Universidade de São Paulo Instituto de Química de São Carlos Programa de Pós-Graduação em Química

Lucyano Jefferson Alves de Macedo

Espectroeletroquímica *in situ* e *operando* para a resolução de mecanismos catalíticos envolvendo centros redox de metaloenzimas e biomiméticos

Lucyano Jefferson Alves de Macedo

Espectroeletroquímica *in situ* e *operando* para a resolução de mecanismos catalíticos envolvendo centros redox de metaloenzimas e biomiméticos

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para o exame de defesa de doutorado.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: Degen form besch Houde Data: 14/03/2022

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Macedo, Lucyano Jefferson Alves de Espectroeletroquímica in situ e operando para a resolução de mecanismos catalíticos envolvendo centros redox de metaloenzimas e biomiméticos / Lucyano Jefferson Alves de Macedo. — São Carlos, 2022. 97 f.

Tese (Doutorado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2022. Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho

Infravermelho. 2. Reação de redução de oxigênio. 3. Multi-cobre oxidase.
 Espectroeletroquímica. 5. Espectroscopia de absorção de raio-X. I. Título.

Wilneide do Carmo Marchi Maiorano - CRB: 3978/8



DEDICATÓRIA

A meus pais e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu pai Raimundo, minha mãe Lucimar e meus irmãos Lívia, Lídia e Luccas por nunca deixarem de me apoiar nessa jornada de pós-graduação longe de casa;
- Ao professor Frank N. Crespilho por me orientar;
- Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP) pela infraestrutura disponível para a realização desta pesquisa;
- Aos amigos do Grupo de Bioeletroquímica e Interfaces: Ayaz Hassan, João Souza, Thiago Bertaglia, Graziela Sedenho, Iago Modenez, José Eduardo Clarindo, Luana Faria, Jessica Pacheco, Bruno Rossi, Karla Castro, Steffane Nascimento, Isabela Mattioli, Natália Sanches, Giovana Cagnani, Thiago Oliveira e Giovana Rossi por compartilharem inúmeras experiências tanto no pessoal quanto no profissional;
- Às demais amizades que construí durante essa vivência no IQSC, em especial ao Felipe Gonçalves, Daniele Martins, Jéssica Feitor, Carlos Tasso, Henrique Fernandes, Thiago Mariano, Pedro Costa e Rodrigo Iost;
- Ao Dr. Antonio C. Roveda Jr. pelas discussões sobre reações de compostos nitrogenados e auxílios nas análises de DEMS e Raman;
- À professora Joelma Perez (IQSC) por instruções compartilhadas para os experimentos de XAS;
- Ao professor Daniel R. Cardoso (IQSC) pelo auxílio nas medidas de EPR e nas discussões relacionadas a compostos nitrogenados;

- Ao professor Fábio H. B. Lima pela disponibilização do DEMS e as discussões dos resultados obtidos com essa instrumentação;
- Aos professores do IQSC Marcelo H. Gehlen, Benedito S. Lima Neto e Carla C. S. Carvalheiro pelos conhecimentos transmitidos nas disciplinas cursadas;
- Ao professor Gustavo T. Feliciano e ao seu orientando Anderson A. E. Santo pelas discussões e colaborações no âmbito computacional;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado regular concedida sob o processo 2017/20493-2, também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos outros auxílios que possibilitaram o desenvolvimento desta Tese.
- Aos membros das oficinas mecânica e de vidraria pelo auxílio na construção de aparatos customizados que permitiram a realização dos experimentos descritos e discutidos nesta Tese;
- Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) do Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pelo fornecimento de tempo de máquina na linha XAFS2 que permitiram a obtenção de dados de XAS. Também aos membros desta linha: Dr. Santiago Figueroa, Dr^a. Amelie Rochet e Júnior Maurício pelos auxílios aos experimentos na linha de luz XAFS2;
- Aos amigos da minha cidade natal (Teresina-PI) por também sempre me apoiarem nesta jornada acadêmica.

EPÍGRAFE

"A imaginação nos leva frequentemente a mundos que nunca existiram. Mas sem ela, não iremos a lugar algum."

Carl Sagan

RESUMO

Enzimas redox (ER) são catalisadores biológicos com estrutura molecular complexa e possuem unidades aceptoras/doadoras de elétrons e/ou íons que conduzem a reações de transferência de carga. Em biologia redox, as reações catalisadas por ER estão associadas à vida, a sua origem, à evolução e à genômica; na indústria, as ER são utilizadas para acelerar as reações de produção de fármacos, bebidas e alimentos; em biotecnologia e medicina, elas são utilizadas em diagnóstico clínico e em biossensores; no campo da energia limpa e sustentável, as ER são empregadas na produção de biocombustíveis, além de servirem como modelos para a síntese de catalisadores biomiméticos de células a combustível e de baterias aquosas atóxicas. Portanto, entender os mecanismos bioeletroquímicos de atuação das ER e as suas propriedades termodinâmicas e cinéticas possibilitam obter moléculas mais simples e biomiméticas, permitindo avançar no estadoda-arte científico e tecnológico. Neste contexto, esta Tese de Doutorado apresenta a proposta de estudar influência dos metais de transição presentes em sítios catalíticos de ER e de catalisadores biomiméticos por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas acopladas à eletroquímica em modo in situ e operando com o foco nos processos de transferência de elétrons (TE) e os mecanismos envolvidos. Dividiu-se esta Tese em três temáticas. i) Na primeira, apresenta-se um estudo na região do infravermelho distante para as reações redox com o azul da Prússia, ferroceno e ftalocianina de níquel. As reações de TE nesses três compostos foram monitoradas pelas mudanças de absorção de radiação na fração metal-ligante. Superou-se as dificuldades experimentais de se trabalhar em meio aquoso, sendo possível propor, com sucesso, uma configuração inédita para comprovar efeito do estado de oxidação de centro metálicos nos modos vibracionais presentes na primeira esfera de coordenação. ii) Na segunda parte desta Tese, apresenta-se uma nova estratégia instrumental para a espectroeletroquímica Raman e espectrometria de massas eletroquímica diferencial visando observar a importante reação de conversão de íon nitrito a amônia. Propõe-se, aqui, utilizar o catalisador biomimético ftalocianina de ferro em fase aquosa, ou seja, dissolvido no eletrólito. Estrategicamente, esta configuração possibilita a visualização da rota catalítica de forma sem precedentes, com a formação de óxido nítrico, óxido nitroso e hidroxilamina como intermediários, fato esse nunca observado experimentalmente até então. iii) A terceira e última parte da Tese consiste em usar a radiação síncrotron, pela primeira vez, em um estudo bioeletroquímico. Aqui, propõe-se uma configuração de aprisionamento da ER bilirrubina oxidase (BOx) em matrizes mesoporosas de carbono, usadas em bioeletrodos com a espectroscopia de absorção de raio-X (XAS) em modo operando. A reação bioeletrocatalisada de redução do oxigênio molecular à água foi estudada em detalhe, sendo possível propor um novo mecanismo de catálise tridimensional, onde os sítios de cobre (II) presentes na estrutura da BOx participam, etapa-por-etapa, da reação de TE realizando o papel de pontes eletrônicas. Assim, nesta Tese, apresentam-se três maneiras distintas para se utilizar técnicas espectroscópicas e espectrométricas nos modos in situ e operando, contribuindo para área de bioeletroquímica com a visualização de forma direta da ação de sítios com metais de transição. Consequentemente, as estratégias instrumentais aqui apresentadas contribuem para promover a elucidação de mecanismos complexos envolvendo enzimas e compostos biomiméticos.

Palavras chave: Reação de redução de oxigênio; Multi-cobre oxidases; Espectroeletroquímica; Espectroscopia de absorção de raio-X; Infravermelho; Raman; DEMS; Nitrito.

ABSTRACT

Redox enzymes are biological catalysts with a complex structure which possess electron donors/acceptors unities and/or ions that lead charge transfer reactions. In redox biology, the reactions catalyzed by redox enzymes are associated to life, its origin, to evolution, and genomics; in industry, redox enzymes are used to accelerate reactions for producing medicines, beverages, and foods; in biotechnology and medicine, they are used in clinical diagnosis and biosensors; in the field of clean and sustainable energy, redox enzymes are employed in the production of biofuels, besides serving as models for the synthesis of biomimetic catalysts for fuel cells and aqueous non-toxic batteries. Therefore, understanding how bioelectrochemical mechanisms work in redox enzymes and their kinetic and thermodynamic properties allow to obtain simpler and biomimetic molecules, granting the advancement of the scientific and technological state-of-theart. In this sense, this Doctoral Thesis presents a proposal to investigate influence of transition metals present in the catalytic pocket of redox enzymes and also in biomimetic catalysts through in situ and operando spectroscopic and spectrometric techniques coupled to electrochemistry focusing on the electron transfer processes and the mechanisms involved. This Thesis is divided into three parts. In the first, we present a study in the far infrared region for the redox reactions with Prussian blue, ferrocene, and nickel phthalocyanine. The electron transfer reaction with these three compounds was monitored through the changes in the absorption of radiation by the metalligand moiety. We have overcome the experimental difficulties in working with aqueous medium, being possible to successfully propose a novel setup to probe the effect of the oxidation state of metallic centers on the vibrational modes of the first coordination sphere. In the second part of this Thesis, we present a new instrumental strategy for Raman spectroelectrochemistry and differential electrochemical mass spectrometry aiming to investigate the important reaction of the conversion of the nitrite ion to ammonia. Here, we propose to utilize the biomimetic catalyst iron phthalocyanine in aqueous phase, that is, dissolved in the electrolyte. Strategically, this configuration allows the observation of an unprecedent catalytic route, with the formation of nitric oxide, nitrous oxide, and hydroxylamine as intermediates, which have never been observed experimentally to this date. The third and last part of this Thesis consists of using synchrotron radiation, for the first time, in a bioelectrochemical study. Here, we propose an entrapment approach for the redox enzyme bilirubin oxidase in a carbon mesoporous matrix, used as bioelectrodes with operando X-ray absorption spectroscopy. The bioelectrocatalyzed oxygen reduction reaction to water was investigated in detail, being possible to propose a new mechanism of tridimensional catalysis, where the copper (II) sites present in the structure of bilirubin oxidase participate, step-by-step, in the electron transfer reaction playing the role of electronic bridges. Therefore, in the Thesis, we present three distinct ways of using in situ and operando spectroscopic and spectrometric techniques, contributing to the area of bioelectrochemistry with the direct visualization of how the centers containing transition metals work. Consequently, the instrumental strategies presented here contribute to promote the elucidation of complex mechanisms involving enzymes and biomimetic compounds.

Keywords: Oxygen reduction reaction; Multi-copper oxidases; Spectroelectrochemistry; X-ray absorption spectroscopy; Infrared; Raman; DEMS; Nitrite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	 Estrutura cristalina da BOx (<i>M. verrucaria</i>). (a) Estrutura completa de uma unidade da enzima; estrutura focada nos cofatores Cu²⁺ e os resíduos de aminoácido que se ligam (b) na estrutura T1 e (c) nas estruturas T3 e T2. (PDB número 2XLL)
Figura 2	 Mecanismo proposto para a redução de oxigênio à água por MCOs. As setas em vermelho indicam as etapas que pertencem ao ciclo catalítico
Figura 3 -	- Estrutura (a) cristalina da enzima nitrito redutase (<i>G. lovleyi</i>) e (b) do seu cofator grupo heme
Figura 4	- Etapas dos possíveis mecanismos propostos adotados para a eletrorredução de nitrito.
Figura 5 -	- Estruturas químicas de (a) um grupo heme genérico e de (b) uma ftalocianina de ferro tetrassulfonada
Figura 6 -	- Representação esquemática de (a) transições eletrônicas a partir das camadas específicas ao contínuo representado pela linha pontilhada e de (b) um espectro de XAS de uma borda K genérica. Destaques em cinza para a região de XANES e em vermelho para a região de EXAFS
Figura 7	 Espectros de XAS da borda K de Cu da <i>RvLc</i>. (a) Espectros na região de XANES da enzima em condições totalmente reduzida, totalmente oxidada e intermediária nativa. (b) Espectros na região do EXAFS mostrando a mudança na vizinhança química dos íons Cu nestas três condições
Figura 8	– Microespectroeletroquímica FT-IR de uma superfície de ouro modificado com o composto AP. (a) Espectros em cada potencial aplicado e (b) mudança ótica e química da referida superfície indicando a respostas dos modos vibracionais em relação ao potencial aplicado ao longo do eletrodo. A barra de escala simboliza 50 µm
Figura 9 -	- Eletrooxidação do etanol catalisada pela enzima ADH. (a) Cronoamperometria em 0,6 V e (b) curva de Lineweaver-Burk para a oxidação do cofator NADH. (c) Corrente iônica do fragmento de acetaldeído obtido por espectrometria de massas e (d) curva de Lineweaver-Burk da produção de acetaldeído
Figura 10	 – Fluxograma representativo das etapas utilizadas no desenvolvimento experimental do projeto. 35
Figura 11	 Fotografia de um eletrodo de tecido de carbono utilizado como eletrodo de trabalho.
Figura 12	2 – Esquema de evolução de potencial utilizada nas análises espectroeletroquímicas. A área marcada em vermelho denota o período de coleta do espectro após a estabilização do eletrodo
Figura 13	– Fotografia da janela hemisférica construída em PEAD

Figura 15 – Espectros de infravermelho em (a) atmosfera aberta e (b) com o compartimento purgado em fluxo de nitrogênio. Retângulos em vermelho destacam a região distante.

Figura 19 – (a) Espectro do AP na região FIR e um esquema ilustrativo dos movimentos dos átomos que proporcionam os modos vibracionais de (b) vFe–C e (c) δC–Fe–C na estrutura de simetria O_h (Átomos representados por esferas são: ferro – vermelho; carbono – cinza; e nitrogênio – azul).

- Figura 20 Resposta espectroscópica do AP na região FIR sob a aplicação de diferentes potenciais utilizando-se pasta de carbono como eletrodo de trabalho. Eletrólito de suporte: KCl $1,0 \text{ mol } L^{-1}, T = 20 \text{ }^{\circ}C.....51$

Figura 37 – Espectro de XAS da borda K de Cu de um eletrodo de TCo modificado com a enzima MvBOx
 Figura 36 – (a) Representação esquemática da montagem do porta-amostra/célula eletroquímica na estação experimental da linha XAFS2 do LNLS-CNPEM (fluxo de fótons 10⁹ fótons s⁻¹): (1) anel de armazenamento de elétrons, (2) monocromador, (3) primeira câmara de ionização (4) <i>Beamsplitter</i>, (5) folha de cobre utilizada como referência, (6) segunda câmara de ionização, (7) bloqueador de feixe, (8) porta-amostra contendo os três eletrodos, (9) detector. (b) Fotografias do sistema espectroeletroquímico em operação.
Figura 35 – Modelagem da curva voltamétrica da RRO catalisada pela enzima MvBOx
Figura 34 – Voltamograma cíclico do eletrodo modificado com a enzima <i>Mv</i> BOx em eletrólito saturado com (•) argônio e (•) oxigênio. Eletrólito de suporte: tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,2), T = 25 °C. Velocidade de varredura: 5 mV s ⁻¹
Figura 33 – Determinando a área de superfície ativa à eletroquímica. (a) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono em diferentes velocidades de varredura. (b) Diferença da corrente capacitiva em 0,6 V em função da velocidade de varredura. Eletrólito de suporte: tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,2), T = 25 °C
Figura 32 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura da camada de nanopartículas de carbono depositadas sobre o tecido de carbono
Figura 31 – Espectros de dicroísmo circular da enzima com Nafion. Espectro da (●) <i>Mv</i> BOx apenas em tampão fosfato e da (●) <i>Mv</i> BOx na presença de Nafion também em tampão fosfato.
 Figura 30 – Diagrama dos orbitais moleculares de um íon peróxido (a) ligado a um centro de Cu²⁺ e (b) fazendo ponte entre dois centros de Cu²⁺ explicando o emparelhamento eletrônico no sítio T3.
Figura 29 – Espectro da banda X de EPR da solução congelada de MvBOx em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2 (T = 77 K)
Figura 28 – Esquema ilustrativo do ciclo catalítico proposto para a redução eletroquímica de nitrito auxiliado pela FeFcTs
Figura 27 – Espectros de Raman na presença de FeFcTs (0,2 mg mL ⁻¹) e NaNO ₂ (50 mmol L ⁻¹) em eletrólito de HCl (0,1 mol L ⁻¹) com o eletrodo de trabalho submetido a -0,1 V. Região de (a) maior e (b) menor número de onda
Figura 26 – Espectroeletroquímica Raman de FeFcTs (0,2 mg mL ⁻¹) (a) na ausência e (b) na presença de NaNO ₂ (50 mmol L ⁻¹) em eletrólito de HCl (0,1 mol L ⁻¹). Detalhe em (b) indica o espectro de hidroxilamina
Figura 25 – (a) Intensidade dos fragmentos em espectrometria de massa referentes à m/z = 30 (NO, linha vermelha), m/z = 44 (N ₂ O, linha verde) e m/z = 17 (NH ₃ , linha preta sólida). A linha azul indica o potencial a qual o eletrodo de trabalho estava submetido. (b) Esquema ilustrativo dos equilíbrios químicos entre as espécies dentro do possível ciclo catalítico. Os experimentos foram realizados com presença de FeFcTs (0,2 mg mL ⁻¹) e NaNO ₂ (50 mmol L ⁻¹) em eletrólito de HCl (0,1 mol L ⁻¹)

- Figura 42 Mecanismo esquemático e simplificado da transferência interna de elétrons (a) na presença e (b) na ausência de O₂ ligado ao sítio ativo da MvBOx. (Átomos representados por esferas são: Cobre marrom; Oxigênio vermelho; e Hidrogênio branco)...... 80
- Figura 43 Geometrias da região QM neutra do sítio catalítico da *Mv*BOx com O₂ com (a) todos os íons cobre reduzidos a Cu⁺ e (b) região QM carregada com um elétron extra (-1).. 81

LISTA DE TABELAS

abela 1 – Exemplos de compostos contendo metais de transição e seus modos vibracionais	. 30
abela 2 – Reagentes e materiais utilizados nos experimentos	. 34
abela 3 – Equipamentos utilizados nos experimentos	. 35
abela 4 – Atribuição dos grupos absorventes do AP no espectro de FIR, a partir da referência	⁵³ .
	. 52
abela 5 – Atribuição dos grupos absorventes do ferroceno no espectro de FIR, a partir da referência ⁵⁵	55
abela 6 – Atribuição dos grupos absorventes da FeFcTs na espectroscopia Raman antes e apó	IS O
processo de redução, a partir da referência ³⁶	. 60
abela 7 – Potencial formal de cada centro de cobre da MvBOx para as reduções consecutivas	de
1 elétron	. 78

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag/AgCl _{sat}	Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata em meio saturado de cloreto de potássio		
AP	Azul da Prússia		
ATR	Espectroscopia no infravermelho por reflexão total atenuada (do inglês: <i>attenuated total reflection</i>)		
BP	Branco da Prússia		
C _{dl}	Capacitância da dupla camada elétrica		
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais		
Ср	Ciclopentadienil		
Cs	Capacitância específica		
DEMS	Espectrometria de massas eletroquímica diferencial (do inglês: differential electrochemical mass spectrometry)		
DLaTGS	Detector piroelétrico de radiação na região do infravermelho composto por sulfato de triglicina dopado com L-alanina e deutério		
D-P-A	Sistemas doador-ponte-aceptor		
ECSA	Área de eletroativa deste eletrodo (do inglês: electrochemical active surface area)		
EPR	Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (do inglês: <i>electron paramagnetic resonance</i>)		
ER	Enzimas redox		
EXAFS	Espectro estendido de absorção de raio-X de estrutura fina (do inglês: <i>extented X-ray absorption fine structure</i>)		
FeFcTs	Ftalocianina tetrasulfonada de ferro		
FFC	Fibras flexíveis de carbono		
FIR	Infravermelho distante (do inglês: far infrared)		
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês: <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)		
LNLS	Laboratório nacional de luz síncrotron		
МСО	Multi-cobre oxidase		
MIR	Infravermelho médio (do inglês: mid infrared)		
<i>Mv</i> BOx	Bilirrubina oxidase do microrganismo Myrothecium verrucaria		
m/z	Razão massa/carga em espectrometria de massas		
PCA	Potencial de circuito aberto		

