito resultante (**14**) ser facilmente hidrolisado e oxidado com a exposição ao ar, mostraremos as caracterizações feitas para o seu precursor, o tiofosfinato (**10**).

Como o BPP(OPPh₂S,OPPh₂S) é muito similar ao ligante BPP(OH,OH), apenas os espectros de ¹H, ¹³C, ³¹P RMN e NOESY serão discutidos, baseando-se nas diferenças entre os ligantes. Neste caso, o que os diferencia são as fenilas do fosfinito adicionado ao ligante. Observando o espectro de RMN de ¹H (Figura 172) vê-se que o espectro de 1,2 ppm a 7,0 ppm é muito similar ao espectro do BPP(OH,OH). Desta forma, partiu-se para analisar a região dos aromáticos: dois singletos com integral 2 aparecem em 7,02 ppm, sendo correlacionados com os prótons do fenol (Figura 173, prótons 9). Um multipeto em 7,05 ppm com integral igual a 3 é devido aos prótons de uma fenila (Figura 173, prótons 10). Simetricamente a esta fenila estão os prótons de outra fenila em 7,11 ppm com um conjunto de tripletos com constante de acoplamento igual a 3 e integral igual a 3 (Figura 172, prótons 11). As duas outras fenilas aparecem com multipletos em 7,16 ppm (Figura 173, prótons 12) e 7,20 ppm (Figura 173, prótons 13) com integrais 3 e 4. Um sinal em 7,23 ppm com integral igual a 3 resulta de três hidrogênios na posição para dos fosfinitos (Figura 173, prótons 14). Um multipeto com

integral 5 centrado em 7,26 ppm resulta de um hidrogênio na posição *para* dos fosfinitos e quatro hidrogênios na posição *meta* dos fosfinitos (Figura 173, prótons 15). Os outros hidrogênios em *meta* dos fosfinitos aparecem em 7.32 ppm com integral 5 (Figura 173, prótons 16). Os prótons *orto* de uma das fenilas ligadas ao carbono quaternário aparecem em 7,45 ppm e possuem integral igual a 2 (Figura 173, prótons 17), enquanto os referentes à outra fenila, aparecem em 7,56 ppm (Figura 173, prótons 18). Quanto às fenilas do tiofosfinato, em 7,61 ppm e 7,77 ppm estão dois multipletos com integral igual a 2 e 6, respectivamente, que são correspondentes aos hidrogênios na posição *orto* (Figura 173, prótons 19 e 20).

Figura 172. Espectro de ^1H RMN do ligante BPP(OPPh₂S,OPPh₂S).

Figura 173. Expansão da região dos aromáticos do espectro de ^1H RMN do ligante $\text{BPP}(\text{OPPh}_2\text{S}, \text{OPPh}_2\text{S})$.

Indo para os sinais de carbonos aromáticos, encontramos em 126,2 ppm (H) os carbonos *orto* do fenol, em 126,6 ppm (I) estão os carbonos na posição *para* dos aromáticos não ligados ao fósforo. Em 126,7 ppm (J) estão os carbonos na posição *orto*, mais distantes do enxofre dos aromáticos não ligados ao fósforo, enquanto os carbonos *orto* mais próximos ao enxofre em uma estrutura 3D estão situados em 127,5 ppm (K). Os carbonos diretamente ligados ao fósforo estão situados em 127,7 ppm (L). Assim como para os aromáticos não ligados ao fósforo, os carbonos *meta* dos aromáticos ligados ao fósforo também possuem diferenciação quanto à proximidade do enxofre, situando-se em 128,3 ppm (M) e 128,4 ppm (N). Os carbonos *meta* das outras duas fenilas estão em 128,5 ppm (O) e 128,6 ppm (P). Em 128,9 ppm (Q) e 129,2 ppm (R) estão os carbonos *meta* e *para* do fenol, respectivamente. Os carbonos *orto* das fenilas ligadas ao fósforo estão em 129,4 ppm (S) e 130,3 ppm (T), enquanto os carbonos *para* destas mesmas fenilas estão em 138,1 ppm (U). Em 147,6 ppm (V) encontramos os carbonos das fenilas ligadas diretamente ao carbono quaternário e em 162,7 ppm (X) está o carbono do fenol ligado a hidroxila.

Figura 174. Espectro ^{13}C RMN do composto (10).

O espectro de ^{31}P RMN mostrado na Figura 175, apresenta dois sinais de fósforo no estado de oxidação 5+: um em 80,7 ppm e o outro em 80,9 ppm, indicando a existência de dois centros do tipo tiofosfinato.

Figura 175. ^{31}P RMN do composto **(10)** .

Já pelo COSY do composto **(10)**, Figura 176, em vermelho pode-se verificar que um hidrogênio δ do anel pirrolidínico acopla com o outro hidrogênio δ , com os hidrogênios γ e com o hidrogênio α . O outro hidrogênio do carbono δ , acopla com o hidrogênio α (Figura 176 em azul), enquanto um hidrogênio γ acopla com os dois hidrogênios β (Figura 176 em verde), que por sua vez, acoplam entre si (Figura 176, em roxo).

Analisando-se o HETCOR do composto **(10)**, verifica-se que o sinal em 24.11 ppm acopla com aos hidrogênios presentes no singlete em 2,25 ppm (Figura 177, em vermelho), sendo portanto devido à metila do fenol. O sinal em 30,0 ppm é referente aos carbonos e hidrogênios γ do anel pirrolidínico (Figura 177, em azul). Em amarelo, na Figura 177, está o acoplamento entre o carbono δ e os hidrogênios δ do anel

pirrolidínico. Em verde, verifica-se o acoplamento do carbono β e seus respectivos hidrogênios (3,3 ppm e 3,7 ppm). Em rosa, está o acoplamento de um dos hidrogênios do metileno (5,05 ppm) com seu respectivo carbono (66,7 ppm) e finalmente, em marrom está evidenciado o acoplamento entre o hidrogênio quiral (α -pirrolidínico) e seu respectivo carbono em 67,4 ppm.

Figura 176. À esquerda: representação esquemática dos acoplamentos COSY no composto (10) e à direita está o espectro COSY do composto (10).

Para uma análise da estrutura 3D do composto (10) fez-se um NOESY, o qual pode ser visto na Figura 178. Verifica-se que os prótons β do anel pirrolidínico encontram-se próximos a uma fenila e acoplam com os prótons γ e α (Figura 178, linha vermelha e azul escuro). Os prótons γ do anel pirrolidínico acoplam com os prótons α e δ (Figura 178, linha amarela). Estes últimos, por sua vez, acoplam entre si, com o próton α (Figura 178, linha verde) e com uma fenila (Figura 178, linha rosa). O próton

α apresenta-se próximo a prótons fenílicos, como pode ser observado na Figura 178 em azul claro.

Figura 177. À esquerda: representação esquemática dos acoplamentos HETCOR no composto (10) e à direita está o espectro HETCOR do composto (10).

Figura 178. NOESY do composto (10).

Pelo infravermelho, observa-se uma banda referente ao estiramento OH em 3480 cm^{-1} (Figura 179, A). Na região entre 3020 e 2800 cm^{-1} existem sinais de estiramento C-H (Figura 179, B). Duas bandas referentes à vibração de anel aromático se encontram em 1730 cm^{-1} e 1445 cm^{-1} como pode ser observado na Figura 179, C e D. Finalmente, em E, região de 1106 cm^{-1} , observa-se o estiramento P-O-C, referente a existência de grupos fosfinatos no composto **(10)**.

Figura 179. Espectro no infravermelho do composto **(10)**.

A análise térmica do ligante simétrico $\text{BPP}(\text{OPh}_2\text{S}, \text{OPh}_2\text{S})$ indica que esta molécula é mais estável termicamente que o ligante $\text{BPP}(\text{OH}, \text{OH})$, iniciando a sua decomposição em $168\text{ }^{\circ}\text{C}$, o que acarreta na perda de 65 % da massa até $295\text{ }^{\circ}\text{C}$. A massa resultante é reduzida a 20 % da massa inicial entre $295\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $525\text{ }^{\circ}\text{C}$, como pode ser visto na Figura 180.

Figura 180. Análise termogravimétrica do composto (**10**).

Com estas caracterizações pode-se afirmar que o composto (**10**) foi obtido com sucesso para a sua posterior redução e uso na complexação de paládio.