PEAD	Polietileno de alta densidade		
PTFE	Politetrafluoretileno		
QM	Mecânica quântica (do inglês: quantum mechanics)		
RRO	Reação de redução de oxigênio		
RvLc	Laccase da árvore Rhus vernicifera		
SEM-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (do inglês: scannin, electron microscopy-field emission gun)		
TCo	Tecido de carbono oxidado		
ТСр	Tecido de carbono prístino		
TE	Transferência de elétrons		
UV-VIS	Espectroscopia na região do ultravioleta e visível		
VB	Verde de Berlim		
XANES	Espectro de absorção de raio-X próximo à borda (do inglês: X-ray absorption near- edge spectroscopy)		
XAS	Espectroscopia de absorção de raio-X (do inglês: X-ray absorption spectroscopy)		

Listas de Símbolos

Г	Quantidade de espécies reagentes em uma reação eletroquímica
Α	Área do eletrodo
Ε	Potencial elétrico
F	Constante de Faraday
i	Corrente elétrica
j	Densidade de corrente
n	Número de elétrons envolvido em uma reação eletroquímica
Т	Temperatura
V	Velocidade de varredura
v	Modo vibracional de estiramento
δ	Modo vibracional de dobramento

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	20
2.1	A FUNÇÃO REDOX DE METAIS DE TRANSIÇÃO EM ENZIMAS	20
2.2	COMPOSTOS BIOMIMÉTICOS DE CENTROS METÁLICOS ENZIMÁTICOS	23
2.3	TÉCNICAS OPERANDO E IN SITU EM BIOELETROQUÍMICA	26
2.3.	1 Espectroscopia de absorção de raio-X	27
2.3.	2 Espectroscopia vibracional	29
2.3.	3 Espectrometria de massas	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	34
4.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	34
4.2	ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	35
4.3	TRATAMENTO OXIDATIVO DAS PLATAFORMAS DE CARBONO E PREPARAÇ DOS ELETRODOS	ÇÃO 36
4.4	SÍNTESE DO COMPOSTO AZUL DA PRÚSSIA	37
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	38
4.6	DICROÍSMO CIRCULAR	38
4.7	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	38
4.8	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE RAIO-X	39
4.9	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	40
4.10) ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	40
4.1	I ESPECTROELETROQUÍMICA RAMAN	42
4.12	2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS ELETROQUÍMICA DIFERENCIAL	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	ESPECTROELETROQUÍMICA FIR PARA O ESTUDO DE REAÇÕES REDOX COM METAIS DE TRANSIÇÃO	Л 44
5.1.	1 Instrumentação	44
5.1.	2 Eletrodos de trabalho	47
5.1.	3 Espectroeletroquímica FIR do AP	49

5.1.4 Espectroeletroquímica FIR do ferroceno	. 53
5.1.5 Espectroeletroquímica FIR da ftalocianina de níquel	. 55
5.2 ATIVIDADE ELETROCATALÍTICA DA FTALOCIANINA DE FERRO FRENTE À REAÇÃO DE REDUÇÃO DE NITRITO	. 56
5.3 REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DE OXIGÊNIO PELA ENZIMA MvBOx	. 63
5.3.1 Caracterização da integridade da enzima	. 63
5.3.2 Preparo do biocátodo e atividade bioeletrocatalítica da MvBOx	. 67
5.3.3 Espectroeletroquímica XAS e ajuste computacional do comportamento dos íons cob durante a bioeletrocatálise da RRO	o re . 71
5.4 DISCUSSÃO GERAL: O IMPACTO DAS TÉCNICAS <i>IN SITU</i> NO AVANÇO DA BIOELETROQUÍMICA	. 82
6 CONCLUSÃO	. 85
7 PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS	. 87
8 REFERÊNCIAS	. 88
ANEXO	. 95

1 INTRODUÇÃO

Metais de transição estão comumente presentes em biomoléculas por propiciarem rotas mais favoráveis em processos de transferência de elétrons. No caso de metaloenzimas, as espécies metálicas pertencentes aos cofatores enzimáticos participam do ciclo catalítico por meio da variação em seu estado de oxidação, contribuindo nos mecanismos das reações. No entanto, a total influência de alguns metais nos processos bioeletrocatalíticos ainda não é compreendida em detalhe, o que torna esse problema interessante e importante na área de bioeletroquímica. Uma maneira de abordar os estudos fundamentais envolvendo metaloenzimas é a utilização de técnicas analíticas *in situ* e hifenizadas. No entanto, a espectroeletroquímica *in situ* envolvendo enzimas, por exemplo, é dificultada por uma série de fatores experimentais, como a interferência da água no eletrólito, que naturalmente absorve e espalha radiação eletromagnética.

Ressalta-se que, para além da bioeletroquímica, a busca por estratégias experimentais para a visualização dos fenômenos reacionais envolvendo biomoléculas é muito útil para os campos da bioquímica e biofísica. Por exemplo, a utilização da espectroscopia vibracional na região do infravermelho traz de forma robusta avanços no entendimento de algumas enzimas da classe oxidoredutase, como as hidrogênio molecular e nitrogênio molecular a amônia, respectivamente. No entanto, as ligações químicas envolvendo os metais de transição destes cofatores enzimáticos possuem atividades geralmente entre 400 e 50 cm⁻¹. Esta região, denominada infravermelho distante, é muito pouco explorada devido à necessidade de instrumentação dedicada, como porta amostras, bioeletrodos estáveis e detectores otimizados. Também, para além da espectroscopia, vários outros exemplos de técnicas analíticas poderiam ser citados como sendo de importância no estudo das metaloenzimas, como a cromatografia, a espectrometria de massas e o dicroísmo circular. Cada técnica, dentro da sua especificidade e propósito, tem sido foco de muita pesquisa ao longo dos últimos anos.

Portanto, dentro do contexto supracitado, introduz-se esta Tese de Doutorado com a proposta de apresentar a influência dos metais de transição presentes em sítios catalíticos de enzimas redox e de catalisadores biomiméticos. Também, pretende-se introduzir novos caminhos em instrumentação para o acoplamento de técnicas analíticas (espectroscópicas e espectrométricas)

à eletroquímica, em modo *in situ* e *operando*, com o foco nos processos de transferência de elétrons e dos mecanismos envolvidos em diferentes sistemas.

Serão abordados, primeiramente, uma revisão bibliográfica contendo o estado-da-arte em bioeletroquímica de enzimas redox e biomiméticos, assim como o detalhamento das instrumentações de grande importância para o acoplamento de técnicas à eletroquímica, em modo *in situ e operando*. Após a descrição dos objetivos e da parte experimental detalhada, dividiu-se os resultados obtidos durante o Doutorado em três partes independentes, mas complementares, que são: I) Estudo na região do infravermelho distante das reações redox com azul da Prússia, ferroceno e ftalocianina de níquel; II) Nova estratégia instrumental para a espectroeletroquímica Raman e espectrometria de massas eletroquímica diferencial visando observar a reação de redução do íon nitrito, utilizando o catalisador biomimético ftalocianina de ferro em fase aquosa. III) Utilização da radiação síncrotron no estudo bioeletroquímico da enzima bilirrubina oxidase em matrizes mesoporosas de carbono, usadas em bioeletrodos com a espectroscopia de absorção de raio-X (XAS) modo *operando*.

2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

2.1 A FUNÇÃO REDOX DE METAIS DE TRANSIÇÃO EM ENZIMAS

Dentre as diversas funções desempenhadas pelas proteínas para a manutenção da vida nos organismos, os processos energéticos dependem de transferência de elétrons e são geralmente facilitados por estruturas contendo metais de transição, visto que estes são prontamente capazes de trocar o estado de oxidação sem a demanda de altas taxas energéticas.¹

Por exemplo, a reação de redução de oxigênio (RRO) é um interesse para a área de eletroquímica principalmente pela possibilidade do uso dessa reação em cátodos de células a combustível, auxiliando a conversão de energia limpa.² Essa reação na tecnologia de células a combustível trabalhando-se em meios inorgânicos é usualmente processada com o auxílio de catalisadores a base de platina, em que se necessita de condições de temperatura³ e acidez⁴ impróprias para a promoção desta reação em condições fisiológicas para se ter um rendimento satisfatório na RRO tanto em termos energéticos quanto cinéticos.

No meio biológico, mesmo em um ambiente cujas condições de pH e temperatura são mandatoriamente moderadas, a RRO é alcançada com o auxílio de enzimas. Para esse fim, protagonizam-se as enzimas que contém centros de cobre no seus sítio ativos, conhecidas como multicobre oxidases (MCO).⁵ Um exemplar de MCO é a enzima bilirrubina oxidase (BOx) que também propicia a RRO, embora sua função primordial seja a oxidação da molécula de bilirrubina à biliverdina.⁶ A estrutura desta enzima proveniente do microrganismo *Myrothecium verrucaria* – *Mv*BOx (Figura 1a) tem 64 kDa e contém 4 íons cobre em um estado de oxidação 2+ quando no estado estacionário que estão organizados em 3 sítios: T1, T2 e T3 (Figura 1b).⁷

Figura 1 – Estrutura cristalina da BOx (*M. verrucaria*). (a) Estrutura completa de uma unidade da enzima; estrutura focada nos cofatores Cu²⁺ e os resíduos de aminoácido que se ligam (b) na estrutura T1 e (c) nas estruturas T3 e T2. (PDB número 2XLL)



Fonte: Autoria própria, utilizando o software UCSF Chimera.

Esses íons cobre estão diretamente associados à função catalítica na RRO à água via 4 elétrons, como descreve a seguinte reação global:

$$O_{2(aq)} + 4H^{+}_{(aq)} + 4e^{-} \rightleftharpoons 2H_2O_{(l)}$$

$$\tag{1}$$

O sítio T1 é composto por uma unidade de íon Cu e também chamado de sítio do "cobre azul" que é o responsável pela cor azulada característica dessa enzima. Neste sítio, ocorre a recepção dos elétrons oriundos da reação de oxidação do substrato orgânico e a subsequente transferência destes elétrons ao sítio conhecido como T2/T3. Isoladamente, o sítio T2 é composto por um único íon Cu enquanto o sítio T3 é composto por outras duas unidades de íons Cu. No entanto, devido à proximidade destes dois sítios, à interação eletrônica entre eles e como eles participam dos processos catalíticos dessa enzima, considera-se que estes dois sítios distintos façam parte de um sítio conjunto trinuclear ao invés de se trabalhar isoladamente como no caso do sítio T1.⁵ A atividade redox destes íons de cobre que se interconvertem Cu^+/Cu^{2+} para propiciar um ambiente químico favorável a processos de transferência de elétrons é responsável pela ancoragem da molécula de O₂ e sua subsequente redução à molécula de água.

O mecanismo proposto para a RRO catalisada por MCOs está ilustrado na Figura 2, em que se observa a necessidade da troca do estado de oxidação dos íons Cu no sítio ativo, após a

coordenação da molécula de oxigênio no sítio trinuclear T2/T3, para promover a clivagem apropriada da ligação O–O que direciona à produção final de água. Vê-se também que nenhuma das espécies oxigenadas se liga ao sítio T1. No entanto, este sítio é imprescindível para a o processo de transferência de elétrons dentro da estrutura enzimática RRO.⁸

Figura 2 – Mecanismo proposto para a redução de oxigênio à água por MCOs. As setas em vermelho indicam as etapas que pertencem ao ciclo catalítico.



Fonte: Adaptação de Macedo (2022) a partir de Solomon, Augustine e Yoon⁹ com permissão da Royal Society of Chemistry.

Nessa proposta de mecanismo, o sítio ativo das MCOs é ativado inicialmente pela promoção da redução dos íons Cu que ocorre tanto através da oxidação do substrato orgânico quanto pela doação de elétrons por um sistema eletroquímico quando a enzima está imobilizada na superfície de um eletrodo. Após isso, a molécula de oxigênio liga-se ao sítio T2/T3 e por meio da transferência de elétrons dos íons que estão reduzidos na forma Cu⁺ à molécula de oxigênio, temse a formação de água e regeneração dos íons à espécie divalente Cu²⁺ apropriados para novamente conduzir a reação de oxidação do substrato orgânico. No entanto, não se havia um entendimento de como ocorria o processo de transferência de elétrons dos centros metálicos no estado reduzido para a molécula de oxigênio e a carga energética que era demandada para a realização desse processo bioeletroquímico.

2.2 COMPOSTOS BIOMIMÉTICOS DE CENTROS METÁLICOS ENZIMÁTICOS

Outras reações também de grande interesse em bioeletroquímica envolvem espécies nitrogenadas, ainda mais porque as enzimas são capazes de catalisar reações com o excepcionalmente estável nitrogênio molecular em condições fisiológicas. Neste sentido, as espécies nitrogenadas são blocos fundamentais para a formação de inúmeros componentes de organismos vivos como os ácidos nucleicos e os aminoácidos,¹⁰ além de serem de grande interesse em processos industriais com destaque a aplicações agrícolas.¹¹ No entanto, devido à estabilidade da molécula de N₂, compostos iônicos são preferíveis nos processos e aplicações supramencionados, em que o íon amônio, espécie nitrogenada mais reduzida e mais prontamente reativa que o nitrogênio molecular, apresenta um protagonismo como precursor da maioria desses compostos à base de nitrogênio.¹² Em condições fisiológicas, esses processos são conduzidos por enzimas que reversivelmente proporcionam a conversão redox de NH₃ a NO₂⁻ e posteriormente a NO₃⁻.¹³

Assim, as enzimas do tipo nitrito redutase¹⁴ (Figura 3a) tem um importante papel no ciclo do nitrogênio na etapa que converte nitrito à amônia, o qual acontece em centros catalíticos onde porfirinas de ferro, também conhecidos como grupos heme (Figura 3b), promovem a biocatálise através da excelente capacidade tanto da coordenação de moléculas de substrato ao centro de ferro quanto pela transferência de elétrons devido à facilidade de se estabilizar em diferentes estados de oxidação.

Estes mecanismos propostos para a ação catalítica de enzimas e seus biomiméticos propõem que a rota é realizada com o óxido nítrico (NO) como intermediário conforme os seguintes passos reacionais, como exposto por Lehnert e colaboradores¹⁵:

$$NO_{2}(aq) + 2H^{+}(aq) + e^{-} \rightarrow NO_{(aq)} + H_{2}O_{(l)}$$

$$\tag{2}$$

$$NO_{(aq)} + 3H^{+}_{(aq)} + 3e^{-} \rightarrow NH_2OH_{(aq)}$$
(3)

$$NH_2OH_{(aq)} + 2H^+_{(aq)} + 2e^- \rightarrow NH_{3(aq)}$$
(4)



Figura 3 – Estrutura (a) cristalina da enzima nitrito redutase (G. lovleyi) e (b) do seu cofator grupo heme.

Fonte: Autoria própria, utilizando o software UCSF Chimera.

No entanto, os mecanismos de redução de nitrito não enzimáticos, seguem rotas em que os passos reacionais convergem no NO como intermediário e dele partem-se para os demais intermediários e produtos possíveis para a redução de nitrito, conforme apresenta a seguinte Figura 4 e um paralelo pode ser traçado com os fenômenos que acontecem em ambiente enzimático com esse mesmo ânion.

Figura 4 – Etapas dos possíveis mecanismos propostos adotados para a eletrorredução de nitrito.



Fonte: Adaptação de Macedo (2022) a partir de Wang et al.¹³ com permissão da Royal Society of Chemistry.

Em face desta estratégia bem-sucedida que foi desenvolvida pela natureza ao longo do processo evolutivo a fim de se proporcionar reações em condições fisiológicas, tem-se um interesse no entendimento de como seria possível esses processos em condições adversas às fisiológicas e assim replicar esses conceitos com estruturas miméticas mais simples de serem aplicadas em dispositivos tecnológicos.¹⁶ Neste âmbito, destaca-se atualmente o estudo de sistemas biomiméticos, em que a similaridade estrutural e química de sistemas sintéticos bioinspirados ajudam no entendimento de uma maneira mais simplificada o que ocorre nos complexos sistemas biológicos.¹⁷

Devido à grande recorrência dos grupos heme em proteínas redox, estes sistemas porfirínicos são os mais estudados. No entanto, a dificuldade de rotas sintéticas que levam à obtenção de porfirinas fez com que as ftalocianinas, que possuem características estruturais bastantes similares com as porfirinas (Figura 5), se tornassem modelos sintéticos em busca da mimetização deste recorrente cofator enzimático.^{18; 19}

Figura 5 – Estruturas químicas de (a) um grupo heme genérico e de (b) uma ftalocianina de ferro tetrassulfonada.



Fonte: Autoria própria

De fato, estes complexos de ftalocianina de ferro vêm sendo utilizados e aplicabilidades similares aos que se encontra na natureza com os grupos heme tem sido relatadas, arrolando-se a sulfoxidação de substratos orgânicos ocorrente em citocromo p450²⁰ e redução de oxigênio em heme-cobre oxidases.²¹ A bioinspiração também tem sido utilizada na síntese de compostos

multinucleares de cobre, em que tem sido reportado o estudo da função dos sítios binucleares de algumas MCOs nas RROs e como alguns intermediários se comportam.^{22; 24}

Embora esses avanços tenham impulsionado o entendimento de sistemas biológicos, a bioeletroquímica em associação com espectroscopia traz investigações mais profundas em sistemas mais complexos em condições de transferência de elétrons.

2.3 TÉCNICAS OPERANDO E IN SITU EM BIOELETROQUÍMICA

O acoplamento de instrumentações analíticas em química é um interessante conceito que permite a obtenção de múltiplas informações por análises simultâneas. O exemplo mais comum de acoplamento instrumental é feito com técnicas cromatográficas que separa os constituintes de uma amostra complexa, os quais posteriormente são analisadas por técnicas espectrométricas.²⁵ Com técnicas eletroquímicas, o acoplamento permite a modulação energética do sistema interfacial de um eletrodo e tanto os produtos gerados quanto a modificação na estrutura do eletrodo podem ser analisados por espectrometria simultaneamente, seja ela na região do ultravioleta e visível (UV-VIS),²⁶ no infravermelho (FT-IR, do inglês: *Fourier transform infrared*)²⁷ ou na espectrometria de massas (DEMS, do inglês: differential electrochemical mass spectrometry).²⁸ Esta abordagem abre os horizontes da determinação de mecanismos redox, uma vez que se torna possível a visualização dos efeitos dos processos eletroquímicos na estrutura da matéria envolvida nessas reações. Enquanto a eletroquímica fornece dados relativos à energia e à cinética do sistema, seu uso não é adequado para sozinha identificar novas espécies geradas pelas reações redox desempenhadas.²⁹ Com isso, o acoplamento de técnicas eletroquímicas a técnicas espectroscópicas e espectrométricas promove a simultânea análise dos processos redox e ainda permite se visualizar os fenômenos moleculares por meio de sinais espectroscópicos dos sistemas envolvidos na reação redox.

Nesse sentido, as espectroscopias e espectrometrias acopladas à eletroquímica se encaixam no conceito de espectroscopia *in situ*, que é definida como um conjunto de técnicas e medidas para estudos em condições de reação.³⁰ Já as técnicas *operando*, apresentadas à comunidade após estudos *in situ* envolvendo materiais catalíticos, por definição, são um subgrupo das espectroscopias *in situ*, mas restringe-se ao monitoramento de sistemas quando em condições de catálise, ou seja, em condições de operação.³¹

2.3.1 Espectroscopia de absorção de raio-X

A espectroscopia de absorção de raio-X (XAS, do inglês *X-ray absorption spectroscopy*) é uma ferramenta analítica que se baseia na interação da matéria com a radiação eletromagnética na região dos raio-X (comprimento de onda de 0,005 a 10 nm),³² cuja energia elevada (250 - 0,1 keV) é capaz de promover a excitação de elétrons mais internos da estrutura atômica, usualmente sendo estudadas as transições envolvendo elétrons da camada K e da camada L (Figura 6a). A vasta utilização desta técnica espectroscópica no estudo da matéria é um reflexo da sua especificidade ao elemento analisado pelo intervalo de energia usado no feixe para promover a transição eletrônica. Também esta técnica demonstra como o perfil desta transição eletrônica é sensível às ligações químicas que circundam na vizinhança atômica do elemento analisado.³³

Figura 6 – Representação esquemática de (a) transições eletrônicas a partir das camadas específicas ao contínuo representado pela linha pontilhada e de (b) um espectro de XAS de uma borda K genérica. Destaques em cinza para a região de XANES e em vermelho para a região de EXAFS.



Fonte: Autoria própria.

Os espectros de XAS que analisam transições da camada mais interna, são conhecidos como espectros da borda K e geralmente são divididos em duas regiões que fornecem informações distintas. Como apresentado na Figura 6b, a região conhecida como XANES (do inglês: *X-ray absorption near edge*) destacada em cinza fornece informação primariamente sobre o estado de oxidação e a densidade de cargas sobre o átomo ou íon analisado, enquanto que a região conhecida como EXAFS (do inglês: *extended X-ray absorption fine structure*) fornece informação sobre como

outros átomos estão organizados na vizinhança química ao redor do átomo ou íon analisado.³⁴ Esta ferramenta analítica tem sido utilizada para o estudo de metaloproteínas e tem se mostrado de grande valia para a avaliação de como o ambiente químico no cofator influencia na função biológica destas biomoléculas.