15.3 Ligante assimétrico, BPP(OH,OPPh₂)

O ligante BPP(OH,OPPh₂) foi sintetizado a partir da redução de seu derivado oxidado (**12**) com níquel de Raney, o qual é utilizado para a remoção de enxofre em moléculas orgânicas.²⁸⁷ Devido ao fato do fosfinito resultante (**13**) ser facilmente hidrolisado e oxidado com a exposição ao ar, mostraremos as caracterizações feitas para o seu precursor, o tiofosfinato (**12**). Este ligante é em parte parecido com o BPP(OH,OH) e em parte parecido com o BPP(OPPh₂S,OPPh₂S) os quais já foram amplamente discutidos, portanto a análise de seus espectros de ¹H RMN, ¹³C RMN, COSY, HETCOR e NOESY não serão discutidas em profundidade aqui. Apenas indicaremos as maiores diferenças entre os espectros.

Desta forma, verifica-se uma enorme semelhança entre o espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H com os outros ligantes. Na Figura 181, vê-se que os prótons da metila da posição *-para* do fenol encontram-se em 2,76 ppm, ao invés de 1,24 ppm, como encontrado para os ligantes simétricos. Por ele aparecer em uma região mais

desblindada acredita-se que haja uma proximidade grande das fenilas à metila do fenol. Os sinais referentes aos metilenos em *orto* ao fenol são deslocados para campo mais baixo no BPP(OPPh₂S,OPPh₂S), sendo encontrados em 3,01 e 3,20 ppm ao invés de 3,24 e 3,75 ppm como encontrados no BPP(OH,OH). No caso do ligante assimétrico, estes sinais estão ainda mais deslocados, sendo encontrados em 2,75 e 3,15 ppm. Por haver uma menor simetria no composto **(12)**, observa-se a sobreposição de multipletos na região dos sinais do anel pirrolidínico, sendo difícil a atribuição, observando-se, porém, o número correto de prótons a ser encontrado.

Na região dos aromáticos há uma mistura dos sinais, sendo observado em 6,93 ppm os prótons em *meta* do fenol (Figura 182, prótons 11). Os prótons em *para* e *meta* das fenilas próximas ao grupo –OH encontram-se em 6,97 ppm e 7,05 ppm (Figura 182, prótons 12 e 13), já os em *para* e *meta* das fenilas ligadas ao carbono quaternário próximo ao fosfinito se encontram em 7,12 ppm e 7,14 ppm (Figura 182, prótons 14 e 15). Os prótons em *meta* do fosfinato são encontrados em 7,17 ppm (Figura 182, prótons 16). Os prótons *orto* das fenilas próximas ao fosfinato são encontrados em 7,25 ppm, juntamente com os prótons *orto* e *meta* do fosfinato (Figura 182, prótons 17, 18).

Figura 181. Espectro de ^1H RMN do composto BPP(OH,OPPH₂S).

Figura 182. Ampliação na região dos aromáticos do espectro de ^1H RMN do composto (**12**).

O espectro de ^{13}C RMN do composto (**12**), Figura 183, apresenta sinais em 23,9 ppm, 29,5 ppm, 31,3 ppm e 36,4 ppm devido aos carbonos β e γ diferentes nos dois anéis pirrolidínicos, devido a sua posição espacial. Os carbonos δ , os metilenos e os carbonos α são considerados equivalentes, aparecendo como sinais únicos em 54,95 ppm, 57,7 ppm e 71,3 ppm, respectivamente. Com relação aos carbonos aromáticos, as fenilas próximas ao tiofosfinato apresentam sinais em campo maior que as fenilas próximas ao OH, como pode ser visto na Figura 183.

Desta forma, as fenilas próximas ao $-\text{OH}$ apresentam seus carbonos *-orto* em 125,8 ppm, *-meta* em 126,5 ppm, em *-para* em 125,2 ppm e o carbono ligado diretamente ao carbono quaternário está situado em 146,4 ppm. Já as fenilas próximas ao tiofosfinato apresentam seus carbonos *-orto* em 125,9 ppm, *-meta* em 127,0 ppm, *-para* em 125,7 ppm e o carbono ligado ao carbono quaternário em 147,0 ppm.

As fenilas do tiofosfinato apresentam seus carbonos *-orto* e *-para* em 128,8 ppm, *-meta* em 126,3 ppm, e o carbono ligado diretamente ao fósforo está situado em 126,2 ppm. Finalmente, o fenol apresenta o carbono ligado ao $-\text{OH}$ em 152,6 ppm, os carbonos *-orto* em 123,9 ppm, *-meta* em 128,1 ppm e *-para* em 127,9 ppm.

Figura 183. Espectro ^{13}C RMN do composto (12).

Observando o espectro ^{31}P RMN do composto (**12**), Figura 184, vê-se apenas um sinal de fósforo com oxidação 5+ em 83,0 ppm, indicando a presença do grupo tiofosfinato.

Figura 184. Espectro ^{31}P RMN do composto (**12**).

Como as atribuições mais importantes com relação aos espectros de RMN 2D foram feitas para os ligantes simétricos, não iremos mostrar os espectros 2D para o ligante assimétrico, para evitar repetições. Porém, estes espectros podem ser encontrados nos anexos (Anexos 48-50).

15.4 Complexos - espectro de massas

O complexo $\text{BPP}(\text{ONi}, \text{ONi})$ apresenta o íon com m/z igual a 857,23 é devido à perda de um metileno do acetato e o íon com m/z igual a 797,21 é devido à perda de dois metilenos de dois acetatos, como indicado na Figura 185.

Figura 185. Espectro de massas do complexo BPP(ONi, ONi) e distribuição isotópica.

Como o complexo BPP(OMn, OMn) não é estável a temperatura ambiente, verifica-se que o espectro de massas obtido é apenas de suas decomposições. Como exemplo, o pico em m/z 691,2786 está mostrado na Figura 186, o qual é devido ao complexo sem duas fenilas e a metila.

Os picos com m/z maiores são referentes a perdas graduais de massa orgânica do complexo com o aquecimento durante o processo de ionização.

Figura 186. Espectro de massas do complexo BPP(OMn,OMn) e distribuição isotópica.

Apesar do BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) ser termicamente mais estável que os complexos derivados do ligante BPP(OH,OH), não foi possível obter um espectro de massas do íon molecular intacto. Observa-se que em acetonitrila a massa observada está associada com a perda de um fosfinito, um cloreto e uma fenila, gerando um íon com m/z igual a 974 (Figura 187). Com a adição de água na solução de BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd)Cl₂ em acetonitrila, um íon em m/z 1160 aparece um pouco mais definido, porém, verifica-se também que a amostra sofre hidrólise, devido ao aparecimento de diversas outras massas menores (Figura 188). A massa em m/z 1160 se dá pela perda de uma fenila, uma metila e um cloreto.

Figura 187. Espectro de massas ESI⁺ do complexo $\text{BPP}(\text{OPPh}_2\text{Pd}, \text{OPPh}_2\text{Pd})\text{Cl}_2$ dissolvido em acetonitrila.

Figura 188. Espectro de massas do complexo $\text{BPP}(\text{OPPh}_2\text{Pd}, \text{OPPh}_2\text{Pd})\text{Cl}_2$ em uma mistura acetonitrila:água (4:1, v/v).

Para a análise do espectro de massas, fez-se uma solução do complexo em acetonitrila:água e isolou-se o pico com massa em 1100 (MM $\text{BPP}(\text{OZn}, \text{OPPh}_2\text{Pd}) =$

1099) , fez-se um MS/MS (Figura 189) para determinar se o pico em 1100 era realmente correspondente ao complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd). A massa 1051 corresponde à quebra da metila do fenol e à quebra de um cloreto ligado aos sítios metálicos. Em 918, há a quebra de uma fenila e de todos os cloretos, enquanto a massa em 739 corresponde a saída do fosfinito, com o padrão isotópico de Zn e Pd o que indica a formação do complexo.

Figura 189. Espectro de massas do complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd) tirado de uma solução em acetonitrila:água (4:1, v/v).

O espectro de massas (ESI⁺) do complexo BPP(OC_o,OPPh₂Pd) não nos mostra o íon molecular, porém, nos mostra a massa com *m/z* de 699 devido à quebra deste composto já no injetor, como mostrado na Figura 190. Esta massa apresenta uma mistura dos padrões isotópicos de cobalto e paládio, indicando a formação de tal complexo.

Figura 190. Espectro ESI⁺ do complexo BPP(OC_o,OPPh₂Pd).

ANEXOS

Índice Remissivo de Figuras

Figura 1. Estruturas lineares do Jorgensen.....	37
Figura 2. Estrutura octaédrica de um complexo, proposta por Werner.	37
Figura 3. Possíveis modos de coordenação entre CO ₂ e metal, pelo átomo de carbono. ⁶⁸	39
Figura 4. Complexos enzimáticos em que o gás carbônico está envolvido: (A) Sítio ativo da ribulose 1,5- bifosfato é a Rubisco; (B) sítio ativo da Anidrase Carbônica; (C) sítio ativo da Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase e (D) sítio ativo da Formilmetanofurano desidrogenase.	42
Figura 5. Complexos metálicos para a ativação do gás carbônico.	44
Figura 6. Complexos metálicos capazes de ativar a ligação C-H.	47
Figura 7. Ligantes sintetizados neste trabalho.	49
Figura 8. Termogravimetria do complexo BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅) (linha preta) de 20 °C a 700 °C em ar sintético e sua primeira derivada (linha vermelha). Abaixo: Termoanálise diferencial do complexo BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅).	73
Figura 9. Espectro de Massas do complexo BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅).	74
Figura 10. Espectro eletrônico do complexo BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅) antes (linha sólida) e depois (linha tracejada) de borbulhar CO ₂ em diclorometano com <i>inset</i> de um esquema dos orbitais HOMO ⁻ e LUMO ⁺ dos respectivos complexos.	75
Figura 11. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅) em DMF TBAClO ₄ 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletroquímica respectiva ao processo de oxidação em evidência do complexo BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅).	76
Figura 12. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅) em DMF TBAClO ₄ 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletroquímica respectiva ao processo de redução em evidência do complexo BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅).	77
Figura 13. Voltametria cíclica anódica em DMF do BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅) após a complexação com CO ₂ (linha preta) e seu respectivo DPV (linha cinza).	78
Figura 14. Voltametria cíclica catódica em DMF do BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅) após a complexação com CO ₂ (linha preta) e seu respectivo DPV (linha cinza).	79
Figura 15. Espectro no infravermelho do complexo BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅) antes (linha preta) e depois (linha cinza) de interagir com CO ₂ . Ao lado estão representações dos possíveis modos de coordenação do CO ₂ no complexo BPP(OC ₂ H ₅ ,OC ₂ H ₅) vistas pelo espectro em cinza.	80
Figura 16. Termogravimetria do complexo BPP(ONi,ONi) (linha preta) de 20°C a 700°C em ar sintético e sua primeira derivada (linha vermelha). Abaixo: Termoanálise diferencial do complexo BPP(ONi,ONi).	82
Figura 17. Espectro eletrônico do complexo BPP(ONi,ONi) em diclorometano.	83
Figura 18. Espectro eletrônico do complexo BPP(ONi,ONi) antes (linha contínua) e depois (linha tracejada) de complexar com gás carbônico.	84
Figura 19. Relação entre o momento efetivo do BPP(ONi,ONi) e a temperatura (A) e relação entre a susceptibilidade magnética e a temperatura (B).	86
Figura 20. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo BPP(ONi,ONi) em DMF TBAClO ₄ 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletroquímica respectiva ao processo de oxidação em evidência do complexo BPP(ONi,ONi).	87
Figura 21. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo BPP(ONi,ONi) em DMF TBAClO ₄ 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletroquímica respectiva ao processo de redução em evidência do complexo BPP(ONi,ONi).	89

Figura 22. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo BPP(ONi,ONi) após borbulhar CO ₂ por 30 minutos em DMF TBAClO ₄ 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletróquímica respectiva ao processo de redução em evidência.	90
Figura 23. Na esquerda: Voltametria cíclica do complexo BPP(ONi,ONi) após borbulhar CO ₂ por 30 minutos em DMF TBAClO ₄ 0.1M como eletrólito. Na direita: Espectroeletróquímica respectiva ao processo de redução em evidência.	90
Figura 24. Espectro no infravermelho do complexo BPP(ONi,ONi) antes (linha preta) e depois (linha cinza) de complexar com CO ₂ . Ao lado estão representações dos possíveis modos de coordenação do CO ₂ no complexo BPP(ONi,ONi) vistas pelo espectro em cinza.	92
Figura 25. Termogravimetria do complexo BPP(OMn,OMn) (linha preta) de 20°C a 700°C em ar sintético e sua primeira derivada (linha vermelha). Abaixo: Termoanálise diferencial do complexo BPP(OMn,OMn).	93
Figura 26. Espectro eletrônico do complexo BPP(OMn,OMn) antes (linha contínua) e depois (linha pontilhada) da complexação com CO ₂	94
Figura 27. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMn,OMn) e suas respectivas espectroeletróquímicas anódicas.	95
Figura 28. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMn,OMn) e sua respectiva espectroeletróquímica no sentido catódico.	96
Figura 29. (A) Voltametria cíclica do complexo BPP(OMn,OMn) após a complexação com gás carbônico e sua respectiva espectroeletróquímica no sentido anódico (C) e (B) Voltametria cíclica do complexo BPP(OMn,OMn) após a complexação com gás carbônico e sua respectiva espectroeletróquímica no sentido catódico (D).	97
Figura 30. Espectro no infravermelho do complexo BPP(OMn,OMn) antes (linha preta) e depois (linha cinza) de complexar com CO ₂ . Ao lado está indicado um possível modo de coordenação do CO ₂ ao BPP(OMn,OMn), deduzido a partir do espectro em cinza.	98
Figura 31. Análise termogravimétrica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) (linha preta) e sua derivada (linha vermelha). Abaixo: Análise térmica diferencial do complexo.	99
Figura 32. Voltametria cíclica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) em acetonitrila e 0.1 M de TBAClO ₄ como eletrólito e sua respectiva análise voltamétrica de pulso diferencial (A). Espectroeletróquímica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) entre 0.5 e 1.2 V (B). Espectroeletróquímica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) entre 1.2 e 1.46 V (B). Espectroeletróquímica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) entre 1.46 e 1.8 V (B).	100
Figura 33. Espectro eletrônico do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)Cl antes (linha contínua) e depois (linha pontilhada) de interagir com gás carbônico.	101
Figura 34. Espectro EPR do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,CO ₂ ,OPPh ₂ Pd) em acetonitrila e 77K.	102
Figura 35. Voltametria cíclica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,CO ₂ ,OPPh ₂ Pd) em acetonitrila e 0.1 M de TBAClO ₄ como eletrólito e sua respectiva análise voltamétrica de pulso diferencial (A). Espectroeletróquímica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,CO ₂ ,OPPh ₂ Pd) entre 0.5 e 1.2 V (B). Espectroeletróquímica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,CO ₂ ,OPPh ₂ Pd) entre 1.2 e 1.46 V (B). Espectroeletróquímica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,CO ₂ ,OPPh ₂ Pd) entre 1.46 e 1.8 V (B).	103
Figura 36. Voltametria cíclica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) em acetonitrila e 0.1 M de TBAClO ₄ e suas respectivas espectroeletróquímicas (de -0.25V a -0.7 V e de -0.75 V a 1.2 V).	104