Como exemplo, Lee e colaboradores³⁵ estudaram o efeito do estado de oxidação do íon cobre, pertencentes à estrutura da enzima lacase da árvore *Rhus vernicifera* (*RvLc*), na atividade biocatalítica para promover a RRO à água. Esta enzima também é uma multicobre oxidase com semelhanças estruturais no sítio ativo à *Mv*BOx. Foi observado por XANES (Figura 7a) a redução efetiva dos íons Cu, com a atenuação da banda principal na borda K do Cu em 8997 eV e um novo sinal em 8984 eV, e por EXAFS (Figura 7b) como a esferas de coordenação destes íons cobre se modificavam. Este último foi evidenciado principalmente pela mudança do padrão de interferência entre 7 e 9 Å⁻¹ a cada passo reacional, determinando-se que a estrutura nativa intermediária era a maior responsável pelo ciclo catalítico por apresentar a maior velocidade de retorno ao estado oxidado.

Figura 7 – Espectros de XAS da borda K de Cu da *RvLc*. (a) Espectros na região de XANES da enzima em condições totalmente reduzida, totalmente oxidada e intermediária nativa. (b) Espectros na região do EXAFS mostrando a mudança na vizinhança química dos íons Cu nestas três condições.



Fonte: Adaptação de Macedo (2022) a partir de Lee et al.³⁵ com permissão da American Chemical Society.

Não apenas restringindo à análise de metais, a espectroscopia XAS mostra-se útil também para a investigação diretamente da esfera de coordenação através da análise dos espectros da borda K dos ligantes.³⁶ Essa abordagem consegue apontar o deslocamento do grau de covalência através de como a vizinhança química interage com o átomo que está realizando a ligação ao centro de

coordenação, usualmente apontando para maiores caráter covalente quando o átomo ligante apresenta maior massa molecular.³³

Muito embora tamanhas informações sejam obtidas com essa abordagem espectroscópica utilizando a instrumentação de XAS, a área de bioeletroquímica ainda carece de estudos envolvendo essa instrumentação com eletroquímica *in situ* para uma real visualização do processo bioeletrocatalítico em tempo real e onde as estruturas do cofator metálico influenciam nas etapas que promovem as reações em meio fisiológico.

2.3.2 Espectroscopia vibracional

Com a espectroscopia na região do infravermelho, realiza-se o estudo do comportamento da matéria por meio da radiação eletromagnética que compreende a faixa do infravermelho com comprimento de onda de 2,5 a 200 μ m (500 – 6 meV). A radiação nessa faixa do espectro interage com a matéria por meio de mudanças no dipolo da molécula durante a atividade dos modos vibracionais.³⁷ Com isso, grupos funcionais na estrutura da molécula em estudo podem ser identificados através de sinais característicos a específicas ligações entre os átomos que a compõem.

Esta técnica é frequentemente utilizada principalmente na análise da presença de grupos funcionais presentes em moléculas orgânicas, utilizando-se mais usualmente a radiação na faixa do infravermelho médio (MIR, do inglês: *mid infrared*) que se limita a um intervalo de números de onda de 4000 a 400 cm⁻¹.³⁸ Acoplando-se com o controle energético da amostra por eletroquímica e o adicional de localização espacial advindo da instrumentação microespectroscópica, essa técnica mostra-se uma poderosa candidata à resolução de problemas relacionados à transferência de elétrons em superfícies heterogêneas.³⁹ A compilação destas três instrumentações tem permitido o estudo espacial de como uma amostra que não se distribui uniformemente ao longo da superfície de um eletrodo, como no caso do azul da Prússia (AP).²⁷ Este composto possui atividade redox por seus centros de ferro que acaba por refletir nos modos vibracionais do ligante cianeto a eles coordenados. Com isso, a partir do monitoramento da evolução das bandas deste ligante em função do potencial, pode-se realizar a obtenção de mapas químicos referentes a cada modo vibracional observado no espectro e localizar-se em qual região da superfície a reação redox está acontecendo ou qual fração do eletrodo é eletroativa (Figura 8).

Figura 8 – Microespectroeletroquímica FT-IR de uma superfície de ouro modificado com o composto AP.
 (a) Espectros em cada potencial aplicado e (b) mudança ótica e química da referida superfície indicando a respostas dos modos vibracionais em relação ao potencial aplicado ao longo do eletrodo. A barra de escala simboliza 50 μm.



Fonte: Adaptação de Macedo (2022) a partir de Macedo e Crespilho,²⁷ com permissão da American Chemical Society.

Compostos inorgânicos contendo metais de transição, no entanto, apresentam modos vibracionais ativos em uma região do espectro que excede o limite do MIR, em que são ativos geralmente de 400 a 50 cm⁻¹, faixa esta conhecida como infravermelho distante (FIR, do inglês: *far infrared*).⁴⁰ Esse fato advém da constante vibracional da ligação estar relacionada à massa dos átomos envolvidos no modo vibracional, uma vez que o modo vibracional compreende na realização de um deslocamento dos átomos em relação ao centro de gravidade da molécula.⁴¹ Portanto, massas atômicas mais elevadas induzem a uma menor frequência de promoção da atividade vibracional das ligações. Consequentemente, compostos contendo metais de transição, cujas massas atômicas são consideravelmente mais elevadas que os elementos do primeiro e do segundo período da tabela periódica, possuem seus modos vibracionais geralmente ativos abaixo de 700 cm⁻¹, como pode ser visto na seguinte Tabela 1:

Tabela 1 - Exemplos de compostos contendo metais de transição e seus modos vibracionais

Estrutura	Modo vibracional	Máximo de absorção	Referência
Cu(en) ₂ Cl ₂	vCu–N	406 cm ⁻¹	Lever e Mantovani ⁴²
$Co_3[Co(CN)_6]$	vCo–C	457 cm ⁻¹	Carvalho et al.43
Fe ₃ O ₄	vFe–O	575 cm ⁻¹	Santos et al.44
[4Fe4S]	vFe–S	360 cm^{-1}	Hassan et al. ⁴⁵
$[MoS_4Fe_2Cl_4]^{2\text{-}}$	vMo–S	473 cm ⁻¹	Ryan e Li ⁴⁶

*o símbolo v se refere ao modo vibracional de estiramento da ligação

De maneira complementar, a espectroscopia Raman também é uma técnica que permite a investigação de modos vibracionais da matéria. Apesar de o fenômeno que causa a geração de sinal não ser uma absorção de luz, e sim o espalhamento de uma radiação monocromática incidida sobre a amostra e a consequente mudança de energia do fóton espalhado em relação ao fóton incidido,⁴⁷ a visualização de tais modos vibracionais por essa abordagem experimental coincide em termos de energia com aquelas feitas por espectroscopia no infravermelho.

A complementariedade destas duas espectroscopias vibracionais tem origem na simetria da matéria sob análise, ao passo que existem modos exclusivamente ativos na espectroscopia no infravermelho ou exclusivamente ativos na espectroscopia Raman e modos que são ativos em ambas as técnicas. Logo, o uso da espectroscopia no FIR em consonância com a espectroscopia Raman, cada uma com suas particularidades de fundamentação e de manejo experimental, pode levar à observação direta do comportamento de estruturas contendo metais de transição em grupos prostéticos de proteínas e assim se investigar a influência de sua geometria e da esfera de coordenação no papel biológico desempenhado por essas biomoléculas.⁴⁸

2.3.3 Espectrometria de massas

Outra ferramenta instrumental que favorece a observação em termos de estrutura molecular de forma a se entender como uma reação eletroquímica se processa é a espectrometria de massas. Neste caso, os produtos da reação eletroquímica são diretamente injetados no espectrômetro, arranjando-se a instrumentação de DEMS, e identificados através da intensidade da razão massa/carga detectada ao se atingir os sobrepotenciais necessários para o processamento da reação eletroquímica.

Por exemplo, a partir da análise por DEMS, foi relatado o mecanismo que governa a sequência reacional de oxidação do etanol a acetaldeído catalisada pela enzima álcool desidrogenase (*Saccharomyces cerevisiae*).²⁸ Por meio da espectrometria de massa, houve a possibilidade de se detectar a molécula de acetaldeído que é o produto desta oxidação, ao passo que a cinética de oxidação do cofator NADH, responsável pela troca de elétrons entre a estrutura enzimática e a molécula de etanol, foi paralelamente quantificada eletroquimicamente pela intensidade da corrente faradaica (Figura 9). Estes resultados remeteram a um mecanismo onde a

molécula de acetaldeído se desprende da estrutura enzimática 10⁷ vezes mais rapidamente que o cofator NADH, indicando que um mecanismo do tipo Bi Bi é favorecido nesta bioeletrooxidação.

Figura 9 – Eletrooxidação do etanol catalisada pela enzima ADH. (a) Cronoamperometria em 0,6 V e (b) curva de Lineweaver-Burk para a oxidação do cofator NADH. (c) Corrente iônica do fragmento de acetaldeído obtido por espectrometria de massas e (d) curva de Lineweaver-Burk da produção de acetaldeído.



Fonte: Adaptação de Macedo (2022) a partir de Souza et al.,²⁸ com permissão da Royal Society of Chemistry.

Com isso, a utilização das técnicas espectroeletroquímicas para a investigação de reações de transferência de elétrons é uma abordagem que pode ser aplicada à área de bioeletroquímica com o intuito de se resolver mecanismos envolvendo biomoléculas e compostos bioinspirados, como será abordado em detalhe nesta Tese.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esta Tese tem por objetivo geral investigar o papel desempenhado por íons de metais de transição no cofator de metaloenzimas e compostos biomiméticos em suas funções (bio)eletrocatalíticas e de que forma elas são processadas, por meio de uma visualização direta do comportamento destes metais, desenvolvendo-se abordagens experimentais baseadas em espectroeletroquímicas em modo *in situ* e *operando*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver sistemas experimentais para a realização de espectroeletroquímica com XAS, FIR, Raman e DEMS;
- Estudar compostos de coordenação AP, ferroceno e ftalocianina de níquel com propriedade redox por meio da técnica de espectroscopia FIR;
- Investigar a propriedade eletrocatalítica da ftalocianina de ferro frente à redução eletroquímica de nitrito como mimético de enzimas do tipo nitrito redutase;
- Examinar o papel da transferência de elétrons realizado pelos íons cobre na enzima bilirrubina oxidase do microrganismo *Myrothecium verrucaria* no processamento da reação de redução de oxigênio em condições fisiológicas.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Todas as vidrarias e substratos foram previamente limpos com os procedimentos adequados para cada sistema de modo a evitar qualquer tipo de contaminação nos experimentos. As soluções foram preparadas com água ultrapura com resistividade superior a 18 M Ω cm. Os experimentos foram realizados com os materiais e reagentes discriminados na Tabela 2 e utilizando-se os equipamentos listados na Tabela 3.

Reagente	Procedência
Ácido clorídrico	Fluka [®]
Ácido sulfúrico	Vetec®
Adesivo de silicone acético	Toi [®] Ved
Bilirrubina oxidase (proveniente da espécie Myrothecium verrucaria)	Sigma-Aldrich [®]
Cloreto de ferro (II) tetrahidratado	Sigma-Aldrich [®]
Dispersão de Nafion [®] 117 em mistura de álcoois	Sigma-Aldrich [®]
Eletrodo de disco de ouro (3 mm)	Metrohm®
Ferroceno	Sigma-Aldrich [®]
Fibras de carbono CCS 200	Texiglass®
Fosfato de sódio dibásico heptahidratado	Synth®
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	Synth®
Ftalocianina de ferro(III)-4,4',4'',4'''- ácido tetrassulfônico, com O_2	Sigma-Aldrich [®]
Ftalocianina de níquel	Sigma-Aldrich [®]
Gás argônio	Linde®
Gás oxigênio	Linde®
Hexacianoferrato (III) de potássio	Sigma-Aldrich [®]
Hidroxilamina	Sigma-Aldrich [®]
Isopropanol	Sigma-Aldrich [®]
Nanopartículas de carbono	Sigma-Aldrich [®]
Nitrito de sódio (¹⁴ N)	Sigma-Aldrich [®]
Nitrito de sódio (¹⁵ N)	Isotec [®]
Papel de carbono TGP-H-060	Toray®
Permanganato de potássio	Synth®
Polietileno de alta densidade	Alfa Aesar®
Tecido de carbono PWB-3	Stackpole Electronics, Inc [®]

Tabela 2 - Reagentes e materiais utilizados nos experimentos
Tabela 3 – Equipamentos utilizados nos experimentos

Equipamento	Fabricante
Espectrômetro de absorção de raio-X	LNLS/CNPEM
Espectrômetro de dicroísmo circular J-815	Jasco [®]
Espectrômetro de infravermelho Vertex 70v	Bruker [®]
Espectrômetro de massas OmniStar	Pfeiffer®
Espectrômetro EPR EMXplus	Bruker®
Espectrômetro Raman LabRam HR Evolution	Horiba [®]
Estufa	Nova ética [®]
Metalizadora MED 020	BAL-TEC®
Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo Magellan 400 L	FEI company®
Potenciostato/galvanostato PGSTAT204	Autolab®

4.2 ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

As etapas de procedimentos experimentais realizadas no desenvolvimento deste projeto encontram-se divididos em três principais focos, descritos na Figura 10 que sumariza as estratégias adotadas para as caracterizações dos sistemas e a avaliação da atividade redox por espectroscopias em cada um dos sistemas investigados.

Figura 10 - Fluxograma representativo das etapas utilizadas no desenvolvimento experimental do projeto.



Fonte: Autoria própria

4.3 TRATAMENTO OXIDATIVO DAS PLATAFORMAS DE CARBONO E PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS

Todos os materiais de carbono que foram utilizados como plataformas para os eletrodos de trabalho foram tratados com o procedimento descrito a seguir a fim de se gerar mais grupos funcionais oxigenados na superfície e proporcionar uma melhor transferência de elétrons na interface com o eletrólito. Os materiais de carbono foram imersos em uma solução contendo uma mistura de KMnO₄ e H₂SO₄ nas concentrações $2,45 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹, respectivamente. Este meio foi mantido em banho ultrassônico por 3 horas e então o material resultante foi lavado com HCl concentrado para a remoção do MnO₂ gerado e então lavado com água deionizada em abundância para a remoção deste ácido.⁴⁹

Para os experimentos de XAS, os tecidos de carbono foram cortados em pedaços retangulares de $15 \times 8 \text{ mm}^2$ para o posicionamento correto destes eletrodos no plano focal da célula espectroeletroquímica. O contato elétrico destes eletrodos foi construído com um arranjo de fibras flexíveis de carbono (FFC) e colado com resina epóxi. O contato elétrico foi então isolado com fita de politetrafluoretileno (PTFE). Um exemplar dos eletrodos construído seguindo essa metodologia é apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Fotografia de um eletrodo de tecido de carbono utilizado como eletrodo de trabalho.



Fonte: Autoria própria

Para os experimentos de XAS, adicionou-se uma camada de nanopartículas de carbono à superfície desses eletrodos de tecido de carbono pela deposição de 1 mg cm⁻² que foram previamente dispersadas em isopropanol. Sobre estes eletrodos foram depositados 50 μ L de enzima a uma concentração de 50 mg mL⁻¹ e secado a vácuo por 30 minutos. Após isso, 25 μ L de uma solução de Nafion 2,5% (m/v) foi depositada neste eletrodo e o mesmo foi seco a vácuo também por 30 minutos e armazenados em geladeira a 4 °C até o uso.

Para os experimentos de FIR, o papel de carbono oxidado foi cortado em pedaços circulares de 10 mm de diâmetro e colocado em contato com a superfície de um eletrodo de disco de ouro. Após isso, este eletrodo foi colado com adesivo de silicone acético e deixando-se vulcanizar o silicone por 24 horas em atmosfera aberta em temperatura ambiente. Ouro foi utilizado neste caso para promover o contato elétrico com o papel de carbono por ser um material inerte tanto nas condições químicas que foram trabalhadas quanto na faixa de potencial eletroquímico aplicado durante os experimentos.

4.4 SÍNTESE DO COMPOSTO AZUL DA PRÚSSIA

O composto de coordenação AP foi utilizado como padrão para os experimentos de espectroeletroquímica no FIR devido à sua conhecida atividade redox e também por apresentar atividade espectroscópica nesta região do espectro eletromagnético proveniente das ligações do tipo Fe–C.

Este composto foi sintetizado utilizando-se um procedimento descrito por Silva e colaboradores.⁵⁰ K₃[Fe(CN)₆] (6,6 mg, 0,02 mmol) foi dissolvido em 10 mL de água deionizada enquanto outra solução foi preparada dissolvendo-se FeCl₂·4H₂O (4 mg, 0,02 mmol) em 10 mL também de água deionizada. Sob agitação vigorosa da solução de FeCl₂, adicionou-se vagarosamente a solução de K₃[Fe(CN)₆], em que se percebia uma formação imediata de material de cor azul intensa característica do composto AP. A purificação desse composto foi feita com lavagem do precipitado com água deionizada e centrifugação.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os eletrodos modificados com as nanopartículas de carbono tiveram a morfologia de suas superfícies analisadas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM-FEG, do inglês: *scanning electron microscopy-field emission gun*). As imagens foram obtidas em um microscópio Magellan 400 L (FEI) com fonte de emissão de campo. Previamente às análises microscópicas, as amostras receberam um recobrimento de ouro (6 nm de espessura) em uma metalizadora MED 020 (BAL-TEC).

4.6 DICROÍSMO CIRCULAR

A estrutura secundária da enzima MvBOx foi investigada com o auxílio da técnica de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo. Os experimentos foram realizados em um espectrômetro J-815 (Jasco[®]) na faixa espectral de 260 a 214 nm a uma velocidade de varredura de 50 nm min⁻¹. Os espectros obtidos são uma resultante de 10 acumulações. A enzima foi dissolvida em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,2) a uma concentração final de MvBOx de 1,0 mg mL⁻¹. Também foi obtido um espectro da solução de MvBOx na presença do Nafion a uma concentração de 2,5 % em massa.

4.7 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

O espectro de ressonância paramagnética eletrônica (EPR, do inglês: *electron paramagnetic resonance*) da banda X da enzima *Mv*BOx foi obtido em um espectrômetro EMXplus (Bruker[®]) utilizando-se uma cavidade padrão TE102. As medidas foram realizadas em temperatura de 77 K com os seguintes parâmetros espectroscópicos: 9,66 GHz de frequência, 3 mW de potência, 100 kHz de modulação de frequência, 3 G de modulação de amplitude, 81,92 ms de constante de tempo e 327,68 ms de tempo de conversão, coletando-se um total de 8 varridas para a geração de um espectro. Um espectro do tampão sem a enzima foi realizado sob as

mesmas condições e subsequentemente subtraído do espectro da enzima para minimizar interferências de matriz e possibilitar uma análise apenas da estrutura do cofator.

4.8 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE RAIO-X

Os espectros de XAS foram obtidos nas instalações da linha de luz XAFS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM).⁵¹ As medidas foram realizadas no modo de fluorescência utilizando um detector de Ge de 15 elementos (Canberra). Incidiu-se o feixe na amostra e um tempo de coleta de 3 segundos foi utilizado para cada valor de energia varrido. Uma folha metálica de cobre foi utilizada como padrão de calibração simultaneamente à coleta do espectro da amostra, cujo ponto de cruzamento do zero na segunda derivada do espectro deste padrão foi calibrado a ser o valor de energia de 8979 eV.

Os experimentos de XAS em modo operando foram realizados com um porta-amostra customizado que opera como célula eletroquímica de três eletrodos conectados a um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 (Autolab), onde o eletrodo de carbono modificado com as enzimas fora posicionado diretamente em contato com a janela confeccionada em adesivo de poliimida (Kapton), de forma a minimizar a perda de sinal advinda de espalhamentos de radiação devido à presença de eletrólito no caminho ótico. Previamente à realização dos experimentos em modo operando, a área do eletrodo foi varrida com o feixe de raio-X e a posição de análise para todos os espectros em todas as condições de potencial eletroquímico foi mantida fixa onde o sinal de fluorescência foi inicialmente encontrado como mais intenso. Cada condição de potencial eletroquímico foi mantida fixa por 50 minutos durante à medida que era iniciada apenas após 10 minutos para a estabilização do potencial na interface do eletrodo de trabalho. Três eletrodos diferentes foram investigados com essa metodologia, em que cada um deles foi submetido a uma varredura de potencial em sentido negativo, iniciando-se em +0,8 e finalizando-se em -0,5 V sob ambas as condições de eletrólito saturado com argônio ou oxigênio. Os espectros foram processados utilizando-se o software Athena para obtenção de informação relativa à estrutura eletrônica dos metais que compõem as amostras na região XANES do espectro de raio-X.

4.9 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Para todos os ensaios eletroquímicos, utilizou-se uma configuração padrão de três eletrodos, utilizando-se os eletrodos de trabalho conforme a demanda do experimento, um fio de platina como contra-eletrodo e Ag/AgCl_{sat} como eletrodo de referência. Esses eletrodos eram conectados a um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 (Autolab[®]).

Nos experimentos com a enzima MvBOx, realizou-se os experimentos de voltametria cíclica com a atmosfera e o eletrólito saturados com oxigênio ou argônio com solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,2) utilizada como eletrólito de suporte. O procedimento de voltametria foi realizado a uma velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹ varrendo-se a faixa de potencial entre +0,8 e 0,0 V vs Ag/AgCl_{sat}. A saturação ocorreu com o aborbulhamento do gás por 15 minutos antes e continuamente durante a realização da medida eletroquímica.

Nos experimentos com o AP, o composto foi depositado sobre o eletrodo de papel de carbono oxidado que foi posteriormente utilizado como eletrodo de trabalho em meio eletrolítico de KCl (1,0 mol L⁻¹) em uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, sem controle da composição gasosa dissolvida no eletrólito.

Para os experimentos com nitrito, um eletrodo de ouro policristalino ($\emptyset = 3$ mm) foi utilizado como eletrodo de trabalho. Uma solução aquosa de HCl (0,1 mol L⁻¹) foi utilizada como eletrólito de suporte e os voltamogramas foram obtidos com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹ sob saturação de gás argônio no eletrólito, varrendo-se a faixa de potencial entre +0,7 e -0,3 V vs Ag/AgCl_{sat}. Para os experimentos em condição não-catalítica, alíquotas de uma solução estoque de NaNO₂ foram diluídas no meio eletrolítico. Na situação catalítica, as mesmas concentrações de NaNO₂ foram diluídas no eletrólito contendo ftalocianina de ferro tetrassulfonada (FeFcTs) (0,2 mg mL⁻¹).

4.10 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Devido à reconhecida transparência do polietileno de alta densidade (PEAD) à radiação na região do infravermelho distante, confeccionou-se uma janela hemisférica customizada por meio do derretimento de pérolas deste polímero a 120 °C em estufa em um molde que posteriormente

foi testada para a configuração de reflexão especular em um espectrômetro FT-IR Vertex 70v (Bruker[®]), utilizando-se um eletrodo de ouro como elemento refletor.

Alternativamente à opção de reflexão especular, foi montado um acessório para análise por reflexão total atenuada (ATR, do inglês: *attenuated total reflection*) cujo elemento de reflexão interna era composto de diamante, possibilitando uma análise em ambas as regiões do espectro de infravermelho MIR e FIR no intervalo de 4000 a 100 cm⁻¹. Com uma fonte de radiação composta por uma lâmpada de vapor de mercúrio, beamsplitter de Si-Mylar[®] e um detector DLaTGS foi possível adquirir informação de toda essa faixa espectral. Sobre o cristal do acessório de ATR foi montada uma célula eletroquímica em miniatura, composta por um eletrodo de trabalho, Ag/AgCl_{sat} e um fio de platina que eram empregados como eletrodo de referência e contra-eletrodo, respectivamente. A velocidade de varredura utilizada pelo interferômetro foi de 1,6 kHz e o espectro adquirido era uma resultante de 32 interferogramas.

Para os estudos com o AP em uma configuração experimental incial, eletrodo de trabalho era composto por uma pasta de carbono oxidado e Náfion[®] (5 %) na proporção 10 mg/10 μ L. Para esse fim, 10 mg do composto AP foram incorporadas juntamente ao Náfion[®] e ao pó de fibras de carbono oxidadas e o contato elétrico realizado por meio de um arranjo de FFC. Após a montagem da célula, 500 μ L de uma solução de KCl (1,0 mol L⁻¹) foram adicionados sobre o cristal de ATR para trabalhar como eletrólito suporte. Em cada coleta de espectro, o potencial foi aplicado e mantido fixo por 15 minutos e a medida do espectro iniciava-se após 10 minutos de estabilização do eletrodo de trabalho no determinado potencial, conforme esquematizado na Figura 12.

Em uma segunda configuração experimental, utilizou-se o papel de carbono oxidado como eletrodo de trabalho. Sobre a superfície do papel de carbono, foram dispersos 10 mg de AP previamente dispersos em água. O eletrodo foi seco em dessecador a vácuo por 1 hora e usado nos experimentos de espectroeletroquímica FIR.

Esta segunda configuração experimental foi utilizada para os estudos envolvendo as sondas redox ferroceno e ftalocianina de níquel. 10 mg destes compostos foram previamente dispersos em 100 μ L de isopropanol. 50 μ L desta dispersão foram dispostas sobre a superfície do eletrodo e o solvente evaporado antes do uso nos ensaios espectroeletroquímicos.

Figura 12 – Esquema de evolução de potencial utilizada nas análises espectroeletroquímicas. A área marcada em vermelho denota o período de coleta do espectro após a estabilização do eletrodo.



4.11 ESPECTROELETROQUÍMICA RAMAN

Os espectros de Raman foram coletados em um microscópio Horiba[®] LabRam HR Evolution. Nos experimentos, foram utilizados uma lente objetiva de $20 \times$ de magnitude e um laser de 785 nm como fonte de excitação da amostra a ~180 mW. Um sistema de três eletrodos composto por uma placa de ouro policristalino, Ag/AgCl_{sat} e um fio de platina que foram empregados como eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodo, respectivamente. Cada espectro foi coletado após 10 minutos de aplicação do potencial desejado para se atingir o equilíbrio na interface com o eletrodo de trabalho, sendo o espectro final uma resultante da média de 4 espectros individuais coletados continuamente com um tempo de exposição de 30 segundos cada. O meio eletrolítico foi composto de um eletrólito de suporte contendo HCl (0,1 mol L⁻¹) e neste dissolvidos FeFcTs (0,2 mg mL⁻¹) e NaNO₂ (50 mmol L⁻¹). Para a aquisição dos espectros a focalização da lente objetiva foi ajustada para a superfície do eletrodo de trabalho.

4.12 ESPECTROMETRIA DE MASSAS ELETROQUÍMICA DIFERENCIAL

Produtos gasosos e voláteis advindos das reações de redução de nitrito foram detectados utilizando-se a técnica de DEMS em um espectrômetro de massas OmniStar (Pfeiffer[®]). Uma malha de ouro utilizada como eletrodo de trabalho foi conectada diretamente ao duto de injeção do espectrômetro de massas enquanto Ag/AgCl_{sat} e um fio de platina eram empregados como eletrodo de referência e contra-eletrodo, respectivamente. O meio eletrolítico foi composto de um eletrólito de suporte contendo HCl (0,1 mol L⁻¹) e neste dissolvidos FeFcTs (0,2 mg mL⁻¹) e NaNO₂ (50 mmol L⁻¹).

Com o sistema interno do espectrômetro de massas sob ultra-alto vácuo $(1,6 \times 10^{-7} \text{ mbar})$, foi monitorada a evolução da intensidade dos sinais alusivos aos fragmentos de massa/carga (m/z) 17, 30 e 44, referentes às espécies NH₃, NO e N₂O, como possibilidade de produtos da reação eletroquímica de redução de nitrito, continuamente durante a aplicação de cada potencial eletroquímico de interesse, realizando-se uma varredura escalonada de potencial de +0,7 a -0,3 V.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESPECTROELETROQUÍMICA FIR PARA O ESTUDO DE REAÇÕES REDOX COM METAIS DE TRANSIÇÃO

Neste tópico serão apresentados, em detalhe, os procedimentos de otimização da instrumentação de espectroscopia na região do infravermelho distante para operações contendo meios aquosos e eletrolíticos e o desenvolvimento de plataformas eletródicas adequadas para essa instrumentação a fim de se desempenhar experimentos de espectroeletroquímica FIR. Com essa instrumentação, foram investigadas as reações redox envolvendo três diferentes compostos de coordenação, sendo eles: AP, ferroceno e ftalocianina de níquel.

5.1.1 Instrumentação

Para a investigação de fenômenos envolvendo metais de transição e sua esfera de coordenação, uma interessante ferramenta analítica é a espectroscopia vibracional. Especialmente, a região do infravermelho distante ou FIR, que é caracterizada pela radiação cujos números de onda compreendem entre 400 e 50 cm⁻¹, é adequada para a investigação destes sistemas haja vista que grupos pontuais contendo átomos com massa elevada como os metais de transição geralmente possuem modos vibracionais ativos nesta região do espectro eletromagnético.⁴⁰ No entanto, a realização de experimentos com FIR possui diversos interferentes que a limitam, como a atividade dos modos vibracionais da molécula de água em fase de vapor presentes na atmosfera.

Para desempenhar análises espectroscópicas *in situ* acopladas com eletroquímica, algumas tentativas foram realizadas com o intuito de minimizar o efeito desses interferentes no sinal espectroscópico. Para isso, inicialmente desenvolveu-se diversos experimentos utilizando um espectrômetro no modo de reflexão com o compartimento ótico evacuado (pressão interna inferior a 1,5 hPa) a fim de eliminar a interação de qualquer componente atmosférico com o feixe de infravermelho, equipando-se com células eletroquímicas possuindo janelas de materiais transparentes à radiação nesta faixa do espectro eletromagnético, tais quais silício e PEAD ambas em configuração hemisférica com 2,5 cm de diâmetro (Figura 13).



Figura 13 – Fotografia da janela hemisférica construída em PEAD.

Fonte: Autoria própria

No entanto, os sinais obtidos com essa configuração foram insatisfatórios devido à detecção de pouca radiação do feixe provavelmente pela absorção do feixe por parte do material componente da espessa janela de caminho ótico total de 2,5 cm.

Uma outra alternativa para a realização da espectroeletroquímica na região FIR foi utilizando uma configuração no modo ATR similar a configurações utilizadas para análises na região do infravermelho médio.⁵² No caso, empregou-se um cristal de diamante como elemento de reflexão interna por ser um sólido transparente à radiação infravermelha em quase toda sua faixa espectral até aproximadamente 100 cm⁻¹ e também insolúvel no meio de trabalho aquoso. Nesta configuração, um fino filme de eletrólito entre o eletrodo de trabalho e o cristal do ATR (~5 µm) é atingido pela penetração da onda evanescente e direcionado ao detector (Figura 14a).

Utilizando-se a configuração de análise no modo ATR, duas configurações de disposição da amostra analisada em relação ao cristal de ATR foram testadas. Na primeira, o eletrodo foi construído diretamente sobre o cristal de ATR a partir de uma pasta de FFC contendo o composto AP (Figura 14b). Na segunda configuração, imobilizou-se o compósito de FFC com AP na superfície de um eletrodo de papel de carbono (Figura 14c) que após a instalação na célula espectroeletroquímica seria pressionado contra o cristal de ATR para ter sua superfície analisada pela onda evanescente.

Figura 14 – Esquema ilustrativo de (a) uma célula eletroquímica acoplada ao porta-amostra de espectrômetro de infravermelho construída sobre o cristal de ATR; (b) de um eletrodo de trabalho em forma de pasta de carbono; e (c) de um eletrodo de trabalho na forma de papel de carbono.



Fonte: Autoria própria

No entanto, fatores como a baixa sensibilidade de detectores como o DLaTGS e a intensa absorção do gás CO₂ e do vapor de H₂O presentes na atmosfera tornam a análise de espectros no FIR inviáveis, principalmente em sistemas aquosos. A Figura 15a mostra o padrão de um espectro de infravermelho obtido em atmosfera aberta, destacando-se a alta absorção do feixe em números de ondas menores que 400 cm⁻¹. Estratégias como evacuar o compartimento ótico ou purgá-lo com fluxo de gás inerte e sem modos vibracionais ativos eliminam essas interferências e possibilitam a visualização mais clara de sinais nessa região do espectro. No presente estudo, alcançou-se esse objetivo construindo-se um compartimento isolado da atmosfera ambiente onde pôde-se realizar a passagem de gás nitrogênio através do compartimento ótico do espectrômetro, visto que nessa última configuração fica-se impossibilitada a evacuação do compartimento ótico do espectrômetro, alcançando-se assim sinais irrisórios de interferência devido aos gases presentes no ar atmosférico (Figura 15b).

Figura 15 – Espectros de infravermelho em (a) atmosfera aberta e (b) com o compartimento purgado em fluxo de nitrogênio. Retângulos em vermelho destacam a região distante.



Fonte: Autoria própria

5.1.2 Eletrodos de trabalho

Materiais de carbono são conhecidos por terem um ambiente propício à troca de cargas com biomoléculas, principalmente em se tratando de materiais grafíticos com alta densidade de defeitos estruturais. Óxido de grafeno e nanotubos de carbono incluem-se nesta lista de materiais comumente utilizados para a imobilização enzimática também por terem baixa dimensionalidade e assim propiciam uma melhor interação em questão de proximidade junto ao sítio redox da enzima. No entanto, a interação da superfície de carbono tanto com a própria enzima quanto com o eletrólito utilizado nas medidas eletroquímicas, isto é, a hidrofobicidade, é um aspecto crucial na otimização destas plataformas. Dessa forma, o suporte adotado neste estudo foi composto de fibras de carbono na forma de tecido flexível, aqui chamado de tecido de carbono prístino ou TCp. Em sua forma prístina, as fibras de carbono possuem estrutura muito similar ao grafite cuja superfície possui baixa população de funções oxigenadas, conferindo-lhes alta hidrofobicidade e quando em contato com água, há pouca interação não molhando o tecido (Figura 16 esquerda). Ao passo que esse tecido é submetido a um tratamento de oxidação de sua superfície em meio aquoso contendo KMnO4 e H₂SO₄ em banho ultrassônico, as camadas superficiais das fibras que compõem o tecido são oxidadas e funções oxigenadas como hidroxilas, carboxilas e quinonas são geradas⁵³ e conferem

uma maior hidrofilicidade ao tecido de carbono oxidado ou TCo, sendo molhado mais efetivamente quando em contato com água (Figura 16 direita).

Figura 16 – Interação do tecido de carbono com água antes e depois de ser realizado o procedimento de oxidação da superfície das fibras que o compõem.



Fonte: Autoria própria

Posteriormente, serão apresentados estudos utilizando papel de carbono como plataforma coletora de cargas. Uma vez que o papel de carbono prístino também apresenta alta hidrofobicidade, o mesmo tratamento foi aplicado a esse material para maximizar as propriedades de molhabilidade. Após o tratamento oxidativo, observa-se também um aumento da hidrofilicidade uma vez que o formato da gota de água se espalha mais facilmente sobre a superfície do papel de carbono, ao contrário do papel de carbono prístino, cuja superfície de contato com a gota de água é mínima (Figura 17).

Figura 17 – Interação do papel de carbono com água antes e depois de ser realizado o procedimento de oxidação da superfície.



Prístino

Oxidado

Fonte: Autoria própria

5.1.3 Espectroeletroquímica FIR do AP

Para a verificação da viabilidade deste sistema para o estudo dos modos vibracionais envolvendo metais de transição e seus ligantes em biomoléculas, primeiramente utilizou-se o AP como padrão para uma prova de conceito, que possui dois centros metálicos de ferro em estados de oxidação diferentes ($Fe^{2+} e Fe^{3+}$) com ligantes cianeto que fazem ponte entre os íons ferro.⁵⁴ Devido a esses dois centros metálicos, em que ambos podem adotar os estados de oxidação 2+ ou 3+, tem-se três diferentes compostos dependendo do potencial aplicado, sendo eles o branco da Prússia (BP), o AP e o verde de Berlim (VB) cujas combinação dos centros metálicos são $[Fe^{2+}Fe^{2+}], [Fe^{2+}Fe^{3+}] e [Fe^{3+}Fe^{3+}], respectivamente. Como observado no voltamograma obtido$ com um eletrodo modificado com uma pasta de fibras de carbono contendo o AP, um par redox $cujo potencial de meia onda (<math>E^0$) centra-se em 0,25 V vs Ag/AgCl_{sat} (Figura 18), referente à seguinte reação redox:

$$K_2[Fe^{2+}Fe^{2+}(CN)_6] (BP) \rightleftharpoons K[Fe^{2+}Fe^{3+}(CN)_6] (AP) + K^+ + e^-$$
 (5)





Fonte: Autoria própria

Com isso, este mesmo intervalo de potencial foi utilizado para a realização dos experimentos de espectroeletroquímica com o intuito de se observar a transição do estado de oxidação $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ dos centros de coordenação do composto AP e como os modos vibracionais envolvendo as estruturas metal-ligante respondem a essa reação redox por meio de alteração nas bandas do espectro de FIR.

Para o AP em condição de potencial de circuito aberto, o espectro de FIR apresenta duas bandas de absorção distintas com máximos posicionados em 490 e 220 cm⁻¹ (Figura 19) que são atribuídos aos modos vibracionais de estiramento da ligação Fe–C e de dobramento da unidade C–Fe–C, respectivamente.⁵⁵ Os centros de ferro em estruturas do tipo $[Fe(CN)_6]^{x-}$ são caracterizados como pertencentes ao grupo pontual O_h e com isso as vibrações dessa estrutura seguem as operações de simetria desse grupo, sendo que as ativas no infravermelho são pertencentes ao modo T_{1u} por apresentarem vibrações assimétricas na estrutura resultando em uma mudança no dipolo elétrico total da estrutura (Figura 19b,c).

De fato, mudanças espectrais na região FIR são observadas ao se modular a condição de potencial eletroquímico sob o qual o AP está condicionado, indicando uma resposta dos modos vibracionais ao estado energético (Figura 20). Realizando-se uma titulação no sentido oxidativo, isto é, partindo-se do composto BP aplicando-se -0,1 V e modulando-se a potenciais cada vez mais positivos para promover a oxidação ao composto AP, observa-se o crescimento de bandas similares àquelas observada no espectro do AP e o aparecimento de bandas negativas em região cujos sinais são atribuídas aos modos vibracionais das ligações contendo exclusivamente íons Fe²⁺, mostrando a atividade e sensibilidade da ligação da estrutura inorgânica ao estado de oxidação do centro metálico. Neste caso, utilizou-se o espectro obtido em -0,1 V como referência e todos os demais espectros obtidos na varredura espectroeletroquímica foram subtraídos em relação a ele. A atribuição destes sinais conforme a mudança no estado de oxidação do centro de ferro está apresentada na Tabela 4.

Figura 19 – (a) Espectro do AP na região FIR e um esquema ilustrativo dos movimentos dos átomos que proporcionam os modos vibracionais de (b) νFe–C e (c) δC–Fe–C na estrutura de simetria O_h (Átomos representados por esferas são: ferro – vermelho; carbono – cinza; e nitrogênio – azul).



Fonte: Autoria própria

Figura 20 – Resposta espectroscópica do AP na região FIR sob a aplicação de diferentes potenciais utilizando-se pasta de carbono como eletrodo de trabalho. Eletrólito de suporte: KCl $1,0 \text{ mol } L^{-1}, T = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}.$



Fonte: Autoria própria

Crupo ativo	Sinal no FIR (cm ⁻¹)	
Grupo auvo –	Fe ²⁺ -CN-Fe ³⁺	Fe ²⁺ -CN-Fe ²⁺
vFe–C	490	517
δC–Fe–C	220	270

Tabela 4 – Atribuição dos grupos absorventes do AP no espectro de FIR, a partir da referência 55.

* o símbolo v se refere ao modo vibracional de estiramento da ligação

o símbolo δ se refere ao modo vibracional de dobramento da estrutura

Essa observação espectroscópica de deslocamento da banda de absorção a menores números de onda após a redução do composto BP ao composto AP é consistente com a série espectroquímica relatada por Nakagawa e Shimanouchi,⁵⁶ em que a constante de força dos modos vibracionais v(Fe-C) e $\delta(C-Fe-C)$ aumenta na ordem <u>*Fe*³⁺</u><Co³⁺<<u>*Fe*²⁺</u><Ru²⁺<Os²⁺ para compostos do tipo hexaciano.