Figura 37. Voltametria cíclica do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) após a interação com gás carbônico em acetonitrila e TBAClO ₄ 0.1 M. Na esquerda a respectiva espectroeletroquímica entre 0.2 V a -0.25 V.....	105
Figura 38. Espectro no infravermelho do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)Cl antes (linha preta) e depois (linha cinza) de complexar com gás carbônico. Ao lado: representação dos complexos de CO ₂ formados.....	106
Figura 39. Análise térmica do complexo BPP(OMg,OPPh ₂ Pd) e sua derivada. Abaixo: Termoanálise diferencial do complexo BPP(OMg,PPPh ₂ Pd).....	107
Figura 40. Espectro eletrônico do complexo BPP(OMg,OPPh ₂ Pd) antes (linha contínua) e após a complexação do gás carbônico (linha pontilhada).....	108
Figura 41. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMg,OPPh ₂ Pd) e suas respectivas espectroeletroquímicas no sentido anódico.....	109
Figura 42. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMg,OPPh ₂ Pd) e sua respectiva espectroeletroquímica no sentido catódico.....	110
Figura 43. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMg,OPPh ₂ Pd) após a interação com gás carbônico e a respectiva espectroeletroquímica no sentido anódico.	110
Figura 44. Voltametria cíclica do complexo BPP(OMg,OPPh ₂ Pd) após a interação com gás carbônico e suas respectivas espectroeletroquímicas no sentido catódico.....	111
Figura 45. Infravermelho do complexo BPP(OMg,OPPh ₂ Pd) antes (linha preta) e depois de interagir com gás carbônico (linha cinza). Em evidência: modo preferencial de coordenação do CO ₂	112
Figura 46. Análise térmica do complexo BPP(OZn,OPPh ₂ Pd) (linha preta) e sua primeira derivada (linha vermelha) e a análise térmica diferencial (abaixo) de 20 °C até 700 °C.....	113
Figura 47. Espectro eletrônico do complexo BPP(OZn,OPPh ₂ Pd) em DMF antes (linha contínua) e depois de complexar com gás carbônico (linha pontilhada).	114
Figura 48. Voltametria cíclica do complexo BPP(OZn,OPPh ₂ Pd) e sua respectiva espectroeletroquímica no sentido anódico.	115
Figura 49. Voltametria cíclica do complexo BPP(OZn,OPPh ₂ Pd) e suas respectivas espectroeletroquímicas catódicas (de +0.5 V a -0.5 V e de -0.5 V a -1.0 V).....	116
Figura 50. Voltametria cíclica e sua respectiva espectroeletroquímica no sentido anódico (de + 0.5 V a + 1.5 V).	116
Figura 51. Voltametria cíclica do complexo BPP(OZn,OPPh ₂ Pd). Em evidência estão os processos catódicos e suas respectivas espectroeletroquímicas.	117
Figura 52. Espectro infravermelho do complexo BPP(OZn,OPPh ₂ Pd) antes (linha preta) e depois de interagir com CO ₂ (linha cinza).	118
Figura 53. Análise térmica do complexo BPP(OCo,OPPh ₂ Pd) (linha preta) e sua primeira derivada (linha vermelha) e a análise térmica diferencial (abaixo) de 20 °C até 700 °C.....	119
Figura 54. Espectro eletrônico do complexo BPP(OCo,OPPh ₂ Pd) em DMF, antes (linha preta) e depois (linha cinza) de complexar gás carbônico.	120
Figura 55. Voltametria cíclica do complexo BPP(OCo,OPPh ₂ Pd) em DMF e 0.1 M TBAClO ₄ . Acima: voltametria anódica e a sua respectiva espectroeletroquímica. Abaixo: voltametria catódica e a sua respectiva espectroeletroquímica.	121
Figura 56. Voltametria cíclica do complexo BPP(OCo,OPPh ₂ Pd) após a complexação com gás carbônico em DMF e 0.1 M TBAClO ₄ . Acima: voltametria anódica e a sua respectiva espectroeletroquímica. Abaixo: voltametria catódica e a sua respectiva espectroeletroquímica.	122
Figura 57. Espectro no infravermelho do complexo BPP(OCo,OPPh ₂ Pd) antes (linha preta) e depois (linha cinza) de complexar com gás carbônico.....	123

Figura 58. Formação de aminobenzamida ao longo do tempo: (□) para 5 µL, (○) para 10 µL e (△) para 15 µL de água adicionada.....	125
Figura 59. Espectro eletrônico do complexo BPP(ONi,ONi) em DMF antes (linha contínua) e depois de adicionar 100 µL de uréia 0.1M (linha pontilhada).	127
Figura 60. (A) Espectro eletrônico de BPP(ONi,ONi) em presença de uréia (linha pontilhada) e após adição de 10 µL de NaOH 0.1M (linha contínua); (B e C) teste com papel de tornasol vermelho do gás liberado; (D) teste em tubo em U contendo fenolftaleína.	128
Figura 61. Possível mecanismo da hidrólise da ureia pelo BPP(ONi,ONi).	129
Figura 62. Atividade catalase do complexo BPP(OMn,OMn) variando-se a concentração de peróxido de hidrogênio (A) e a concentração de BPP(OMn,OMn) (B).	130
Figura 63. Cromatografia gasosa do padrão de acetato de metila (linha preta) e do sobrenadante da reação de iodometano e CO ₂ na presença dos complexos bimetálicos (linha vermelha).	131
Figura 64. Possível produto das reações 11 e 12.	136
Figura 65. ¹ H RMN do produto da reação 44 do acoplamento entre CO ₂ e deceno.	137
Figura 66. ¹³ C RMN do produto da reação 44 do acoplamento entre CO ₂ e deceno. ..	138
Figura 67. Espectro ESI do produto da reação 44.	139
Figura 68. Espectro de massas (ESI) de alta resolução do produto da reação 16 da Tabela 6.	143
Figura 69. ¹ H RMN do composto ácido 2,2,4,4-tetrametil pentanóico formado na reação de iso-octano e CO ₂ na presença de BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) e luz UV.	145
Figura 70. ¹³ C RMN do composto ácido 2,2,4,4-tetrametil pentanóico formado na reação de iso-octano e CO ₂ na presença de BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) e luz UV.	145
Figura 71. CG-MS do composto ácido 2,2,4,4-tetrametil pentanóico formado na reação de iso-octano e CO ₂ na presença de BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) e luz UV.	146
Figura 72. Espectro de massas de alta resolução do composto ácido 2,2,4,4-tetrametil pentanóico formado na reação de iso-octano e CO ₂ na presença de BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) e luz UV.	147
Figura 73. Espectroscopia no Infravermelho para a cinética da reação de acoplamento C-C entre CO ₂ e iso-octano na presença de BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd) e luz UV.	148
Figura 74. Possível mecanismo da reação de acoplamento entre CO ₂ e iso-octano na presença de BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd).	149
Figura 75. Ilustração esquemática mostrando a influência do tamanho das partículas no comportamento do vetor campo magnético. Numa partícula de 20 nm há apenas um único vetor campo magnético, enquanto na de 200 nm já começam a existir vetores formando diversos domínios magnéticos.	157
Figura 76. Coercividade como função do tamanho da partícula. <i>D_{sp}</i> é o tamanho para se obter partículas superparamagnéticas e <i>D_s</i> é o tamanho de uma partícula monodomínio.	160
Figura 77. Esquema sequencial enzimático para a obtenção de metanol a partir de CO ₂	164
Figura 78. Esquema de vidraria utilizada para a reação de obtenção de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita.	170
Figura 79. Espectro no infravermelho das nanopartículas de Fe ₃ O ₄ nuas (preto, espectro A), Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ (vermelho, espectro B) e Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -APTS (verde, espectro C)..	188
Figura 80. Espectro de difração de raio-X de pó da MagNP-APTS.	190
Figura 81. Imagem de microscopia de força atômica (AFM) e o seu gráfico de distribuição de tamanho. O diâmetro médio obtido é de 58nm.	190

Figura 82. Imagem topográfica das nanopartículas magnéticas (esquerda) e o contraste da imagem de microscopia de força magnética.	191
Figura 83. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de magnetita superparamagnéticas silanizadas.	192
Figura 84. Relação entre a eficiência de imobilização da ADH (%) e a quantidade de partículas utilizadas na imobilização. Para MagNP-APTS (linha vermelha) e para MagNP@SiO ₂ -APTS (linha preta).	193
Figura 85. Relação entre a conversão de etanol a acetaldeído com a quantidade de glutaraldeído utilizado na imobilização de ADH em MagNP-APTS (linha vermelha) e MagNP@SiO ₂ -APTS (linha preta).	194
Figura 86. Relação entre o tempo de imobilização e a conversão do etanol a acetaldeído para MagNP-APTS (linha vermelha) e MagNP@SiO ₂ -APTS (linha preta).	195
Figura 87. Relação entre (A) a quantidade de agarose utilizada na imobilização e a quantidade de ADH imobilizada (B) a quantidade de ácido sulfúrico utilizado e a quantidade de ADH imobilizada e (C) quantidade de MagNP-Agarose utilizada e a conversão de etanol a acetaldeído.	196
Figura 88. Espectro no infravermelho para ADH (I), MagNP-APTS/ADH (II), MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH (III) e MagNP-Agarose/ADH (IV).	198
Figura 89. Estrutura da enzima Álcool Desidrogenase de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (PDB 2HCY). Em vermelho estão indicados os triptofanos e em azul, os sítios ativos.	199
Figura 90. Espectros de fluorescência da ADH livre (linha preta), MagNP-APTS/ADH (linha vermelha), MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH (linha verde) e MagNP-Agarose/ADH (linha azul).	200
Figura 91. Espectros SERS de aminoácidos imobilizados na MagNP-APTS com relação ao espectro SERS da MagNP -APTS/ADH (a). Representação esquemática das isoleucinas na estrutura da ADH (b) e espectro SERS da isoleucina imobilizada em MagNP-APTS comparado com o da MagNP -APTS/ADH (c).	202
Figura 92. Espectros SERS de aminoácidos imobilizados na MagNP@SiO ₂ -APTS com relação ao espectro SERS da MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH (a). Representação esquemática dos triptofanos na estrutura da ADH (b) e espectro SERS do triptofano imobilizado em MagNP@SiO ₂ -APTS comparado com o da MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH (c).	202
Figura 93. Espectros SERS de aminoácidos imobilizados na MagNP-Agarose com relação ao espectro SERS da MagNP-Agarose/ADH (a). Representação esquemática das isoleucinas na estrutura da ADH (b) e espectro SERS da isoleucina imobilizada em MagNP-Agarose comparado com o da MagNP-Agarose/ADH (c).	203
Figura 94. Microscopia de Força Atômica do sistema MagNP-APTS/ADH. Topografia (A), Contraste de fase (B).	204
Figura 95. Microscopia de Força Atômica do sistema MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH. Topografia (A), Contraste de fase (B).	204
Figura 96. Microscopia de Força Atômica do sistema MagNP-Agarose/ADH. Topografia (A), Contraste de fase (B).	205
Figura 97. Esquema da reação de catálise da enzima álcool desidrogenase.	205
Figura 98. Sítio ativo da enzima ADH de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	206
Figura 99. Variação do pH da reação com relação à conversão de etanol a acetaldeído (A) e à conversão de formaldeído a metanol (B) para ADH livre (linha preta), MagNP-APTS/ADH (linha vermelha), MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH (linha azul) e MagNP-APTS-Agarose (linha verde).	207