Também se utilizou uma segunda configuração experimental, em que o eletrodo de trabalho foi construído de maneira diferente do anteriormente descrito, cuja montagem havia sido realizada diretamente sobre o elemento de reflexão interna do acessório de ATR no espectrômetro. Nesta configuração alternativa, analisou-se também o composto AP imobilizado em um eletrodo de papel de carbono oxidado e os espectros coletados sob diferentes aplicações de potencial são apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Resposta espectroscópica do AP na região FIR sob a aplicação de diferentes potenciais utilizando-se papel de carbono como eletrodo de trabalho. Eletrólito de suporte: KCl $1,0 \text{ mol } L^{-1}, T = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}.$



Fonte: Autoria própria

De forma similar, as bandas referentes aos modos vibracionais v(Fe-C) e $\delta(C-Fe-C)$ também apresentam o mesmo comportamento em função do potencial aplicado, indicando uma resposta satisfatória para ambas as metodologias experimentais utilizadas na realização destes experimentos de espectroeletroquímica no FIR. Devido à maior reprodutibilidade dos experimentos com esta segunda configuração, outras sondas redox contendo centros de coordenação metálicos foram investigadas com essa abordagem a fim de se verificar a viabilidade para com outros sistemas diversos.

5.1.4 Espectroeletroquímica FIR do ferroceno

Para outra prova de conceito de espectroeletroquímica FIR, utilizou-se a sonda redox ferroceno que é composta por um centro de ferro em forma de sanduíche com dois anéis de ciclopentadienil (Cp). Este centro de ferro tem um par redox envolvendo um elétron relacionado à interconversão entre os estados de oxidação 2+ e 3+, conforme a seguinte reação:

$$Fe^{2+}(Cp)_2 \rightleftharpoons e^- + Fe^{3+}(Cp)_2$$
(6)

cujas modificações espectrais de cunho vibracional esperadas estão centradas na ligação Fe–C mas também sendo refletido nas outras ligações vizinhas ao centro metálico, como no caso da ligação C–H do anel de Cp. O espectro de infravermelho do ferroceno (Figura 22a inferior) apresenta quatro sinais centrados em 472, 488, 783 e 812 cm⁻¹ atribuídos aos modos vibracionais de estiramento da ligação *v*Fe–C (A'₂), deformação do anel (E'₁) e δ C–H (A''₂ e E'₁), respectivamente⁵⁷ (Figura 22b, c).

Figura 22 – (a) Espectros de FT-IR do ferroceno (superior) em varredura espectroeletroquímica e (inferior) espectro absoluto em fase sólida; e um esquema ilustrativo dos movimentos dos átomos que proporcionam os modos vibracionais de (b) vFe–C e (c) δ C–H na estrutura de simetria D_{5h} (Átomos representados por esferas são: ferro – vermelho; carbono – cinza; e hidrogênio – branco).



Fonte: Autoria própria

A resposta espectral relativa à mudança do estado de oxidação do centro de ferro na estrutura do ferroceno é evidenciada pelo deslocamento destes quatro sinais a valores de números de onda mais elevados (Figura 22a superior), deslocando-se conforme apresentado na Tabela 5, sendo possível correlacionar cada máximo de absorção com o modo vibracional em um estado de oxidação do centro redox da estrutura.

Grupo otivo	Sinal no FIR (cm ⁻¹)	
Grupo anvo	$Fe^{2+}(Cp)_2$	$Fe^{3+}(Cp)_{2}$
vFe–C	472	505
δСр	488	524
δC–H (Å" ₂)	783	831
$\delta C-H(\dot{E_1})$	812	855

Tabela 5 – Atribuição dos grupos absorventes do ferroceno no espectro de FIR, a partir da referência ⁵⁷.

5.1.5 Espectroeletroquímica FIR da ftalocianina de níquel

Em uma outra sonda redox, utilizando-se a ftalocianina de níquel, cuja atividade redox pode ser alcançada por meio da mudança de estado de oxidação do centro de níquel entre os estados 2+ e 3+, também foi vislumbrada a observação de modos vibracionais na esfera de coordenação deste metal. No caso, esta ftalocianina possui um sinal intenso em 724 cm⁻¹ que é atribuído ao modo vibracional de estiramento da ligação Ni–N ⁵⁸ (Figura 23a, inferior). De fato, no espectro da diferença entre o estado reduzido (em -0,4 V) e o estado oxidado (em +1,0 V), observa-se o deslocamento deste sinal em 724 cm⁻¹ para 730 cm⁻¹ (Figura 23a, superior), como efeito da mudança do estado de oxidação no centro metálico neste modo E_u de estiramento (Figura 23b).

Estes resultados indicam a possibilidade de se investigar as mudanças em estruturas contendo centros metálicos, como compostos de coordenação e metaloproteínas, por meio da observação direta dos modos vibracionais dos grupos metal-ligante e suas respostas em relação ao estado de oxidação do centro metálico para assim se vislumbrar como a mudança do estado de oxidação do centro metálico nessas estruturas influencia e direciona os processos catalíticos ou estruturais aos quais esses compostos são designados.

Figura 23 – (a) Espectro de FT-IR da ftalocianina de níquel (superior) em varredura espectroeletroquímica e (inferior) espectro absoluto em fase sólida e um esquema ilustrativo dos movimentos dos átomos que proporcionam os modos vibracionais de (b) vNi–N na estrutura de simetria D_{4h} (Átomos representados por esferas são: níquel – roxo; carbono – cinza; nitrogênio: azul; e hidrogênio – branco).



Fonte: Autoria própria

5.2 ATIVIDADE ELETROCATALÍTICA DA FTALOCIANINA DE FERRO FRENTE À REAÇÃO DE REDUÇÃO DE NITRITO

A reação de redução de nitrito é uma importante etapa nos mecanismos de conversão de espécies nitrogenadas. Em meios biológicos, essas reações ocorrem com o auxílio de grupos heme localizados nos centros ativos de enzimas do tipo nitrito redutase e, devido à similaridade estrutural e química, vislumbrou-se a possibilidade da utilização da ftalocianina tetrassulfonada de ferro (FeFcTs) como um biomimético sintético para a reação de redução de nitrito em um processo eletrocatalítico de fase homogênea bioinspirado.

Nesse sentido, a possibilidade de atividade eletrocatalítica da FeFcTs para esse tipo de reação foi avaliada primeiramente por voltametria de varredura linear. Assim, padronizou-se o sistema com o experimento sendo realizado com eletrodo de ouro e tendo-se HCl (0,1 mol L⁻¹) como eletrólito de suporte. Ao se adicionar incrementos de NaNO₂ nesse meio eletrolítico, não é observada mudança significativa de corrente faradaica nos voltamogramas obtidos (Figura 24a). No entanto, nota-se uma intensificação na corrente proveniente da redução de prótons decorrente do aumento da força iônica do meio eletrolítico ao se incrementar a concentração de espécies eletrolíticas no meio.⁵⁹ Por outro lado, o sistema contendo apenas o eletrólito de suporte (HCl, 0,1 mol L⁻¹) e a ftalocianina de ferro (Figura 24b linha vermelha), observa-se uma onda de redução pobremente definida em -0.2 V relacionada à redução do anel orgânico da ftalocianina, similarmente ao descrito por Zecevic e colaboradores.⁶⁰ Ao se realizar as medidas voltamétricas em condições da presença de nitrito com este adicional da presença de FeFcTs no eletrólito, observam-se correntes faradaicas de redução cujas intensidades acompanham a concentração de NaNO₂ dissolvido no meio eletrolítico (Figura 24b). Estas evidências levam, portanto, a indícios de atividade eletrocatalítica da FeFcTs frente à reação de redução de nitrito.

Figura 24 – Voltamogramas de varredura linear de contendo nitrito de sódio em diversas concentrações em (a) ausência e (b) presença de FeFcTs (0,2 mg mL⁻¹) no eletrólito. Velocidade de varredura: 10 mV s⁻¹, T = 25 °C e eletrólito de suporte: HCl (0,1 mol L⁻¹). As setas vermelhas indicam o sentido da varredura.



Com o intuito de se identificar os produtos da reação de redução eletroquímica de nitrito catalisada pela FeFcTs, empregou-se a técnica de DEMS, visto que essa instrumentação permite a detecção simultânea de produtos gasosos ou de alta pressão de vapor que são formados na

superfície do eletrodo, uma vez que o eletrodo de trabalho fica conectado diretamente ao duto de injeção de um espectrômetro de massas.²⁸ O controle eletroquímico deste experimento foi realizado por meio de uma varredura escalonada de potencial, mantendo-se um valor constante de potencial por 10 minutos. Esta varredura foi realizada iniciando-se em potenciais mais elevados e evoluindo-se a potenciais mais negativos a fim de se proporcionar gradativamente cada etapa de redução no ciclo catalítico e se observar os referentes produtos, em sequência de redução eletroquímica.

A Figura 25a apresenta os resultados de corrente iônica obtidos para cada um dos fragmentos massa/carga (m/z) no experimento realizado com o DEMS. Inicialmente, isto é, em condição de potencial de circuito aberto (PCA), tem-se a presença preponderante do íon nitrito. No entanto, ao se aplicar um potencial de +0,7 V, observa-se o imediato crescimento do sinal do fragmento de m/z = 30, indicando a redução de nitrito a óxido nítrico (NO). Atingindo-se o potencial igual a +0,2 V, concomitantemente à atenuação do sinal m/z = 30, observa-se a evolução de um sinal relacionado à fração m/z = 44, referente à espécie óxido nitroso (N₂O), onde este produto continua sendo produzido constantemente nos potenciais subsequentes.

Figura 25 – (a) Intensidade dos fragmentos em espectrometria de massa referentes à m/z = 30 (NO, linha vermelha), m/z = 44 (N₂O, linha verde) e m/z = 17 (NH₃, linha preta sólida). A linha azul indica o potencial a qual o eletrodo de trabalho estava submetido. (b) Esquema ilustrativo dos equilíbrios químicos entre as espécies dentro do possível ciclo catalítico. Os experimentos foram realizados com presença de FeFcTs (0,2 mg mL⁻¹) e NaNO₂ (50 mmol L⁻¹) em eletrólito de HCl (0,1 mol L⁻¹).



Com a progressão da varredura a potenciais mais negativos, tem-se uma mudança na evolução do sinal referente ao N₂O quando se atinge o potencial igual a -0,1 V, em que, embora haja um aumento no referido sinal, este não se mantém e decai com o tempo. Este fato remete ao consumo do próprio N₂O produzido no mesmo potencial. Isso indica que há um estado de equilíbrio que está sendo deslocado, uma vez que essa espécie contribui para a formação de outro intermediário nitrogenado em uma próxima etapa de redução (Figura 25b).

No intervalo de potencial entre -0,1 e -0,3 V, não mais se observa a formação de N₂O e de nenhum outro produto detectável por DEMS com os valores de razão m/z monitorados. Como proposto por outros estudos referentes à redução eletroquímica de nitrito e compostos pertencentes ao ciclo do nitrogênio¹³, um possível produto no curso da redução de nitrito à amônia é o composto hidroxilamina (NH₂OH) que possui forma cristalina e não apresenta volatilidade suficiente para detecção por DEMS. Posteriormente, ao se atingir o potencial de -0,3 V, tem-se o aumento na intensidade do sinal m/z = 17, referente à amônia. A formação desta espécie durante o processo de eletrorredução investigado leva à conclusão de que este ciclo catalítico pode ser finalizado alcançando-se a espécie nitrogenada mais reduzida: NH₃.

Desenvolveu-se, então, uma investigação acerca das mudanças estruturais na molécula da FeFcTs necessárias para se proceder à catálise da eletroredução de nitrito, adicionalmente à possibilidade de se visualizar produtos e intermediários deste processo com o auxílio da espectroeletroquímica Raman. O mesmo intervalo de potencial foi utilizado na varredura para a obtenção dos espectros em cada potencial desejado. Em uma primeira etapa experimental, realizouse apenas a varredura em um eletrólito contendo FeFcTs sem a presença de nitrito, com o intuito de se observar as mudanças estruturais advindas do processo de redução da FeFcTs.

A Figura 26a apresenta os espectros nesta varredura em meio não catalítico, em que se observam mudanças em sinais referentes a modos vibracionais relacionados exclusivamente à fração orgânica de isoindole da ftalocianina, sendo eles: 500, 676 e 751 cm⁻¹,⁵⁸ deslocando-se para 506, 687 e 745 cm⁻¹, respectivamente, cujas atribuições dos modos vibracionais encontram-se discriminados na Tabela 6. A banda em 597 cm⁻¹, referente ao modo vibracional de estiramento da ligação Fe–N_(anel) (A_{1g}) se mantém inalterada indicando a inércia do estado de oxidação do centro metálico de ferro da FeFcTs nesse processo redox.

Figura 26 – Espectroeletroquímica Raman de FeFcTs (0,2 mg mL⁻¹) (a) na ausência e (b) na presença de NaNO₂ (50 mmol L⁻¹) em eletrólito de HCl (0,1 mol L⁻¹). Detalhe em (b) indica o espectro de hidroxilamina.



Fonte: Autoria própria

Tabela 6 – Atribuição dos grupos absorventes da FeFcTs na espectroscopia Raman antes e após o processo de redução, a partir da referência ⁵⁸.

Correct etime	Sinal de Raman (cm ⁻¹)		
Grupo ativo	$[Fe^{2+}FcTs^{5-}]^{3-}$	$[Fe^{2+}FcTs^{6-}]^{4-}$	
Torção do isoindole (Eg)	500	506	
Expansão do isoindole (A _{1g})	676	687	
Dobramento para fora do plano de C–H (Eg)	751	745	

A não alteração do sinal relacionado ao modo vibracional da ligação metal-ligante adicionalmente à alteração em modos vibracionais relacionados exclusivamente à fração orgânica da ftalocianina indicam a redução do anel deste ligante equatorial a um estado mais reduzido, conforme a seguinte reação descreve:

$$[Fe^{2+}FcTs^{5-}]^{3-} + e^{-} \rightleftharpoons [Fe^{2+}FcTs^{6-}]^{4-}$$
 (7)

O mesmo procedimento de varredura espectroeletroquímica foi realizado com a presença de nitrito para a promoção da atividade catalítica, em que algumas alterações são observadas quando comparados à ausência deste íon no eletrólito. As mudanças espectrais mais evidentes são relacionadas ao surgimento interino dos sinais centrados em 550 e 1036 cm⁻¹ (Figura 26b). Estes

sinais são observados simultaneamente no potencial igual a -0,1 V, em que podem ser atribuídos aos estiramentos vFe-N≡NO e vO–N da hidroxilamina quando coordenada ao centro de ferro da FeFcTs, respectivamente. Para comparações, um espectro da hidroxilamina foi coletado também em solução aquosa de HCl (0,1 mol L⁻¹) similar ao meio sob investigação e este apresenta um sinal em 1002 cm⁻¹, atribuído ao modo vibracional de estiramento da ligação N–O (Figura 26b superior).

A atribuição desses sinais no espectro de Raman foi confirmada utilizando-se da estratégia de deslocamento isotópico, visto que a energia necessária para promover o modo vibracional depende da massa reduzida da estrutura em vibração.⁶¹ Neste sentido, realizou-se a mesma varredura de potencial em espectroeletroquímica Raman permutando-se o sal de nitrito de sódio dissolvido no meio eletrolítico, inicialmente com abundância natural de nitrogênio (Na¹⁴NO₂), pelo sal de nitrito de sódio com abundância enriquecida de nitrogênio de massa igual a 15 u (Na¹⁵NO₂).

Figura 27 – Espectros de Raman na presença de FeFcTs (0,2 mg mL⁻¹) e NaNO₂ (50 mmol L⁻¹) em eletrólito de HCl (0,1 mol L⁻¹) com o eletrodo de trabalho submetido a -0,1 V. Região de (a) maior e (b) menor número de onda.



Fonte: Autoria própria

Comparando-se o espectro obtido quando o eletrodo de trabalho está modulado em -0,1 V, observa-se de fato uma mudança exclusivamente nos sinais centrados em 550 e 1036 cm⁻¹ quando realizados previamente com Na¹⁴NO₂. Estes sinais se deslocam para 511 e 1013 cm⁻¹, respectivamente, quando os espectros são obtidos na presença de Na¹⁵NO₂ no meio eletrolítico (Figura 27), confirmando que os sinais previamente atribuídos eram referentes propriamente às espécies nitrogenadas provenientes da redução de nitrito.

Pode-se traçar, portanto, um caminho mecanístico ao se compilar as informações obtidas por DEMS e espectroeletroquímica Raman, ambas em modo *operando*, em que se observa tanto a identidade dos produtos obtidos durante a reação eletroquímica de redução de nitrito quanto o perfil estrutural dos intermediários envolvidos nesse processo. Esta rota adotada para tal ciclo catalítico promovido pela FeFcTs é apresentada esquematicamente na Figura 28, e baseado em mecanismos que ocorrem em sistemas naturais como o proposto por Einsle e colaboradores para descrever a ação catalítica promovida pela enzima citocromo c nitrito redutase.⁶²





Fonte: Autoria própria

A partir deste esquema ilustrativo, o mecanismo de eletrocatálise homogênea tem como ponto de partida a recepção primária do elétron proveniente do eletrodo para ativação da estrutura da FeFcTs (i) (Figura 28), onde posteriormente se coordena uma unidade de nitrito em associação com um próton do eletrólito, na forma de ácido nitroso. Ainda na proximidade da parede do eletrodo de trabalho, o aduto procede aos subsequentes estágios de transferência de elétrons e conduz a rota catalítica por meio dos intermediários NO, N₂O e NH₂OH nas etapas (iii), (v) e (vii) do ciclo catalítico, respectivamente, e segue os seguintes passos individuais que direcionam a conversão de nitrito até amônia, no estágio (viii), que é a possibilidade de produto mais reduzido dessa cadeia de processos pertencentes ao ciclo do nitrogênio.

As etapas da redução de nitrito observadas para o mecanismo eletrocatalítico proposto neste estudo seguem, portanto, as seguintes semi-reações:

$$NO_{2^{-}(aq)} + 2H^{+}_{(aq)} + e^{-} \rightleftharpoons NO_{(aq)} + H_{2}O_{(l)}$$
(8)

$$NO_{(aq)} + H^{+}_{(aq)} + e^{-} \rightleftharpoons \frac{1}{2}N_{2}O_{(aq)} + \frac{1}{2}H_{2}O_{(l)}$$
(9)

$$\frac{1}{2}N_2O_{(aq)} + 2H^+_{(aq)} + 2e^- + \frac{1}{2}H_2O_{(l)} \rightleftharpoons NH_2OH_{(aq)}$$
 (10)

$$NH_2OH_{(aq)} + 2H^+_{(aq)} + 2e^- \rightleftharpoons NH_{3(aq)} + H_2O_{(l)}$$
(11)

Sumarizando-se na semi-reação global:

$$NO_{2^{-}(aq)} + 7H^{+}_{(aq)} + 6e^{-} \rightleftharpoons NH_{3(aq)} + 2H_{2}O_{(l)}$$

$$(12)$$

5.3 REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DE OXIGÊNIO PELA ENZIMA MvBOx

Neste tópico serão apresentados o preparo e a otimização de biocátodos contendo a enzima *Mv*BOx através da otimização tanto da plataforma coletora de corrente quanto da forma que a enzima é imobilizada e posteriormente a atividade bioeletrocatalítica da *Mv*BOx frente a RRO será discutida em detalhes por dados de espectroeletroquímica XAS e simulações computacionais.

5.3.1 Caracterização da integridade da enzima

A enzima *Mv*BOx, pertencente à classe das MCOs, possui performance favorável como catalisador biológico para a RRO, promovendo esta reação em condições fisiológicas com baixo custo energético, e, por esta razão, essa enzima vem sendo utilizada em eletrodos na construção de

biocátodos para as chamadas biocélulas a combustível.^{2; 63} A enzima utilizada neste estudo foi caracterizada primeiramente pela espectroscopia EPR, a fim de se verificar a estrutura e integridade dos sítios de cobre onde ocorrem as reações de redução de oxigênio. No espectro obtido (Figura 29), tem-se um perfil condizente com MCOs, mostrando a presença dos sítios T1 e T2, cujo spin nuclear com I = 3/2 característico ao átomo de cobre em seus dois isótopos mais abundantes (⁶³Cu e ⁶⁵Cu), divide os sinais referentes à contribuição g_{II} em quatro sinais hiperfinos de acordo com a seguinte equação:

em que *n* é o número de núcleos iguais e quimicamente equivalentes e I o spin nuclear desta espécie química. É possível observar dois quartetos de sinais hiperfinos em g_{\parallel} , atribuídos aos sítios T1 e T2, adicionalmente ao padrão de anisotropia axial onde $g_z>g_x=g_y$ que confirmam a estrutura esperada para estes sítios intactos em MCOs.

Este padrão confirma a composição do sítio ativo da MvBOx em estudo, visto que a partir do elétron desemparelhado no orbital $d_{x^2-y^2}$ quando no estado de oxidação 2+, identifica-se as contribuições da esfera de coordenação nas interações hiperfinas de cada um dos sítios com atividade nessa espectroscopia.⁵





O sítio T3, único na estrutura desta enzima que possui duas unidades de átomos de cobre não apresenta sinal na região estudada devido à distribuição eletrônica adotada por esse sítio na condição estacionária da enzima direcionar ao emparelhamento dos dois elétrons inicialmente desemparelhados advindos individualmente de cada íon Cu^{2+} (Figura 30). Ainda que ambos íons cobre do sítio T3 tenham estado de oxidação 2+ no estado natural da enzima, ao serem ligados pela ponte de peróxido na condição intermediária ou o íon hidróxido no estado de descanso presente no estado de repouso da enzima (Figura 2), a configuração eletrônica deste sítio passa a se organizar de forma que todos os elétrons se emparelham, não havendo mais atividade na espectroscopia EPR para esses íons presentes no sítio T3, indicando também uma conexão estrutural e eletrônica entre esses dois íons Cu^{2+} deste centro na estrutura da enzima.⁶⁴

Figura 30 – Diagrama dos orbitais moleculares de um íon peróxido (a) ligado a um centro de Cu²⁺ e (b) fazendo ponte entre dois centros de Cu²⁺ explicando o emparelhamento eletrônico no sítio T3.



Fonte: Adaptação de Macedo (2022) a partir de Solomon, 2011.64

Com a confirmação da integridade da estrutura da enzima e mais especificamente do sítio ativo responsável pela biocatálise da RRO, seguiu-se para o desenvolvimento de bioeletrodos modificados com a imobilização desta enzima em superfície de carbono. Para evitar a modificação da estrutura da enzima no processo de imobilização, evitou-se trabalhar com estratégias que demandam ligações covalentes com resíduos de aminoácidos da enzima. Com isso, adotou-se o método de aprisionamento com uma membrana polimérica, utilizando-se o polímero Nafion por sua conhecida capacidade trocadora de prótons em meios eletrolíticos.⁸

No entanto, devido à acidez natural do Nafion pela presença de grupos do tipo ácido sulfônico na estrutura desse polímero, existe a possibilidade de desnaturação da enzima por acidificação local. Este polímero foi então preparado em solução tamponada, resultando assim em um sal de Nafion para o processo de imobilização da enzima e assim evitar danos à estrutura da *Mv*BOx. Essa possível alteração na estrutura enzimática foi checada por espectroscopia de dicroísmo circular, em que os espectros da enzima na presença de Nafion em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,2) não apresenta nenhuma alteração quando comparado ao espectro obtido da enzima em mesmas condições (Figura 31).

Figura 31 – Espectros de dicroísmo circular da enzima com Nafion. Espectro da (●) *Mv*BOx apenas em tampão fosfato e da (●) *Mv*BOx na presença de Nafion também em tampão fosfato.



Fonte: Autoria própria

Com estas confirmações de que a estruturas secundária e terciária da enzima permanecem no estado nativo com a estratégia utilizada, foram construídos bioeletrodos com essa enzima utilizando-se do processo de aprisionamento em matriz polimérica de Nafion.

5.3.2 Preparo do biocátodo e atividade bioeletrocatalítica da MvBOx

Além da oxidação do tecido de carbono utilizado como coletor de corrente, foi utilizada a estratégia de modificar a superfície desses eletrodos com uma camada de nanopartículas de carbono antes da imobilização da enzima *Mv*BOx, em que se observa por micrografia eletrônica de varredura a formação de uma estrutura mesoporosa (Figura 32), ideal para o confinamento e empacotamento de espécies a serem imobilizadas e também para a difusão de eletrólito por meio desses poros para se alcançar a espécie redox que está imobilizada.

Figura 32 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura da camada de nanopartículas de carbono depositadas sobre o tecido de carbono.



Fonte: Autoria própria

Devido à alta área proporcionada por essa matriz mesoporosa gerada pelas nanopartículas de carbono na superfície utilizada como coletoras de corrente, a área eletroativa deste eletrodo (ECSA do inglês: *electrochemical active surface area*) foi estimada utilizando a corrente capacitiva específica gerada no eletrodo. Esse método é baseado na diferença entre os valores de correntes capacitivas anódica (i_a) e catódica (i_c) (eq. 6) obtidas em diferentes velocidades de varredura em

regiões de potencial onde nenhum processo faradaico ocorre (Figura 33a). Neste caso, varreu-se sob fluxo de argônio na região entre 0,4 e 0,7 V.

$$\Delta i = i_{\rm a} - i_{\rm c} \tag{14}$$

A inclinação da reta de dependência de Δi em função da velocidade de varredura é correlacionada com a capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}) (Figura 33b) e calculada como:

$$C_{dl} = \frac{1}{2} \frac{\partial(\Delta i)}{\partial(scan \ rate)}$$
(15)

Como a ECSA é relacionada à capacitância específica (Cs), que para o carbono é 25 µF cm⁻²: ⁶⁵

$$ECSA = \frac{C_{dl}}{C_s}$$
(16)

obtém-se uma ECSA deste eletrodo igual a 46 cm². Com isso, os valores de corrente obtidos nos experimentos voltamétricos foram normalizados para esse valor de área eletroativa.

Figura 33 – Determinando a área de superfície ativa à eletroquímica. (a) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono em diferentes velocidades de varredura. (b) Diferença da corrente capacitiva em 0,6 V em função da velocidade de varredura. Eletrólito de suporte: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,2), T = 25 °C.



Fonte: Autoria própria

O eletrodo construído com a imobilização da enzima *Mv*BOx sobre essa camada de nanopartículas de carbono resultou em um eletrodo com performance eletrocatalítica favorável à RRO como mostra os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 34. Essa melhor performance capaz de alcançar aproximadamente 0,9 mA em correntes catalíticas para a redução de oxigênio deve-se provavelmente à alta área promovida por essa estrutura criada pela matriz de nanopartículas de carbono que proporcionam uma maior probabilidade de uma conformação ótima na superfície enzima-superfície do eletrodo para haver uma troca mais efetiva de elétrons entre essas espécies.

Figura 34 – Voltamograma cíclico do eletrodo modificado com a enzima *Mv*BOx em eletrólito saturado com (•) argônio e (•) oxigênio. Eletrólito de suporte: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,2), T = 25 °C. Velocidade de varredura: 5 mV s⁻¹.



Fonte: Autoria própria

Neste voltamograma, observa-se que em eletrólito saturado com gás inerte (argônio) há apenas um perfil capacitivo do eletrodo. Por outro lado, quando o eletrólito é saturado com o gás oxigênio, um perfil de voltamograma característico a processos catalíticos é observado. Neste caso, após a normalização pela ECSA, observa-se correntes catalíticas de aproximadamente 20 μ A cm⁻² em 0,0 V vs Ag/AgCl_{sat} ao passo que há um baixo sobrepotencial de início desta reação em 0,55 V vs Ag/AgCl_{sat}, demonstrando a efetividade para a RRO do eletrodo construído e o controle do

potencial do sítio ativo da enzima imobilizada neste eletrodo por meio de potenciais eletroquímicos aplicados sobre esta plataforma.⁶⁶

Tsujimura e colaboradores⁸ propuseram uma modelagem para a obtenção de parâmetros cinéticos da reação de redução de oxigênio em eletrodos modificados com a enzima MvBOx, tendose a corrente catalítica (*I*) expressa por:

$$I = \frac{n \cdot \mathbf{F} \cdot k_c \cdot \Gamma_{\mathbf{t}}}{1 + k_c / k_f + k_b / k_f} \tag{17}$$

em que n é o número de elétrons envolvido na redução do sítio T1 apenas, F é a constante de Faraday (C mol⁻¹), Γ_t é a concentração de enzimas ativas (mol cm⁻²) *Mv*BOx na superfície do eletrodo e k_c é a constante catalítica e uma função da transferência de elétrons intramolecular do sítio T1 para o sítio trinuclear T2/T3; k_f e k_b representam as constantes reacionais de transferência eletrônica ao sítio T1 no sentido direto e no sentido inverso da reação, respectivamente, e são expressas seguindo a equação de Butler-Volmer:

$$k_f = \mathbf{k}^0 \cdot \exp[-\alpha (\mathbf{n}F/\mathbf{R}T)(E - \mathbf{E}^0)]$$
(18)

$$k_b = \mathbf{k}^0 \cdot \exp[(1 - \alpha)(\mathbf{n} \mathbf{F} / \mathbf{R} \mathbf{T})(\mathbf{E} - \mathbf{E}^{0^{\circ}})]$$
(19)

em que $E^{0'}$ é o potencial formal do íon Cu^{2+}/Cu^+ do sítio T1, k⁰ é a constante de transferência de elétrons padrão no potencial de $E^{0'}$ e α o coeficiente de transferência.

A varredura voltamétrica linear foi analisada conforme esse formalismo gerando a curva apresentada na Figura 35. Com essa correlação da curva modelada com a curva experimental, observa-se que o eletrodo modificado apresenta constante catalítica k^0 de 150 s⁻¹ em um recobrimento de 3×10^{-11} mol de enzimas, praticamente similar ao relatado para bioeletrodos com *Mv*BOx em planos de borda de eletrodos de carbono altamente orientado, cujo k^0 encontrado foi da ordem de 170 s⁻¹.⁸ O potencial formal obtido de 0,42 V condiz com o observado espectroscopicamente para o sítio T1 como discutido a diante.




Fonte: Autoria própria

5.3.3 Espectroeletroquímica XAS e ajuste computacional do comportamento dos íons cobre durante a bioeletrocatálise da RRO

Os sítios de cobre da *Mv*BOx foram analisados pela técnica de XAS, observando-se as mudanças nas transições internas dos átomos metálicos como função do estado de oxidação. Também se correlacionou os resultados da bioeletrocatálise com a condição de sobrepotencial. Para isso, um porta-amostra customizado foi projetado e construído para realizar as medidas no modo de fluorescência, sendo instalado na estação experimental da linha XAFS2 do LNLS-CNPEM (Figura 36). Para isso, o ponto focal da cela eletroquímica/porta-amostra foi construído de forma cônica para posicioná-la a 45° em relação ao feixe incidente e assim não haver colisão do feixe fluorescente com o material componente do porta-amostra, alcançando-se uma máxima coleta deste feixe em uma angulação de 90° em relação ao feixe incidente. O eletrodo foi projetado a se posicionar diretamente prensado e em contato com a janela de Kapton no plano focal para que o eletrólito não interferisse intensamente na perda de sinal do feixe de raio-X, que é inevitável e causa bastante influência no sinal resultante nesse tipo de experimento contendo meio aquoso em sua composição.

Figura 36 – (a) Representação esquemática da montagem do porta-amostra/célula eletroquímica na estação experimental da linha XAFS2 do LNLS-CNPEM (fluxo de fótons 10⁹ fótons s⁻¹): (1) anel de armazenamento de elétrons, (2) monocromador, (3) primeira câmara de ionização (4) *Beamsplitter*, (5) folha de cobre utilizada como referência, (6) segunda câmara de ionização, (7) bloqueador de feixe, (8) porta-amostra contendo os três eletrodos, (9) detector. (b) Fotografias do sistema espectroeletroquímico em operação.



Fonte: Autoria própria

A fim de se obter informação sobre a atividade catalítica, experimentos com espectroeletroquímica no XAS em modo *operando* foram realizados com o eletrodo modificado com a enzima *Mv*BOx de forma que espectros de XAS foram coletados em cada condição de potencial eletroquímico aplicado sobre o eletrodo contendo a enzima *Mv*BOx. As enzimas MCOs no estado oxidado apresentam seus íons Cu todos no estado de oxidação 2+.³⁵ O eletrodo foi inicialmente analisado para verificar ambas a presença e a identidade dos íons Cu na enzima coletando-se um espectro sem aplicação de potencial, em que se observa apenas um sinal com

máximo em 8997 eV atribuído a transições internas do tipo $1s \rightarrow 4p$ em íons de cobre divalentes (Figura 37),⁶⁷ indicando que esta enzima mantém seus íons Cu no estado de oxidação 2+ quando em potencial de circuito aberto.



Figura 37 – Espectro de XAS da borda K de Cu de um eletrodo de TCo modificado com a enzima MvBOx.

O intervalo de potencial estudado nos experimentos de espectroeletroquímica consiste em condições eletroquímicas em que se havia a enzima em condição de descanso e também de potenciais em que a enzima apresentava condições energéticas suficientes para promover a RRO, conforme observado pela voltametria cíclica. De forma semelhante, na condição eletroquímica de +0.8 V vs Ag/AgCl_{sat}, observa-se que os íons cobre estão no estado de oxidação 2+ pois apenas se tem um pulo de borda com um sinal largo cujo máximo está em 8997 eV (Figura 38a,c).

Obtiveram-se os espectros da borda K do cobre tanto em condições de saturação do eletrólito com oxigênio, para se observar a enzima em condição de catálise da RRO, e também em condições de ausência deste gás, por meio da saturação do eletrólito com argônio. Sob ambas estas condições experimentais, a atividade redox dos íons cobre é atingida com a aplicação potenciais sequencialmente mais negativos, em que há a atenuação do sinal em 8997 eV simultaneamente ao aparecimento de um sinal em 8983 eV que é atribuído às transições internas do tipo $1s \rightarrow 4p$ em íons cobre monovalentes (Figura 38a,c).⁶⁷ Essa redução eletroquímica dos íons cobre de Cu²⁺ \rightarrow Cu⁺ pode ser analisada através do acompanhamento da evolução do sinal atribuído às espécies Cu monovalentes em 8983 eV.

Figura 38 – (a) Espectros de XAS na ausência de oxigênio. (b) Evolução do sinal em 8983 eV na titulação de redutiva na ausência de oxigênio. (c) Espectros de XAS na presença de oxigênio. (b) Evolução do sinal em 8983 eV para a titulação redutiva na presença de oxigênio. Linhas vermelhas nos painéis (b) e (d) representam os ajustes usando a equação de Nernst.



Fonte: Autoria própria

Uma questão levantada sobre a viabilidade do método adotado utilizando-se a técnica de XAS foi a estabilidade da enzima à incidência de raios-X durante longos períodos (aproximadamente 30 minutos para se coletar cada espectro). De fato, raios-X fazem parte de um grupo de radiação conhecidamente ionizante,⁶⁸ e com isso poderiam levar à mudança da estrutura da amostra após irradiação sobre a mesma. Inclusive, os detectores em instrumentação de XAS utilizam a capacidade ionizante desta radiação para quantificar a intensidade do feixe absorvido pela amostra⁵¹ quando o experimento é realizado no modo de transmissão, como esquematicamente

apresentado nos itens (3) e (6) da Figura 36a para a obtenção do espectro da folha metálica de cobre utilizada como padrão de calibração. Em face disto, comparou-se os espectros da borda K de Cu da enzima *Mv*BOx imobilizada na superfície do eletrodo de logo quando foram iniciadas as varreduras espectrais e do mesmo eletrodo após 6 horas de operação do eletrodo em experimentos de espectroeletroquímica sob irradiação de raios-x (Figura 39). Em todos os três eletrodos analisados, observa-se a manutenção do perfil do espectro da borda K de Cu, indicando que não há alteração na estrutura do sítio catalítico da enzima durante a realização dos experimentos de espectroeletroquímica XAS.

Figura 39 – Estabilidade da estrutura da *Mv*BOx sob irradiação de raios-x. Espectros coletados na (linha cinza contínua) primeira medida e (linha pontilhada preta) após 6 horas de operação nos experimentos de espectroeletroquímica.



A quantificação e monitoramento da evolução do sinal emergente exclusivamente das espécies na forma reduzidas de Cu⁺ como produto da reação redox foi realizada pela subtração do sinal resultante pelo sinal do espectro no estado inicial (I-I₀), como usualmente utilizado em procedimentos analíticos de espectroeletroquímica.^{69; 27} A evolução da intensidade do sinal em 8983 eV em função do potencial aplicado gera uma curva de forma sigmoidal que é característico de comportamento Nernstiano em reações redox (Figura 38b,d). Embora em ambas as condições

catalítica e não-catalítica gerem curvas semelhantes indicando a atividade redox dos íons Cu do sítio catalítico da enzima MvBOx, observa-se uma diferença na maneira como essa reação de redução desses íons metálicos ocorre, havendo um deslocamento do potencial de *onset* (Figura 40a). Diferentemente do padrão observado no voltamograma para a eletrorredução de oxigênio, nenhum sinal de Cu⁺ é observado em sobrepotenciais próximos a +0,55 V na presença de oxigênio.

Figura 40 – (a) Titulação potenciométrica da borda-K do cobre do sinal de Cu⁺ em 8983 eV em eletrólito saturado com (●) oxigênio e (●) argônio de três eletrodos distintos. (b) Destaque na curva média em cada condição próximo ao *onset* mostrando-se a diferença de sobrepotencial para a atividade redox dos íons Cu (as sombras representam o desvio padrão).



Olhando-se cuidadosamente para as intensidades das curvas potenciométricas modeladas por meio da ajuste não linear da equação aos dados experimentais do sinal em 8983 eV (Figura 40b), observa-se que o potencial de *onset* para as curvas obtidas na presença de oxigênio localizase próximo a +0,39 V para esta condição experimental, o que significa um sobrepotencial de 0,15 V necessário para reduzir e manter os íons cobre no estado de oxidação monovalente quando há disponibilidade de oxigênio para se coordenar ao sítio catalítico. Por outro lado, quando o oxigênio é removido do meio reacional por meio da saturação do eletrólito com o gás inerte argônio, a curva potenciométrica mostra que o potencial de *onset* da evolução das espécies Cu⁺ se desloca para +0,55 V. Interessantemente, este deslocamento do potencial de *onset* da curva potenciométrica da presença de íons Cu⁺ em condição de ausência de oxigênio para se ligar ao sítio catalítico da enzima *Mv*BOx, observada pelo XAS, para um potencial maior em +0,53 V coincide com o potencial de *onset* para a atividade enzimática na RRO observada nos experimentos de voltametria cíclica (Figura 34). Sistemas nernstianos em espectroeletroquímica são obtidos em padrões sigmoidais de resposta da absorbância em função do potencial aplicado, em que para um único processo redox a curva experimental deve obedecer a seguinte expressão⁷⁰:

$$A = \left(\frac{A_{\max}}{\{1 + e^{\left[\left(E - E^{0}\right) \cdot \frac{\mathbf{nF}}{\mathbf{RT}}\right]\}}}\right)$$
(20)

em que, A_{total} é a intensidade de absorbância em um determinado potencial aplicado *E*; A_{max} é a intensidade máxima de absorbância na curva sigmoidal; E^0 é o potencial à meia altura da curva para a referida reação redox; R é a constante universal dos gases ideais; T é a temperatura na qual a reação redox está ocorrendo; n é o número de elétrons envolvido na reação redox; e F é a constante de Faraday.

As curvas sigmoidais da modelagem apresentada na Figura 40 (linhas vermelhas) são obtidas considerando-se uma reação redox que ocorre em um único passo reacional e foram utilizadas unicamente para se observar o formato da curva e estimar o deslocamento do potencial de *onset* entre elas. Para uma modelagem mais precisa da curva sigmoidal observada nos pontos experimentais, leva-se em conta que ocorrem quatro reações consecutivas e cumulativas, envolvendo um elétron em cada uma das etapas, haja vista que a enzima *Mv*BOx possui 4 íons cobre em seu centro ativo que reagem na forma de Cu²⁺ + e⁻ \rightleftharpoons Cu⁺ cujas curvas potenciométricas individuais podem ter se sobreposto para a formação da curva observada experimentalmente, representando separadamente pela redução individual dos íons T1, T2, T3' e T3''. Com isso, a soma das contribuições individuais para o somatório da curva total pode ser algebricamente expressa por:

$$A_{\text{total}} = \left(\frac{A_{\text{max}}^1}{\{1 + e^{\left[(E - E_1^0), \frac{nF}{RT}\right]\}}}\right) + \left(\frac{A_{\text{max}}^2}{\{1 + e^{\left[(E - E_2^0), \frac{nF}{RT}\right]\}}}\right) + \left(\frac{A_{\text{max}}^3}{\{1 + e^{\left[(E - E_3^0), \frac{nF}{RT}\right]\}}}\right) + \left(\frac{A_{\text{max}}^4}{\{1 + e^{\left[(E - E_3^0), \frac{nF}{RT}\right]\}}}\right) (21)$$

em que, A_{total} é a intensidade cumulativa do sinal de XAS para todas as contribuições individuais de cada reação redox sobrepostas em um determinado potencial aplicado *E*; A_{max}^(ndice) é a intensidade máxima do sinal de XAS para uma curva sigmoidal de cada reação redox individual; E⁰_{indice} é o potencial à meia altura da curva para cada reação redox, neste caso, o potencial formal para cada centro de Cu. A equação 21 é então utilizada no software Origin e os parâmetros modelados são obtidos através do ajuste não linear aos dados experimentais. Utilizando esta abordagem que leva em consideração as quatro reações consecutivas de 1 elétron, obtém-se curvas modeladas condizentes com os dados experimentais (Figura 41). Adicionalmente ao deslocamento do potencial formal atribuído às reações redox de cada centro metálico (Tabela 7) por meio do valor de E⁰_{indice} obtido no ajuste matemático.