Figura 100. Relação entre a conversão catalítica de etanol à acetaldeído com a temperatura de reação para ADH livre ($\diamond$), MagNP-APTS/ADH ($\circ$), MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH ($\square$) e MagNP-Agarose/ADH ($\triangle$).	209
Figura 101. Estudo de reciclagem dos sistemas imobilizados da ADH: MagNP-APTS/ADH (rosa), MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH (azul) e MagNP-APTS/Agarose/ADH (amarelo) na: (A) reação de etanol à acetaldeído e (B) reação de formaldeído à metanol.	210
Figura 102. Gráfico de intensidade de fluorescência do complexo ternário NADH-ADH-Acetamida com o aumento da concentração de NADH. Linha Preta ($\diamond$) ADH livre, linha verde ($\circ$) MagNP-APTS/ADH, linha azul (∇) MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH e linha vermelha ($\square$), MagNP-APTS/Agarose/ADH.....	211
Figura 103. Relação entre a quantidade de MagNP-APTS utilizada na imobilização e a quantidade de FDH imobilizada (linha vermelha) e com a conversão de formato a CO ₂ (linha preta).	216
Figura 104. Relação entre a quantidade de MagNP@SiO ₂ -APTS utilizada na imobilização e a conversão de formato a CO ₂	216
Figura 105. Efeito da quantidade de glutaraldeído utilizada na conversão catalítica de formato a CO ₂	217
Figura 106. Efeito da quantidade de glutaraldeído adicionada na conversão catalítica para 2 minutos (linha vermelha) e 10 minutos de imobilização (linha preta).	218
Figura 107. Relação entre o tempo de imobilização e a conversão catalítica do sistema MagNP-APTS/FDH.	219
Figura 108. Influência do tempo de imobilização do sistema MagNP@SiO ₂ -APTS/FDH na conversão catalítica de formato a CO ₂	219
Figura 109. Influência do tempo de imobilização do sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH na conversão catalítica.	220
Figura 110. Influência da quantidade de MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH utilizada na conversão catalítica.	221
Figura 111. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP-APTS/FDH: (A) imagem topográfica e (B) imagem de contraste de fase.	222
Figura 112. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP@SiO ₂ -APTS/FDH: (A) imagem topográfica e (B) imagem de contraste de fase.	222
Figura 113. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH: (A) imagem topográfica e (B) imagem de contraste de fase.	223
Figura 114. Inativação enzimática a 60°C e pH 7.5 para FDH livre ($\circ$), MagNP-APTS/FDH ($\square$), MagNP@SiO ₂ -APTS/FDH ($\triangle$) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH (∇).	225
Figura 115. Conversão catalítica quanto à variação do pH reacional para a reação de formato a CO ₂ (A) e de CO ₂ a formato (B) para FDH livre (linha azul), MagNP-APTS/FDH (linha preta), MagNP@SiO ₂ -APTS/FDH (linha verde) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH (linha vermelha).	226
Figura 116. Relação entre a temperatura de reação e a conversão catalítica na reação de conversão de formato a CO ₂ (A) e de CO ₂ a formato (B) para FDH livre (linha azul) MagNP-APTS/FDH (linha preta), MagNP@SiO ₂ -APTS/FDH (linha verde) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH (linha vermelha).	227
Figura 117. Esquema da FDH de Candida boidinii mostrando os sítios dos triptofanos (círculos vermelhos). Adaptada de ²⁰⁷	229
Figura 118. Relação entre a catálise em diferentes pHs (linha azul, $\triangle$) e a magnitude de supressão de emissão do triptofano antes e depois da adição de formato (linha preta, $\square$)	

e NAD ⁺ (linha vermelha, ○) para (A) FDH livre, (B) MagNP-APTS/FDH, (C) MagNP@SiO ₂ -APTS/FDH e (D) MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FDH.	230
Figura 119. Reciclagem dos sistemas MagNP-APTS/FDH (coluna azul) MagNP-Glioxil-Agarose/FDH (coluna vermelha) e MagNP@SiO ₂ -APTS/FDH (coluna verde).	232
Figura 120. Efeito da quantidade de nanopartículas adicionada ao processo de imobilização. O desempenho de cada sistema foi avaliada quanto à conversão de formaldeído a formato: MagNP-APTS/ADH (linha preta), MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH (linha vermelha) e MagNP/Glioxil-Agarose/ADH (linha verde).	233
Figura 121. Variação do agente acoplante na imobilização com relação à conversão de formaldeído em formato. (A) Variação da concentração de glutaraldeído e (B) Variação da quantidade de glioxil-agarose adicionada.	234
Figura 122. Relação entre o tempo de imobilização e a conversão catalítica para MagNP-APTS/FalDH (linha preta), MagNP@SiO ₂ -APTS/FalDH (linha vermelha) e MagNP/Glioxil-Agarose/FalDH (linha azul).	235
Figura 123. Imagens de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP-APTS/FalDH (A) Imagem topográfica (B) imagem de contraste de fase.	236
Figura 124. Imagens de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP@SiO ₂ -APTS/FalDH (A) Imagem topográfica (B) imagem de contraste de fase.	236
Figura 125. Imagens de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP/Glioxil-Agarose/FalDH (A) Imagem topográfica (B) imagem de contraste de fase.	237
Figura 126. Representação em cartoon do sítio ativo da FalDH. Em vermelho está evidenciado a Phe93 e em azul a Asp169.	241
Figura 127. Espectro Raman Confocal da FalDH (A), MagNP-APTS/FalDH (B), MagNP@SiO ₂ -APTS/FalDH (C) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH (D) antes (linha preta) e depois (linha vermelha) da adição de formaldeído.	242
Figura 128. Sítio ativo da enzima FalDH e <i>Pseudomonas putida</i>	244
Figura 129. Variação do pH da reação com relação à conversão de formaldeído a formato (A) e à conversão de formato a formaldeído (B) para FalDH livre (linha preta), MagNP-APTS/FalDH (linha vermelha), MagNP@SiO ₂ -APTS/FalDH (linha azul) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH (linha verde).	245
Figura 130. Influência da temperatura na conversão de (A) formaldeído a formato e (B) de formato em formaldeído para FalDH livre (linha vermelha), MagNP-APTS/FalDH (linha azul), MagNP@SiO ₂ -APTS/FalDH (linha preta) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH (linha verde).	246
Figura 131. Reciclagem para a reação (A) formaldeído à formato e (B) formato a formaldeído para MagNP-APTS/FalDH (azul petróleo), MagNP@SiO ₂ -APTS/FalDH (rosa) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/FalDH (laranja).	247
Figura 132. Influência da quantidade de nanopartícula adicionada à imobilização da GDH com relação à conversão de glutamato em α-cetoglutarato para MagNP-APTS/GDH (linha preta), MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH (linha azul) e MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (linha rosa).	250
Figura 133. Influência da quantidade de glutaraldeído adicionado à imobilização da GDH com relação à conversão de glutamato em α-cetoglutarato para MagNP-APTS/GDH (linha preta), MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH (linha vermelha).	251
Figura 134. Influência da quantidade de glioxil-agarose adicionado à imobilização da GDH com relação à conversão de glutamato em α-cetoglutarato para MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH.	251
Figura 135. Relação entre o tempo de imobilização e a conversão de glutamato em α-cetoglutarato para MagNP-APTS/GDH (linha preta), MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH (linha	