Figura 41 – Curvas de titulação para a presença de íons Cu⁺ na enzima *Mv*BOx em (a) condição de ausência de oxigênio e (b) presença de oxigênio. Pontos representam os dados experimentais; linhas vermelhas representam a curva seguindo do modelo cumulativo; sombra cinza representa o desvio padrão entre as curvas modeladas.



Fonte: Autoria própria

Tabela 7 - Potencial formal de cada centro de cobre da MvBOx para as reduções consecutivas de 1 elétron

	Potencial formal (E ⁰ / V vs Ag/AgCl _{sat})	
Centro de cobre	Condição catalítica	Condição não-catalítica
	(Oxigênio disponível)	(Oxigênio ausente)
T1	+0,127 <u>+</u> 0,061	+0,427 <u>+</u> 0,034
Т3'	-0,018 <u>+</u> 0,029	+0,119 <u>+</u> 0,056
Т3"	-0,098 <u>+</u> 0,021	-0,019 <u>+</u> 0,034
T2	-0,197 <u>+</u> 0,015	-0,185 <u>+</u> 0,031

Os deslocamentos dos potenciais de *onset*, assim como dos potenciais de meia altura da curva de titulação redox dos íons Cu, sugerem que muito embora eles devam se reduzir para proporcionar a catálise da RRO, eles não se mantêm reduzidos no estado de oxidação 1+. Isso está associado à presença das moléculas de oxigênio no sítio ativo, onde há uma rápida transferência interna de elétrons em uma segunda etapa do sítio T1 para o sítio trinuclear T2/T3, fazendo então com que os íons Cu retornem ao estado de oxidação 2+ (Figura 42a). De fato, quando não há oxigênio molecular ligado ao sítio T2/T3, não há mais o aceptor natural de elétrons da enzima e com isso o segundo passo de transferência de elétrons não ocorre, fazendo com que os íons Cu na presença de oxidação 2+ (Figura 42b). De forma a promover a redução dos íons Cu na presença de oxigênio, tem-se a necessidade de o sistema fornecer um sobrepotencial de 150 mV, cuja condição permite que tanto o oxigênio molecular quanto os íons Cu tenham sua reação de redução alcançada.

As reações de transferência de elétrons que ocorrem através das estruturas de proteínas se processam por meio de várias etapas consecutivas de forma rápida e eficiente entre um doador e um aceptor final de elétrons. Para a transferência de elétrons do sítio T1 para o T2/T3 da *Mv*BOx, uma ponte eletrônica é crucial para a minimização tanto do tempo quanto da energia requerida para que a transferência de elétrons se processe, típico de sistemas doador-ponte-aceptor (D-P-A).^{71; 72} Então, mais do que um cluster eletrônico capaz de auxiliar na atracação e redução de O₂, o sítio catalítico com os 4 íons de Cu inicialmente no estado de oxidação 2+ devem se reduzir ao estado de oxidação 1+ para promover a transferência efetiva de elétrons entre o substrato orgânico ou o eletrodo (a espécie que doa os elétrons) e a molécula de oxigênio (a espécie aceptora final dos elétrons), atuando como uma ponte eletrônica através de sua atividade redox em um sistema D-P-A.⁷³

Figura 42 – Mecanismo esquemático e simplificado da transferência interna de elétrons (a) na presença e
(b) na ausência de O₂ ligado ao sítio ativo da *Mv*BOx. (Átomos representados por esferas são:
Cobre – marrom; Oxigênio – vermelho; e Hidrogênio – branco).



Fonte: Autoria própria, utilizando o aplicativo JSmol.

Esse fato também remete à geometria tridimensional adotada pelos quatro íons metálicos no sítio ativo da *Mv*BOx no espaço, assim como os resíduos de aminoácidos que fazem parte da esfera de coordenação desses íons. Neste caso, tem-se uma otimização na disposição tridimensional de como os reagentes interagem com o biocatalisador, indo-se além do estabelecido pelo princípio de Sabatier, que é amplamente adotado para catálise em superfícies planas e uniformes. Neste princípio, tem-se a definição que a interação entre o reagente e o produto é realizada por meio da adsorção das moléculas de substrato na superfície do catalisador.

Em biocatalisadores, os resíduos de aminoácidos presentes no perímetro do sítio ativo de fato também interagem com as moléculas de substrato, proporcionando a dissipação de energia das

ligações a serem clivadas. Para uma modelagem molecular mais específica, foram realizadas simulações computacionais em colaboração com o prof. Gustavo T. Feliciano (UNESP – Araraquara). Essas foram processadas utilizando-se condicionamentos de mecânica quântica (QM, do inglês: *quantum mechanics*) ao sítio catalítico da *Mv*BOx na presença da molécula de oxigênio mostram a distribuição de cargas (Figura 43). Esta abordagem modela a maneira como a molécula de oxigênio se encaixa no sítio catalítico e como as cargas nessa fração do sistema se distribuem, onde se observa uma disposição perpendicular ao eixo entre os íons cobre do sítio T3 (Figura 43a). Interessantemente, a simetria da distribuição de cargas sobre o O₂ remete à formação de interações π que quando um elétron é adicionado para se iniciar o ciclo catalítico (Figura 43b), há uma interação com estes dois centros metálicos do T3 e uma estabilização de carga por concentração no sítio T2, facilitando a clivagem da ligação O=O.

Figura 43 – Geometrias da região QM neutra do sítio catalítico da *Mv*BOx com O₂ com (a) todos os íons cobre reduzidos a Cu⁺ e (b) região QM carregada com um elétron extra (-1).



Fonte: Autoria própria.

Comparando-se a distribuição dos orbitais moleculares em relação ao estado de oxidação dos centros de cobre (Figura 44), percebe-se a influência energética da interação entre o O_2 e todos os sítios de cobre pertencentes ao bolso catalítico da *Mv*BOx, em que em um estado onde todos eles estão reduzidos a Cu⁺, há a formação de orbitais moleculares ligantes de menor energia (Figura 44a) ao passo que na situação em que todos os centros metálicos estão em Cu²⁺ não há tal

abaixamento de energia, desfavorecendo a formação de orbitais moleculares entre o substrato e a enzima (Figura 44b).

Figura 44 – Diagrama dos orbitais de fronteira (a) no estado neutro da região QM e todos os íons cobre no estado de oxidação Cu⁺ e (b) todos os íons cobre no estado Cu²⁺.



Fonte: Autoria própria.

Como no caso da MvBOx, o sítio ativo contendo o centro trinuclear T2/T3 com seus sítios de coordenação facilmente labilizáveis somando-se a interações não-covalente dos resíduos de aminoácidos da segunda esfera de coordenação proporcionam a transferência de elétrons para a molécula de O₂ clivagem efetiva da ligação O=O com o mínimo de perda energética, como observado pelas medidas voltamétricas.

Uma vez evidenciado que a ação de enzimas na interface eletródica também é eficiente para a realização de reações controladas de transferência de elétrons e que estas reações procedem através da interação multilateral da molécula de substrato com diversos constituintes do sítio ativo da enzima, os conceitos aprendidos com a ação bioeletrocatalítica podem redirecionar a forma como eletrocatalisadores são projetados, incorporando-se a catálise tridimensional ao desenho das interfaces eletrocatalíticas para um melhor desempenho frente ao caminho reacional pretendido.

5.4 DISCUSSÃO GERAL: O IMPACTO DAS TÉCNICAS *IN SITU* NO AVANÇO DA BIOELETROQUÍMICA

A bioeletroquímica serve à ciência por focar em assuntos que traduzem a funcionalidade vital das biomoléculas quando associados a processos que envolvem transferência de elétrons. Em

face deste prendor, a facilitação da observância experimental destas funcionalidades biológicas tende a tornar o entendimento e posterior replicação destes fenômenos naturais em sistemas diversos aos presentes em organismos vivos, mas mantendo ou até mesmo incrementando aprimoramentos à funcionalidade desejada.

As abordagens *in situ* e *operando*, como os apresentados nesta Tese, são capazes de preencher um espaço científico não antes utilizado no campo das metaloenzimas, que é o monitoramento direto do comportamento dos metais de transição de seus cofatores no momento que estes participam da reação de transferência de elétrons que lhes conferem funcionalidade biológica.

Mais especificamente, a utilização da espectroscopia vibracional na região do infravermelho distante possibilita o acompanhamento dos modos vibracionais das frações contendo íons de metais de transição, em que associado ao controle do estado de oxidação provido pela eletroquímica acoplada permite a visualização do efeito do processo redox nesta fração metal-ligante de compostos de coordenação. Há de se pensar na futura utilização desta abordagem em metaloproteínas e metaloenzimas, cuja função biológica está intrinsicamente associada à maneira como a estrutura eletrônica e molecular do cofator procede tanto em um estado eletrônico excitado quanto na presença da molécula substrato.

Complementarmente à espectroeletroquímica FIR, a também espectroscopia vibracional Raman se mostra uma importante aliada às investigações em bioeletroquímica quando associada ao controle eletroquímico da espécie redox. Neste contexto, foi possível observar no processo de redução eletroquímica de nitrito como a própria molécula do catalisador FeFcTs, aplicado como biomimético de enzima do tipo nitrito redutase, se comportou frente ao processo redox próprio e como as espécies nitrogenadas envolvidas nos processos de redução interagiram com o centro metálico para propiciar o direcionamento de suas conversões. Neste caso, foi observado, compilando-se informações advindas de DEMS, um novo passo catalítico jamais observado para a redução de nitrito à amônia.

No caso do uso da instrumentação de XAS com controle eletroquímico, monitora-se de forma instantânea como os íons cobre e a mudança de estado de oxidação se comportam frente ao processo de redução de oxigênio e como o próprio oxigênio perturba o fluxo eletrônico neste sítio catalítico. Estas observações determinam a incorporação de um passo mecanístico onde estes centros metálicos se comportam como pontes eletrônicas entre o substrato orgânico e o aceptor

84

final de elétrons que fecha a cadeia nessa troca de elétrons, além de trazer uma nova visão de catálise tridimensional que incorpora interações multidirecionais para a eletroquímica, o que pode trazer avanços significativos no planejamento de novos catalisadores sintéticos baseados em geometrias e arranjos moleculares adotados pela natureza em seus processos que conduzem a manutenção das atividades vitais.

6 CONCLUSÃO

Este estudo se baseou em informações experimentais advindas do acoplamento de eletroquímica às espectroscopias de absorção de raio-x, infravermelho na região distante e Raman que permitiram uma investigação de forma direta do comportamento redox de estruturas contendo metais de transição.

Com a espectroscopia no FIR acoplada à eletroquímica, após uma série de desenvolvimentos experimentais para se contornar as dificuldades do trabalho com esta técnica em meio aquoso, foi possível evidenciar o efeito do estado de oxidação do centro metálico de ferro do composto AP nos modos vibracionais que envolvem o centro metálico e os ligantes na primeira esfera de coordenação. Outras sondas redox com centros metálicos como o ferroceno e a ftalocianina de níquel foram investigadas e também demonstraram o uso da espectroeletroquímica FIR no estudo do comportamento do centro metálico em relação ao estado de oxidação.

O uso de uma abordagem experimental concatenando-se DEMS e espectroeletroquímica Raman em modo *operando* na investigação das propriedades catalíticas da FeFcTs como biomimético de enzimas da classe nitrito redutase revelou que esta apresenta tal atividade frente à reação de redução eletroquímica de nitrito. A rota demonstrada para o caminho catalítico adotado para a redução de nitrito leva à completa redução da espécie nitrogenada, atingindo-se o composto amônia como produto do ciclo catalítico. Interessantemente, esta rota transcendeu-se por um caminho inesperado, em que o composto N₂O foi gerado no decorrer da reação e este mesmo foi posteriormente convertido a NH₂OH que em um passo subsequente é reduzido a NH₃. O fato de o composto N₂O não ser um produto químico final da reação de redução de nitrito, mas sim um intermediário, é uma nova informação que incrementa as rotas de catálise que guiam esse processo de eletrorredução.

Outrossim, foi analisado o papel da atividade redox dos íons cobre da enzima *Mv*BOx na RRO por meio da técnica de XAS acoplada à eletroquímica, observando-se que a coordenação da molécula de oxigênio ao sítio trinuclear T2/T3 exige uma maior energia em forma para a realização da redução dos íons cobre concomitantemente à redução de oxigênio molecular, demonstrando-se o papel de ponte eletrônica destes íons com sua atividade redox que promove a transferência efetiva dos elétrons ao oxigênio molecular. Também foi observado que a geometria do sítio catalítico e a forma que a molécula de O₂ interage com esse sítio é um fator determinante para o sucesso da catálise, trazendo perspectivas de desenhos tridimensionais de eletrocatalisadores inspirando-se nessa efetividade enzimática.

Portanto, a utilização de técnicas espectroeletroquímicas promoveu a possibilidade de se aplicar esses sistemas na análise direta do comportamento de metais em diferentes tipos de compostos de coordenação, obtendo-se diferentes tipos de informação referente ao papel dos processos de transferência de elétrons na estrutura do composto e em sua esfera de coordenação. O sucesso dessas abordagens traz a perspectiva de se estudar mais a fundo estruturas macromoleculares e biológicas como metaloproteínas para assim se entender novos processos em meio fisiológico.

7 PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS

Com capacidade de investigação profunda alcançada pelas técnicas а espectroeletroquímicas em modo in situ e operando apresentadas nesta Tese, vislumbra-se a expansão desse tipo de estudo a outras enzimas, contendo estruturas metálicas nos sítios catalíticos e capazes de promover a conversão de espécies gasosas a produtos de alto valor tecnológico agregado como nitrogenases e hidrogenases, investigando-se o papel de sítios complexos contendo metais de transição como os FeMoco de nitrogenases, centros-H associados a [4Fe4S] de hidrogenases e os intermediários envolvidos nos processos bioeletrocatalíticos por elas processados.

8 REFERÊNCIAS

[1] LIU, J.; CHAKRABORTY, S.; HOSSEINZADEH, P.; YU, Y.; TIAN, S.; PETRIK, I.; BHAGI, A.; LU, Y. Metalloproteins containing cytochrome, iron–sulfur, or copper redox centers. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 8, p. 4366-4469, 2014.

[2] LUZ, R. A. S.; PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; SALES, F. C. P. F.; CRESPILHO, F. N. Enzyme biofuel cells: thermodynamics, kinetics and challenges in applicability. **ChemElectroChem**, New York, v. 1, n. 11, p. 1751-1777, 2014.

[3] CHANDRAN, P.; GHOSH, A.; RAMAPRABHU, S. High-performance platinum-free oxygen reduction reaction and hydrogen oxidation reaction catalyst in polymer electrolyte membrane fuel cell. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 3591, 2018.

[4] ZHANG, J.; SASAKI, K.; SUTTER, E.; ADZIC, R. R. Stabilization of platinum oxygen-reduction electrocatalysts using gold clusters. **Science**, Washington, v. 315, n. 5809, p. 220, 2007.

[5] SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, Washington, v. 96, n. 7, p. 2563-2606, 1996.

[6] SHIMIZU, A.; KWON, J.-H.; SASAKI, T.; SATOH, T.; SAKURAI, N.; SAKURAI, T.; YAMAGUCHI, S.; SAMEJIMA, T. *Myrothecium verrucaria* bilirubin oxidase and its mutants for potential copper ligands. **Biochemistry**, Washington, v. 38, n. 10, p. 3034-3042, 1999.

[7] CRACKNELL, J. A.; MCNAMARA, T. P.; LOWE, E. D.; BLANFORD, C. F. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction. **Dalton Transactions**, London, v. 40, n. 25, p. 6668-6675, 2011.

[8] TSUJIMURA, S.; NAKAGAWA, T.; KANO, K.; IKEDA, T. Kinetic study of direct bioelectrocatalysis of dioxygen reduction with bilirubin oxidase at carbon electrodes. **Electrochemistry**, Tokyo, v. 72, n. 6, p. 437-439, 2004.

[9] SOLOMON, E. I.; AUGUSTINE, A. J.; YOON, J. O2 Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. **Dalton Transactions**, London, v. n. 30, p. 3921-3932, 2008.

[10] STOKSTAD, E. The nitrogen fix. **Science**, Washington, v. 353, n. 6305, p. 1225-1227, 2016.

[11] CHEN, J. G.; CROOKS, R. M.; SEEFELDT, L. C.; BREN, K. L.; BULLOCK, R. M.; DARENSBOURG, M. Y.; HOLLAND, P. L.; HOFFMAN, B.; JANIK, M. J.; JONES, A. K.; KANATZIDIS, M. G.; KING, P.; LANCASTER, K. M.; LYMAR, S. V.; PFROMM, P.; SCHNEIDER, W. F.; SCHROCK, R. R. Beyond fossil fuel–driven nitrogen transformations. **Science**, Washington, v. 360, n. 6391, p. eaar6611, 2018. [12] FOSTER, S. L.; BAKOVIC, S. I. P.; DUDA, R. D.; MAHESHWARI, S.; MILTON, R. D.; MINTEER, S. D.; JANIK, M. J.; RENNER, J. N.; GREENLEE, L. F. Catalysts for nitrogen reduction to ammonia. **Nature Catalysis**, London, v. 1, n. 7, p. 490-500, 2018.

[13] WANG, Y.; WANG, C.; LI, M.; YU, Y.; ZHANG, B. Nitrate electroreduction: mechanism insight, in situ characterization, performance evaluation, and challenges. **Chemical Society Reviews**, London, v. 50, n. 12, p. 6720-6733, 2021.

[14] SOSA ALFARO, V.; CAMPECIÑO, J.; TRACY, M.; ELLIOTT, S. J.; HEGG, E. L.; LEHNERT, N. Elucidating electron storage and distribution within the pentaheme scaffold of cytochrome c nitrite reductase (NrfA). **Biochemistry**, Washington, v. 60, n. 23, p. 1853-1867, 2021.

[15] LEHNERT, N.; DONG, H. T.; HARLAND, J. B.; HUNT, A. P.; WHITE, C. J. Reversing nitrogen fixation. **Nature Reviews Chemistry**, London, v. 2, n. 10, p. 278-289, 2018.

[16] MODENEZ, I. A.; MACEDO, L. J. A.; MELO, A. F. A. A.; PEREIRA, A. R.; OLIVEIRA JR, O. N.; CRESPILHO, F. N. Nanosized non-proteinaceous complexes III and IV mimicking electron transfer of mitochondrial respiratory chain. Journal of Colloid and Interface Science, Amsterdam, v. 599, p. 198-206, 2021.

[17] SABOE, P. O.; CONTE, E.; FARELL, M.; BAZAN, G. C.; KUMAR, M. Biomimetic and bioinspired approaches for wiring enzymes to electrode interfaces. **Energy & Environmental Science**, London, v. 10, n. 1, p. 14-42, 2017.

[18] MAHYARI, M.; HOOSHMAND, S. E.; SEPAHVAND, H.; GAVGANI, J. N.; HOSSEINI, S. G. Biomimetic complexes-graphene composites for redox processes. **Applied Organometallic Chemistry**, New York, v. 34, n. 4, p. e5540, 2020.

[19] SOROKIN, A. B. Phthalocyanine metal complexes in catalysis. **Chemical Reviews**, Washington, v. 113, n. 10, p. 8152-8191, 2013.

[20] ROACH, S.; FAPONLE, A. S.; SATPATHY, J. K.; SASTRI, C. V.; DE VISSER, S. P. Substrate sulfoxidation by a biomimetic cytochrome P450 compound I mimic: how do porphyrin and phthalocyanine equatorial ligands compare? **Journal of Chemical Sciences**, London, v. 133, n. 3, p. 61, 2021.

[21] WEI, P.-J.; YU, G.-Q.; NARUTA, Y.; LIU, J.-G. Covalent grafting of carbon nanotubes with a biomimetic heme model compound to enhance oxygen reduction reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 53, n. 26, p. 6659-6663, 2014.

[22] BHADRA, M.; LEE, J. Y. C.; COWLEY, R. E.; KIM, S.; SIEGLER, M. A.; SOLOMON, E. I.; KARLIN, K. D. Intramolecular hydrogen bonding enhances stability and reactivity of mononuclear cupric superoxide complexes. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 140, n. 29, p. 9042-9045, 2018.

[23] QUIST, D. A.; EHUDIN, M. A.; SCHAEFER, A. W.; SCHNEIDER, G. L.; SOLOMON, E. I.; KARLIN, K. D. Ligand identity-induced generation of enhanced oxidative hydrogen atom transfer reactivity for a $Cu^{II}_2(O_2^{-})$ complex driven by formation of a $Cu^{II}_2(-OOH)$ compound with a strong O–H bond. Journal of the American Chemical Society, Washington, v. 141, n. 32, p. 12682-12696, 2019.

[24] ZION, N.; FRIEDMAN, A.; LEVY, N.; ELBAZ, L. Bioinspired electrocatalysis of oxygen reduction reaction in fuel cells using molecular catalysts. Advanced Materials, New York, v. 30, n. 41, p. 1800406, 2018.

[25] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. Boston: Cengage learning, 2017. 1039 p.

[26] DONG, S.; NIU, J.; COTTON, T. M. Ultraviolet/visible spectroelectrochemistry of redox proteins. *In*: METHODS in enzymology. [*S. l.*]: Academic Press, 1995. v. 246, p. 701-732.

[27] MACEDO, L. J. A.; CRESPILHO, F. N. Multiplex infrared spectroscopy imaging for monitoring spatially resolved redox chemistry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 90, n. 3, p. 1487-1491, 2018.

[28] DE SOUZA, J. C. P.; SILVA, W. O.; LIMA, F. H. B.; CRESPILHO, F. N. Enzyme activity evaluation by differential electrochemical mass spectrometry. **Chemical Communications**, London, v. 53, n. 60, p. 8400-8402, 2017.

[29] KAIM, W.; KLEIN, A. Spectroelectrochemistry. Londres: RSC Publishing, 2008. 236 p.

[30] GURLO, A.; RIEDEL, R. In situ and operando spectroscopy for assessing mechanisms of gas sensing. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 46, n. 21, p. 3826-3848, 2007.

[31] YANG, Y.; XIONG, Y.; ZENG, R.; LU, X.; KRUMOV, M.; HUANG, X.; XU, W.; WANG, H.; DISALVO, F. J.; BROCK, J. D.; MULLER, D. A.; ABRUÑA, H. D. Operando methods in electrocatalysis. **ACS Catalysis**, Washington, v. 11, n. 3, p. 1136-1178, 2021.

[32] VAN GRIEKEN, R. E.; MARKOWICZ, A. A. **Handbook of x-ray spectrometry**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2002. 983 p.

[33] SARANGI, R. X-ray absorption near-edge spectroscopy in bioinorganic chemistry: application to $M-O_2$ systems. Coordination Chemistry Reviews, Amsterdam, v. 257, n. 2, p. 459-472, 2013.

[34] ROAT-MALONE, R., M. **Bioinorganic chemistry**. 2 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007. 501 p.

[35] LEE, S.-K.; GEORGE, S. D.; ANTHOLINE, W. E.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. O.; SOLOMON, E. I. Nature of the intermediate formed in the reduction of O_2 to H_2O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. Journal of the American Chemical Society, Washington, v. 124, n. 21, p. 6180-6193, 2002.

[36] GLASER, T.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. O.; SOLOMON, E. I. Ligand K-edge x-ray absorption spectroscopy: a direct probe of ligand-metal covalency. Accounts of Chemical Research, Washington, v. 33, n. 12, p. 859-868, 2000.

[37] STUART, B. H. **Infrared spectroscopy:** fundamentals and applications. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. 203 p.

[38] PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. A. Introduction to spectroscopy. Belmont: Cengage Learning, 2008. 784 p.

[39] HASSAN, A.; MACEDO, L. J. A.; CRESPILHO, F. N. Recognizing conductive islands in polymeric redox surfaces using electrochemical-coupled vibrational spectromicroscopy. **Chemical Communications**, London, v. 56, n. 71, p. 10309-10312, 2020.

[40] NAKAMOTO, K. Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. 4 ed. New York: Wiley, 1986. 484 p.

[41] VINCENT, A. **Molecular symmetry and group theory:** a programmed introduction to chemical applications. 2 ed. Hoboken: Wiley, 2013. 202 p.

[42] LEVER, A. B. P.; MANTOVANI, E. Far-infrared and electronic spectra of some bis(ethylenediamine) and related complexes of copper(II) and the relevance of these data to tetragonal distortion and bond strengths. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 10, n. 4, p. 817-826, 1971.

[43] CARVALHO, C. L. C.; SILVA, A. T. B.; MACEDO, L. J. A.; LUZ, R. A. S.; MOITA NETO, J. M.; RODRIGUES FILHO, U. P.; CANTANHÊDE, W. New hybrid nanomaterial based on self-assembly of cyclodextrins and cobalt prussian blue analogue nanocubes. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 16, n. 7, p. 14594-14607, 2015.

[44] SANTOS, A. F. M.; MACEDO, L. J. A.; CHAVES, M. H.; ESPINOZA-CASTAÑEDA, M.; MERKOÇI, A.; LIMA, F. C. A.; CANTANHÊDE, W. Hybrid self-assembled materials constituted by ferromagnetic nanoparticles and tannic acid: a theoretical and experimental investigation. Journal of the Brazilian Chemical Society, São Paulo, v. 27, p. 727-734, 2016.

[45] HASSAN, A.; MACEDO, L. J. A.; SOUZA, J. C. P.; LIMA, F. C. D. A.; CRESPILHO, F. N. A combined Far-FTIR, FTIR spectromicroscopy, and DFT study of the effect of DNA binding on the [4Fe4S] cluster site in EndoIII. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 1931, 2020.

[46] RYAN, M. D.; LI, L. Far-infrared spectroelectrochemistry: a study of linear molybdenum/iron/sulfur clusters. **Inorganica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 357, n. 5, p. 1332-1336, 2004.

[47] NAKAMOTO, K. Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, part A: theory and applications in inorganic chemistry. 6 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. 419 p.

[48] DE SOUZA, J. C. P.; MACEDO, L. J. A.; HASSAN, A.; SEDENHO, G. C.; MODENEZ, I. A.; CRESPILHO, F. N. In situ and operando techniques for investigating electron transfer in biological systems. **ChemElectroChem**, New York, v. 8, n. 3, p. 431-446, 2021.

[49] PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; IOST, R. M.; SALES, F. C. P. F.; CRESPILHO, F. N. Application of carbon fibers to flexible enzyme electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Amsterdam, v. 780, p. 396-406, 2016.

[50] SILVA, W. C.; GUIX, M.; ALARCON-ANGELES, G.; MERKOCI, A. Compact microcubic structures platform based on self-assembly Prussian blue nanoparticles with highly tuneable conductivity. **Physical Chemistry Chemical Physics**, London, v. 12, n. 47, p. 15505-15511, 2010.

[51] FIGUEROA, S. J. A.; MAURICIO, J. C.; MURARI, J.; BENIZ, D. B.; PITON, J. R.; SLEPICKA, H. H.; SOUSA, M. F. d.; ESPÍNDOLA, A. M.; LEVINSKY, A. P. S. Upgrades to the XAFS2 beamline control system and to the endstation at the LNLS. **Journal of Physics:** Conference Series, London, v. 712, n. 1, p. 012022, 2016.

[52] ASH, P. A.; HIDALGO, R.; VINCENT, K. A. Protein film infrared electrochemistry demonstrated for study of H₂ oxidation by a [NiFe] hydrogenase. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, n. 130, p. e55858, 2017.

[53] PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; GONÇALVES, A. D.; PAGNONCELLI, K. C.; CRESPILHO, F. N. Bioelectrooxidation of ethanol using NAD-dependent alcohol dehydrogenase on oxidized flexible carbon fiber arrays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 28, p. 1698-1707, 2017.

[54] BUSER, H. J.; SCHWARZENBACH, D.; PETTER, W.; LUDI, A. The crystal structure of Prussian blue: Fe₄[Fe₍CN)₆]₃.xH₂O. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 16, n. 11, p. 2704-2710, 1977.

[55] MORETTI, G.; GERVAIS, C. Raman spectroscopy of the photosensitive pigment Prussian blue. **Journal of Raman Spectroscopy**, New York, v. 49, n. 7, p. 1198-1204, 2018.

[56] NAKAGAWA, I.; SHIMANOUCHI, T. Infrared spectroscopic study on the co-ordination bond-II: infrared spectra of octahedral metal cyanide complexes. **Spectrochimica Acta**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 101-113, 1962.

[57] MOHAMMADI, N.; GANESAN, A.; CHANTLER, C. T.; WANG, F. Differentiation of ferrocene D_{5d} and D_{5h} conformers using IR spectroscopy. **Journal of Organometallic Chemistry**, Amsterdam, v. 713, p. 51-59, 2012.

[58] LIU, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; JIANG, J. Theoretical investigation of the molecular, electronic structures and vibrational spectra of a series of first transition metal phthalocyanines. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 67, n. 5, p. 1232-1246, 2007.

[59] BOO, H.; PARK, S.; KU, B.; KIM, Y.; PARK, J. H.; KIM, H. C.; CHUNG, T. D. Ionic strength-controlled virtual area of mesoporous platinum electrode. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 126, n. 14, p. 4524-4525, 2004.

[60] ZECEVIC, S.; SIMIC-GLAVASKI, B.; YEAGER, E.; LEVER, A. B. P.; MINOR, P. C. Spectroscopic and electrochemical studies of transition metal tetrasulfonated phthalocyanines: Part V. Voltammetric studies of adsorbed tetrasulfonated phthalocyanines (MTsPc) in aqueous solutions. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, Amsterdam, v. 196, n. 2, p. 339-358, 1985.

[61] ORCHIN, M.; JAFFÉ, H. H. **Symmetry, orbitals, and spectra (S.O.S.)**. New York: Wiley-Interscience, 1971. 396 p.

[62] EINSLE, O.; MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R.; KRONECK, P. M. H.; NEESE, F. Mechanism of the six-electron reduction of nitrite to ammonia by cytochrome c nitrite reductase. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 124, n. 39, p. 11737-11745, 2002.

[63] MANO, N.; DE POULPIQUET, A. O₂ reduction in enzymatic biofuel cells. **Chemical Reviews**, Washington, v. 118, n. 5, p. 2392-2468, 2018.

[64] SOLOMON, E. I.; GINSBACH, J. W.; HEPPNER, D. E.; KIEBER-EMMONS, M. T.; KJAERGAARD, C. H.; SMEETS, P. J.; TIAN, L.; WOERTINK, J. S. Copper dioxygen (bio)inorganic chemistry. **Faraday Discussions**, London, v. 148, n. 0, p. 11-39, 2011.

[65] FRACKOWIAK, E.; BÉGUIN, F. Carbon materials for the electrochemical storage of energy in capacitors. **Carbon**, Amsterdam, v. 39, n. 6, p. 937-950, 2001.

[66] PAGNONCELLI, K. C.; PEREIRA, A. R.; SEDENHO, G. C.; BERTAGLIA, T.; CRESPILHO, F. N. Ethanol generation, oxidation and energy production in a cooperative bioelectrochemical system. **Bioelectrochemistry**, Amsterdam, v. 122, p. 11-25, 2018.

[67] KAU, L. S.; SPIRA-SOLOMON, D. J.; PENNER-HAHN, J. E.; HODGSON, K. O.; SOLOMON, E. I. X-ray absorption edge determination of the oxidation state and coordination number of copper. Application to the type 3 site in *Rhus vernicifera* laccase and its reaction with oxygen. Journal of the American Chemical Society, Washington, v. 109, n. 21, p. 6433-6442, 1987.

[68] ALEXANDER, P.; CHARLESBY, A. Effect of x-rays and γ -rays on synthetic polymers in aqueous solution. **Journal of Polymer Science**, New York, v. 23, n. 103, p. 355-375, 1957.

[69] ASHLEY, K.; PONS, S. Infrared spectroelectrochemistry. **Chemical Reviews**, Washington, v. 88, n. 4, p. 673-695, 1988.

[70] HAGEN, W. R. EPR spectroscopy as a probe of metal centres in biological systems. **Dalton Transactions**, London, v. 37, p. 4415-4434, 2006.

[71] GRAY, H. B.; WINKLER, J. R. Long-range electron transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, n. 10, p. 3534, 2005.

[72] SCOTT, A. M.; BUTLER RICKS, A.; COLVIN, M. T.; WASIELEWSKI, M. R. Comparing spin-selective charge transport through donor–bridge–acceptor molecules with different oligomeric aromatic bridges. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 49, n. 16, p. 2904-2908, 2010.

[73] WENGER, O. S. How donor-bridge-acceptor energetics influence electron tunneling dynamics and their distance dependences. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 44, n. 1, p. 25-35, 2011.

ANEXO

A1 ARTIGOS PRODUZIDOS DURANTE O DOUTORADO

[1] <u>MACEDO, L. J. A.</u>; LIMA, F. C. D. A.; AMORIM, R. G.; FREITAS, R. O.; YADAV, A.; IOST, R. M.; BALASUBRAMANIAN, K.; CRESPILHO, F. N. Interplay of non-uniform charge distribution on the electrochemical modification of graphene. **Nanoscale**, London, v. 10, 15048-15057, 2018.

[2] <u>MACEDO, L. J. A.</u>; IOST, R. M.; HASSAN, A.; BALASUBRAMANIAN, K.; CRESPILHO, F. N. Bioelectronics and interfaces using monolayer graphene. **ChemEletroChem**, New York, v. 6, p. 31-59, 2019.

[3] MELO, A. F. A. A.; HASSAN, A.; <u>MACEDO, L. J. A.</u>; OSICA, I.; SHRESTHA, L. K.; JI, Q.; OLIVEIRA Jr., O. N. ; HENZIE, J.; ARIGA, K.; CRESPILHO, F. N. Microwires of Au-Ag nanocages patterned via magnetic nanoadhesives for investigating proteins using surface enhanced infrared absorption spectroscopy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 11, p. 18053-18061, 2019.

[4] RODRIGUES, F. P.; <u>MACEDO, L. J. A.</u>; MÁXIMO, L. N. C.; SALES, F. C. P. F.; SILVA, R. S.; CRESPILHO, F. N. Real-time redox monitoring of a nitrosyl ruthenium complex acting as NO-donor agent in a single A549 cancer cell with multiplex Fourier-transform infrared microscopy. **Nitric Oxide**, Amsterdam, v. 96, p. 29-34, 2020.

[5] <u>MACEDO, L. J. A.</u>; SEDENHO, G. C.; HASSAN, A.; CRESPILHO, F. N. Assessing electron transfer reactions and catalysis in multicopper oxidases with operando X-ray absorption spectroscopy. **Nature Communications**, London, v. 11, n. 316, 2020.

[6] HASSAN, A.; <u>MACEDO, L. J. A.</u>; SOUZA, J. C. P; LIMA, F. C. D. A.; CRESPILHO, F. N. A combined far-FTIR, FTIR spectromicroscopy, and DFT study of the effect of DNA binding on the [4Fe4S] cluster site in EndoIII. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1931, 2020.

[7] HASSAN, A.; <u>MACEDO, L. J. A.</u>; CRESPILHO, F. N. Electrochemical-coupled vibrational spectromicroscopy recognize conductive islands in topological redox surface. **Chemical Communications**, London, v. 56, p. 10309-10312, 2020.

[8] SEDENHO, G. C.; HASSAN, A.; <u>MACEDO, L. J. A.</u>; CRESPILHO, F. N. Stabilization of bilirubin oxidase in a biogel matrix for high-performance gas diffusion electrodes. **Journal of Power Sources**, Amsterdam, v. 482, p. 229035, 2021.

[9] SOUZA, J. C. P.; *MACEDO, L. J. A.*; HASSAN, A.; SEDENHO, G. C.; MODENEZ, I. A.; CRESPILHO, F. N. In situ and operando techniques for investigating electron transfer reactions in biological systems. **ChemElectroChem**, New York, v. 8, p. 431-446, 2021.

[10] HASSAN, A.; <u>MACEDO, L. J. A.</u>; MATTIOLI, I. A.; RUBIRA, R. J. G.; CONSTANTINO, C. J. L.; AMORIM, R. G.; LIMA, F. C. D. A.; CRESPILHO, F. N. A three component-based van der Waals surface vertically designed for biomolecular recognition enhancement. **Electrochimica Acta**, Amsterdam, v. 376, p. 138025, 2021.

[11] MODENEZ, I. A.; <u>MACEDO, L. J. A.</u>; MELO, A. F. A. A.; PEREIRA, A. R.; OLIVEIRA Jr, O. N.; CRESPILHO, F. N. Nanosized non-proteinaceous complexes III and IV mimicking electron transfer of mitochondrial respiratory chain. **Journal of Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 599, p. 198–206, 2021.

[12] <u>MACEDO, L. J. A.</u>; SANTO, A. A. E.; SEDENHO, G. C.; HASSAN, A.; IOST, R. M.; FELICIANO, G. T.; CRESPILHO, F. N. Three-dimensional catalysis and the efficient bioelectrocatalysis beyond surface chemistry. **Journal of Catalysis**, Amsterdam, v. 401, p. 200-205, 2021.

[13] SANCHES, N. M.; HASSAN, A.; MATTIOLI, I. A.; <u>MACEDO, L. J. A.</u>; SEDENHO, G. C.; CRESPILHO, F. N. Tuning vertical electron transfer on graphene bilayer electrochemical devices. **Advanced Materials Interfaces**, New York, v. 8, n. 2100550, 2021.

[14] <u>MACEDO, L. J. A.</u>; RODRIGUES, F. P.; HASSAN, A.; MÁXIMO, L. N. C.; ZOBI, F.; SILVA, R. S.; CRESPILHO, F. N. FTIR spectromicroscopy as a non-destructive molecular spectroscopy for assessing redox-based action of metallodrugs in real time. **Analytical Methods**, London, 2022. DOI: 10.1039/D1AY01198G.

[15] MATTIOLI, I. A.; CASTRO, K. R.; <u>MACEDO, L. J. A.</u>; OLIVEIRA, M. N.; TODESCHINI, I.; VITALE, P. M.; FERREIRA, S. C.; MANULI, E. R.; PEREIRA, G. M.; SABINO, E. C.; CRESPILHO, F. N. Graphene-based hybrid electrical-electrochemical pointof-care device for serologic COVID-19 diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 199, p. 113866, 2022.

[16] <u>MACEDO, L. J. A.</u>; CRESPILHO, F. N. Direct visualization of the impact of electron transfer on metal-ligand structures through electrochemical far infrared spectroscopy. *Em preparação*.

[17] <u>MACEDO, L. J. A.</u>; ROVEDA Jr., A. C.; LIMA, F. H. B.; CRESPILHO, F. N. Alternative intermediates and pathway for nitrite reduction to ammonia catalyzed by an enzymatic biomimetic. *Em preparação*.

[18] NASCIMENTO, S. Q.; OLIVEIRA, T. C.; FARIA, L. C. I.; BERTAGLIA, T.;
<u>MACEDO, L. J. A.</u>; CAGNANI, G. R.; OLIVEIRA, M. N.; TODESCHINI, I.; VITALE, P.
M.; FERREIRA, S. C.; MANULI, E. R.; PEREIRA, G. M.; SABINO, E. C.; CRESPILHO, F.
N. Flexible carbon fiber-based biosensor for the detection of SARS-CoV-2 specific antibody in human serum samples. *Em preparação*.

A2 TRABALHOS APRESENTADOS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS E CONGRESSOS

[1] <u>MACEDO, L. J. A.</u>; SEDENHO, G. C.; HASSAN, A.; CRESPILHO, F. N. Operando x-ray absorption spectroscopy applied to bioelectrochemistry. In: XXV International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 2019, Limerick, Irlanda. (Apresentação oral)

[2] <u>MACEDO, L. J. A.</u>; SEDENHO, G. C.; HASSAN, A.; CRESPILHO, F. N. Espectroscopia de absorção de raios-x em modo operando na investigação da função redox de metais em enzimas. In: I Workshop da Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, 2019, Teresina, Brasil. (Apresentação oral)

[3] <u>MACEDO, L. J. A.</u>; SEDENHO, G. C.; HASSAN, A.; CRESPILHO, F. N. Operando x-ray absorption spectroscopy (XAS) for multicopper oxidase protein electrochemistry reveals an electronic bridge mechanism pathway. In: XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2019, Ribeirão Preto, Brasil. (Apresentação em pôster)

[4] CLARINDO, J. E. S.; <u>MACEDO, L. J. A.</u>; SEDENHO, G. C.; HASSAN, A.; CRESPILHO, F. N. Operando and in-situ techniques for the mapping of redox reactions of symmetrical quinones. In: XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2019, Ribeirão Preto, Brasil. (Apresentação em pôster)

A3 PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2018 – **Metrohm Young Chemist Award Brasil** pelo trabalho "In-situ electrochemistry coupled to infrared spectromicroscopy: a new technique towards spatially resolved redox chemistry"

2019 – **Reconhecimento do impacto no periódico ChemElectroChem** pelo artigo *"Bioelectronics and interfaces using monolayer graphene"* estando entre os 10% mais visualizados em 2019.