vermelha), MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (linha azul) e MagNP@CMC/GDH (linha rosa).....	252
Figura 136. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP-APTS/GDH. (A) Imagem topográfica e (B) Imagem de contraste de fase.....	253
Figura 137. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH. (A) Imagem topográfica e (B) Imagem de contraste de fase.....	253
Figura 138. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH. (A) Imagem topográfica e (B) Imagem de contraste de fase.	254
Figura 139. Imagem de Microscopia de Força Atômica para o sistema MagNP@CMC/GDH. (A) Imagem topográfica e (B) Imagem de contraste de fase. ...	254
Figura 140. Inativação enzimática a 50°C e pH 7.5. GDH livre (linha preta, ○), MagNP-APTS/GDH (linha vermelha, □), MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH (linha verde, ▽), MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (linha azul, △) and MagNP@CMC/GDH (linha marrom, ◇).	257
Figura 141. Espectro Raman Confocal da (A) GDH livre, (B) MagNP-APTS/GDH, (C) MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH, (D) MagNP-Glioxil-Agarose/GDH, (E) MagNP@CMC/GDH antes (linha preta) e depois da adição de glutamato (linha vermelha) e da adição de NAD ⁺ (linha azul).....	259
Figura 142. Relação entre o pH reacional e a conversão catalítica para GDH livre (linha azul), MagNP-APTS/GDH (linha preta), MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH (linha verde claro) e MagNP@CMC/GDH (linha verde escuro)	260
Figura 143. Relação entre a temperatura reacional e a conversão catalítica para GDH livre (linha azul), MagNP-APTS/GDH (linha preta), MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH (linha verde claro) e MagNP@CMC/GDH (linha verde escuro).	261
Figura 144. Cinética da glutamato desidrogenase na presença de diferentes concentrações de ADP: 0 μM de ADP (pontos pretos), 10 μM de ADP (pontos vermelhos), 50 μM de ADP (pontos azuis) e 100 μM de ADP (pontos rosa). (A) GDH livre; (B) MagNP-APTS/GDH; (C) MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH; (D) MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH e (E) MagNP@CMC/GDH.....	263
Figura 145. Cinética da glutamato desidrogenase na presença de diferentes concentrações de GTP: 0 μM de GTP (pontos pretos), 10 μM de GTP (pontos vermelhos), 50 μM de GTP (pontos azuis) e 100 μM de GTP (pontos rosa). (A) GDH livre; (B) MagNP-APTS/GDH; (C) MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH; (D) MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH e (E) MagNP@CMC/GDH.....	264
Figura 146. Cinética da glutamato desidrogenase na presença de diferentes concentrações de ATP: 0 μM de ATP (pontos pretos), 100 μM de ATP (pontos vermelhos), 1 mM de ATP (pontos azuis). (A) GDH livre; (B) MagNP-APTS/GDH; (C) MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH; (D) MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH e (E) MagNP@CMC/GDH.....	265
Figura 147. Cinética da glutamato desidrogenase na presença de diferentes concentrações de ATP: 0 μM de ATP (pontos pretos), 100 mM de ATP (pontos azuis), 100 mM de ATP (pontos rosa). (A) GDH livre; (B) MagNP-APTS/GDH; (C) MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH; (D) MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH e (E) MagNP@CMC/GDH.....	266
Figura 148. Esquematização das principais quebras feitas na digestão da GDH por tripsina antes e depois da adição de ADP e GTP. Em laranja estão as quebras principais, em verde as segundas mais intensas e em azul as menos intensas dentre as quebras mais intensas.	267

Figura 149. Esquematização das principais quebras feitas na digestão da MagNP-APTS/GDH por tripsina antes e depois da adição de ADP e GTP. Em laranja estão as quebras principais, em verde as segundas mais intensas e em azul as menos intensas dentre as quebras mais intensas.	268
Figura 150. Esquematização das principais quebras feitas na digestão da MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH por tripsina antes e depois da adição de ADP e GTP. Em laranja estão as quebras principais, em verde as segundas mais intensas e em azul as menos intensas dentre as quebras mais intensas.	269
Figura 151. Esquematização das principais quebras feitas na digestão da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH por tripsina antes e depois da adição de ADP e GTP. Em laranja estão as quebras principais, em verde as segundas mais intensas e em azul as menos intensas dentre as quebras mais intensas.	270
Figura 152. Esquematização das principais quebras feitas na digestão da MagNP@CMC/GDH por tripsina antes e depois da adição de ADP e GTP. Em laranja estão as quebras principais, em verde as segundas mais intensas e em azul as menos intensas dentre as quebras mais intensas.	271
Figura 153. Reciclagem dos sistemas MagNP-APTS/GDH (barras vermelhas), MagNP@SiO ₂ -APTS/GDH (barras laranjas), MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH (barras verdes) e MagNP@CMC/GDH (barras azuis).	273
Figura 154. Relação entre o tempo de reação multi-enzimática e a concentração de NAD ⁺ (linha preta), metanol (linha vermelha) e formaldeído (linha azul) formados. .	274
Figura 155. Relação entre a pressão utilizada na reação multi-enzimática e a concentração de NAD ⁺ (linha preta), metanol (linha vermelha) e formaldeído (linha azul).	275
Figura 156. Relação entre a temperatura utilizada na reação multi-enzimática e a concentração de NAD ⁺ (linha preta), metanol (linha vermelha) e formaldeído (linha azul).	276
Figura 157. Estudo de reciclagem do sistema multi-enzimático.	276
Figura 158. Influência do tempo de imobilização da ADH na conversão de etanol à acetaldeído para : MagNP-APTS/ADH (linha vermelha), MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH (linha preta) e MagNP-APTS/Agarose/ADH (linha azul).	277
Figura 159. Fluorescência dos sistemas MagNP-APTS/ADH, MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH e MagNP-APTS/Agarose/ADH com diferentes tempos de imobilização: antes do tempo ótimo (linha preta), no tempo ótimo (linha vermelha) e após o tempo ótimo (linha verde). O espectro em azul é da ADH livre.	279
Figura 160. Representação esquemática da possível estruturação da MagNP-APTS/ADH. Em vermelho estão os triptofanos e em rosa as isoleucinas. As setas pretas indicam uma possível movimentação enzimática durante a imobilização.	281
Figura 161. Representação esquemática da possível estruturação da MagNP-APTS/Agarose/ADH. Em vermelho estão os triptofanos e em rosa as isoleucinas. As setas pretas indicam uma possível movimentação enzimática durante a imobilização.	282
Figura 162. Representação esquemática da possível estruturação da MagNP@SiO ₂ -APTS/ADH. Em vermelho estão os triptofanos. As setas pretas indicam uma possível movimentação enzimática durante a imobilização.	283
Figura 163. Dinâmica da imobilização de enzimas ao longo do tempo.	284
Figura 164. Espectro ¹ H RMN do ligante BPP(OH,OH).	301
Figura 165. Espectro de ¹³ C RMN do ligante BPP(OH,OH).	302
Figura 166. Espectro HETCORR do ligante BPP(OH,OH).	303
Figura 167. Espectro COSY do ligante BPP(OH,OH).	304

Figura 168. Espectro NOESY do ligante BPP(OH,OH). Abaixo pode ser visto a ampliação na região entre 1 e 4,5 ppm.	305
Figura 169. Espectro de massas ESI ⁺ de alta resolução do BPP(OH,OH).	306
Figura 170. Espectro no infravermelho do ligante BPP(OH,OH).	307
Figura 171. Termogravimetria do ligante BPP(OH,OH) (linha preta) de 20°C a 700°C em ar sintético e sua primeira derivada (linha vermelha).	307
Figura 172. Espectro de ¹ H RMN do ligante BPP(OPPh ₂ S,OPPh ₂ S).	310
Figura 173. Expansão da região dos aromáticos do espectro de ¹ H RMN do ligante BPP(OPPh ₂ S,OPPh ₂ S).	311
Figura 174. Espectro ¹³ C RMN do composto (10).	313
Figura 175. ³¹ P RMN do composto (10)	314
Figura 176. À esquerda: representação esquemática dos acoplamentos COSY no composto (10) e à direita está o espectro COSY do composto (10).	315
Figura 177. À esquerda: representação esquemática dos acoplamentos HETCOR no composto (10) e à direita está o espectro HETCOR do composto (10).	316
Figura 178. NOESY do composto (10).	316
Figura 179. Espectro no infravermelho do composto (10).	317
Figura 180. Análise termogravimétrica do composto (10).	318
Figura 181. Espectro de ¹ H RMN do composto BPP(OH,OPPh ₂ S).	320
Figura 182. Ampliação na região dos aromáticos do espectro de ¹ H RMN do composto (12).	321
Figura 183. Espectro ¹³ C RMN do composto (12).	323
Figura 184. Espectro ³¹ P RMN do composto (12).	324
Figura 185. Espectro de massas do complexo BPP(ONi,ONi) e distribuição isotópica.	325
Figura 186. Espectro de massas do complexo BPP(OMn,OMn) e distribuição isotópica.	326
Figura 187. Espectro de massas ESI ⁺ do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)Cl ₂ dissolvido em acetonitrila.	327
Figura 188. Espectro de massas do complexo BPP(OPPh ₂ Pd,OPPh ₂ Pd)Cl ₂ em uma mistura acetonitrila:água (4:1, v/v).	327
Figura 189. Espectro de massas do complexo BPP(OZn,OPPh ₂ Pd) tirado de uma solução em acetonitrila:água (4:1, v/v).	328
Figura 190. Espectro ESI ⁺ do complexo BPP(OCu,OPPh ₂ Pd).	328

Índice Remissivo de Tabelas

Tabela 1. Quantidades de sal com relação ao complexo BPP(OM,OM) formado.	65
Tabela 2. Quantidades de sais de metal utilizadas na complexação.	66
Tabela 3. Valores de μ_{eff} para cada valor de S.	85
Tabela 4. Dados termodinâmicos obtidos da cinética dos complexos.	132
Tabela 5. Reações de acoplamento entre deceno e CO ₂	133
Tabela 6. Reações de acoplamento entre iso-butano e CO ₂ em diversas temperaturas e pressões, utilizando diferentes catalisadores.	142
Tabela 7. Tamanho máximo estimado para uma partícula esférica multidomínio passar a ser monodomínio.	158
Tabela 8. Comparação entre as constantes de dissociação, constante de Michaelis-Menten e o potencial de ligação dos diferentes sistemas com a ADH livre.	212
Tabela 9. Comparação entre a energia de ativação e a entropia do estado de transição dos diferentes sistemas da ADH.	215
Tabela 10. Diferença entre os K_M , $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$ da FDH livre e imobilizada.	224
Tabela 11. Valores de $\Delta H^\ddagger$, $\Delta S^\ddagger$ e K_M para a FalDH livre e imobilizada.	238
Tabela 12. Valores de $S_{0.5}$, ΔH , $\Delta S^\ddagger$ e n (coeficiente de Hill) para a GDH livre e imobilizada.	255
Tabela 13. Comparação entre a entalpia e a entropia do estado de transição dos diferentes sistemas da ADH com tempos de imobilização distintos.	278

Anexos do Capítulo 1

1 – ^1H RMN do composto (2)

A2- ^{13}C RMN do composto (2)

VI
169.16

V
59.16

IV
53.43

III
45.87

II
28.59

I
23.54

A3- MS (ESI+) do composto (2)

A4- Infravermelho do composto (2)

A5-¹H RMN do composto (3)

A6-¹³C RMN do composto (3)

A7- COSY do composto (3)

A8-HETCOR do composto (3)

A9-NOESY do composto (3)

A10-MS do composto (3)

A11-Infravermelho do composto (3)

A12-¹H RMN do composto (4)

A13-¹³C RMN do composto (4)

A14-COSY do composto (4)

A15-HETCOR do composto (4)

A16-NOESY do composto (4)

A17-MS do composto (4)

A18-Infravermelho do composto (4)

A19- ^1H RMN do composto (5)

A20- ^{13}C RMN do composto (5)

A21-COSY do composto (5)

A22-HETCOR do composto (5)

A23-NOESY do composto (5)

A24-MS do composto (5)

A25-Infravermelho do composto (5)

A26- ^1H RMN do composto (6)

Chemical Structure of 10: A complex molecule featuring a central phosphorus atom double-bonded to a sulfur atom and single-bonded to a phenyl ring (atoms S, H, T, P, U, O) and an oxygen atom (atom L). The oxygen atom is part of a five-membered ring containing a nitrogen atom (atoms A, B, C, D, N). The nitrogen atom is bonded to a carbonyl group (atoms Z, O) which is further connected to a phenyl ring (atoms M, H, V, I, J, N). The central carbon atom (atom C) is also bonded to a phenyl ring (atoms X, L, K, Q, R, G).

¹³C NMR Spectrum (ppm):

Peak Label	Chemical Shift (ppm)
132.49	132.49
131.35	131.35
131.12	131.12
128.78	128.78
128.49	128.49
128.12	128.12
127.89	127.89
127.77	127.77
127.46	127.46
F	81.61
77.64	77.64
77.00	77.00
76.38	76.38
E	67.46
66.21	66.21
D	47.82
C	29.68
B	25.85
A	22.96

A28- ^{31}P RMN do composto (6)

A29-COSY do composto (6)

A30-HETCOR do composto (6)

A31-NOESY do composto (6)

A32-MS do composto (6)

A33-Infravermelho do composto (6)

A34-¹H RMN do composto (7)

A35- ^{13}C RMN do composto (7)

$36\text{-}^{31}\text{P}$ RMN do composto (7)

A37-COSY do composto (7)

A38-HETCOR do composto (7)

A39-NOESY do composto (7)

A40-MS do composto (7)

A41-Infravermelho do composto (7)

A42- ^1H RMN do composto (11)

A43- ^{13}C RMN do composto (11)

A44-COSY do composto (11)

A45-HETCOR do composto (11)

A46-NOESY do composto (11)

A47-Infravermelho do composto (11)

A48-COSY do composto (12)

A49-HETCOR do composto (12)

A50-NOESY do composto (12)

A51- ^1H RMN do complexo BPP(OC_o,OC_o)

A52-Infravermelho do complexo BPP(OC_o,OC_o)

A53-¹H RMN do complexo BPP(ONi,ONi)

54-Infravermelho do complexo BPP(ONi,ONi)

A55-¹H RMN do complexo BPP(OMn,OMn)

A56-Infravermelho do complexo BPP(OMn,OMn)

A57-¹H RMN do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd), com trietilamina

A58- ^{13}C RMN do complexo $\text{BPP}(\text{OPh}_2\text{Pd}, \text{OPh}_2\text{Pd})$

A59-³¹P RMN do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd)

A60-Voltametria cíclica anódica do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) em DMF, 0.1M de TBAClO₄ e 0.1μL de ácido perclórico 35%

A61-EPR do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd) em ACN e 0.1 μL de ácido perclórico 35%

A62-Infravermelho do complexo BPP(OPPh₂Pd,OPPh₂Pd)

A63-¹H RMN do complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd)

A64- Infravermelho do complexo BPP(OMg,OPPh₂Pd)

A65- ^1H RMN do complexo $\text{BPP}(\text{OZn}, \text{OPPh}_2\text{Pd})$

A66-Infravermelho do complexo BPP(OZn,OPPh₂Pd)

A67-Infravermelho do complexo BPP(OCo,OPPh₂Pd)

A68-¹H RMN do complexo BPP(OC_o,OPPh₂Pd)

A69- Infravermelho do complexo $BPP(OCo,OPPh_2Pd)$

A70- Mudanças espectroscópicas dos complexos ao adicionar iodeto de metila. Variações de $\ln(k)$ com a temperatura.

A70- Mudanças espectroscópicas dos complexos ao adicionar iodeto de metila. Variações de $\ln(k)$ com a temperatura.

A71- ^1H RMN das reações 11 e 12 da Tabela 5

A72- MS(ESI+) das reações 11 e 12 da Tabela 5

A73 – CG-MS da reação 20 (Tabela 5)

A74 – Reação 20, Tabela 5, ^1H RMN

A75- ^1H RMN das reações 29 e 30 da Tabela 5

A76- CG-MS da reação 52 (m/z 185) (Tabela 5)

A77- CG-MS da reação 52 (m/z 155) (Tabela 5)

A78- ^1H RMN da reação 52 (Tabela 5)

A79- ^{13}C RMN da reação 52 (Tabela 5)

A80- CG-MS da reação 54 (tabela 5)

TIC: gwt-ga-183-01.D\data.ms

A81- ^1H RMN da reação 54 (Tabela 5)

A82- CG-MS da reação 57 (Tabela 5)

A83- ^1H RMN da reação 16 (Tabela 6)

A84- ^{13}C RMN da reação 16 (Tabela 6)

A85- ^1H RMN da reação 17 (Tabela 6)

A86- ^1H RMN da reação de acoplamento entre iso-octano e CO_2 na presença de $\text{BPP}(\text{OZn}, \text{OPh}_2\text{Pd})$

Sinais de acetato de etila foram removidos para melhor visualização

A87- ^{13}C RMN da reação de acoplamento entre iso-octano e CO_2 na presença de $\text{BPP}(\text{OZn}, \text{OPh}_2\text{Pd})$

Anexos do capítulo 2

A88. Sobreposição da ADH de fígado bovino e de *Saccharomyces cerevisiae*

Em rosa: álcool desidrogenase de fígado bovino e seus triptofanos em vermelho

Em cinza: álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* e seus triptofanos em amarelo

A89. Gráfico de Arrhenius para os sistemas ADH (A), MagNP-APTS/ADH(B), MagNP@SiO₂-APTS/ADH(C) e MagNP-APTS-Agarose/ADH(D).

A90. Gráfico de Arrhenius para os sistemas FDH (A), MagNP-APTS/FDH(B), MagNP@SiO₂-APTS/FDH(C) e MagNP-APTS-Glioxil-Agarose/FDH(D).

A91. Gráfico de Arrhenius para os sistemas FALDH (A), MagNP-APTS/FalDH(B), MagNP@SiO₂-APTS/FalDH(C) e MagNP-APTS-Glioxil-Agarose/FalDH(D).

A92. Gráfico de Arrhenius para os sistemas GDH (A), MagNP-APTS/GDH(B), MagNP@SiO₂-APTS/GDH(C), MagNP-APTS-Glioxil-Agarose/GDH(D) e MagNP@CMC/GDH (E).

A93. Digestão da GDH

A94. Digestão da GDH na presença de ADP

A95. Digestão da GDH na presença de GTP

A96. Digestão da MagNP-APTS/GDH

A97. Digestão da MagNP-APTS/GDH na presença de ADP

A100. Digestão da MagNP-APTS/GDH na presença de GTP

A101. Digestão da MagNP@SiO₂-APTS/GDH

A102. Digestão da MagNP@SiO₂-APTS/GDH na presença de ADP

A103. Digestão da MagNP@SiO₂-APTS/GDH na presença de GTP

A104. Digestão da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH

A105. Digestão da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH na presença de ADP

A106. Digestão da MagNP-APTS/Glioxil-Agarose/GDH na presença de GTP

A107. Digestão da MagNP@CMC/GDH

A108. Digestão da MagNP@CMC/GDH na presença de ADP

A109. Digestão da MagNP@CMC/GDH na presença de GTP

A110. Espectro Raman dos sistemas MagNP-APTS/ADH com 5 minutos de imobilização (linha preta), 10 minutos de imobilização (linha vermelha) e 15 minutos de imobilização (linha verde) em comparação com o espectro Raman da isoleucina imobilizada em MagNP-APTS (linha rosa).

A111. Espectro Raman dos sistemas MagNP@SiO₂-APTS/ADH com 45 minutos de imobilização (linha preta), 60 minutos de imobilização (linha vermelha) e 75 minutos de imobilização (linha verde) em comparação com o espectro Raman do triptofano imobilizado em MagNP@SiO₂-APTS (linha azul).

Anexo 23. Espectro Raman dos sistemas MagNP-APTS/Agarose/ADH com 5 minutos de imobilização (linha preta), 10 minutos de imobilização (linha vermelha) e 15 minutos de imobilização (linha verde) em comparação com o espectro Raman da isoleucina imobilizada em MagNP-APTS/Agarose (linha azul).

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Caterina Gruenwaldt Cunha Marques Netto

Local e data de nascimento: São Paulo, 15 de Setembro de 1986

EDUCAÇÃO

- Colégio Rio Branco, Cotia, 1994-2003.
- Colégio Mackenzie, São Paulo, 2004
- Química Ambiental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005-2008

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, FAPESP, 2009-2013

PUBLICAÇÕES

1. Marques Netto, Caterina G.C. ; Toma, Henrique E. ; Andrade, Leandro H. .

Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic (Print), v.85-86, p. 71-92, 2013.

2. Marques Netto, C. G. C. ; Nakamura, Marcelo ; Andrade, L. H. ; Toma, Henrique E.

Improving the catalytic activity of formate dehydrogenase from Candida boidinii by using magnetic nanoparticles. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic (Print), v.84, p. 136, 2012.

3. Marques Netto, C. G. C. ; Nakamatsu, Eduardo H. ; Netto, Luis E.S. ; Novak,

Miguel A. ; Zuin, Andre ; Nakamura, Marcelo ; Araki, Koiti ; Toma, Henrique E. .

Catalytic properties of thioredoxin immobilized on superparamagnetic nanoparticles.

Journal of Inorganic Biochemistry, v. 105, p. 738-744, 2011.

4. Andrade, L. H. ; Rebelo, L. ; **Marques Netto, C. G. C.** ; Toma, H, E. . *Kinetic resolution of a drug precursor by Burkholderia cepacia lipase immobilized.* Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic (Print), v. 66, p. 55-62, 2010.

5. Rebelo, L. ; **Marques Netto, C. G. C.** ; Andrade, L. H. ; Toma, H, E. . *Enzymatic Kinetic Resolution of (RS)-1-(Phenyl)ethanols by Burkholderia cepacia Lipase Immobilized on Magnetic Nanoparticles.* Journal of the Brazilian Chemical Society (Online), v. 21, p. 1537-1542, 2010.

6. **Marques Netto, C. G. C.** ; Andrade, L. H. ; Toma, H, E. . *Enantioselective transesterification catalysis by Candida antarctica lipase.* Tetrahedron. Asymmetry, v.20, p. 2299-2304, 2009.

CONGRESSOS (contribuições mais importantes)

Contribuição com apresentações orais:

1. **Marques Netto, C. G. C.** ; Ferreira, A. M. C. ; List, B. ; Toma, H, E. . *A bis palladium complex for CO₂ activation.* 40th ICCC, Valencia-Espanha, 2012.

2. **Marques Netto, C. G. C.** ; Toma, H, E. ; Alexiou, C, D. ; Paduan, A. . *Influência do tempo nas nanopartículas magnéticas,* Águas de Lindóia. RASBQ, 2008.

Contribuição com pôsteres:

1. **Marques Netto, C. G. C.**, Nakamura, M., Andrade, L. H., Toma, H.E., *Immobilization of Formate dehydrogenase from Candida boidinii on magnetic particles,* Giardini Naxos, Biotrans, 2011.

2. Marques Netto, C. G. C., Andrade, L.H., Nakamura, M., Toma, H.E. Immobilization of Alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* on magnetic particles, Florianópolis, RASBQ, 2011.

3. Rebelo, L. P., Marques Netto, C. G. C., Toma, H. E., Andrade, L. H., *Kinetic resolution of (±)-1-(phenyl)ethanols mediated by B. cepacia lipase immobilized on magnetic nanoparticles*, Águas de São Pedro, Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2009.

4. Marques Netto, C. G. C., Toma, H.E., List, B., *Immobilization of (R)-TRIP on magnetic nanoparticles via π - π stacking to the hydrogenation of citral*, de São Pedro, Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2009.

5. Marques Netto, C. G. C., Andrade, L. H., Toma, H.E., New biocatalyst with a stable enantioselectivity during many cycles using immobilized CAL-B on magnetic nanoparticles, São Carlos, ISAMN, 2007.

6. Marques Netto, C. G. C., Rebelo, L. P., Andrade, L. H., Toma, H. E., *Preparative scale using lipase CAL-B immobilized on magnetic nanoparticles*, Itapema, Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2007.

7. Marques Netto, C. G. C. M., Nakamura, M., Alexiou, A. D. P., Toma, H. E., *Lipophilic magnetic nanoparticles*, Águas de Lindóia. RASBQ, 2006.