

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE EM
COMPLEXOS DE COBRE BIOMIMÉTICOS A LPMO PARA
DEGRADAÇÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA”**

Gabrielle Rodrigues Conciani*

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de MESTRE
EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientador(a): Caterina Gruenwaldt Cunha Marques Netto

Co-Orientadora: Dulce Helena Ferreira de Souza

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2026**

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Gabrielle Rodrigues Conciani, realizada em 24/03/2026.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a). Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

Prof. Dr. Antônio Carlos Roveda Júnior (IQSC-USP)

Prof. Dr. Sergio Augusto Venturinelli Jannuzzi (UFSCar)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Juliana Lorena Moreira Rodrigues Conciani e Leandro Luís Conciani, que sempre foram a fundação que me manteve de pé e incentivaram todos os meus sonhos, mesmo quando minhas escolhas iam contra o que esperavam de mim. É mais fácil ter coragem quando se sabe que existe um lar para onde voltar. E ao Heitor e o Aquiles, por tudo.

À prof.^a Dr^a Caterina Gruenwaldt Cunha Marques-Netto, pela orientação durante essa jornada tão intensa que foi o mestrado, e pelo apoio nos piores momentos.

À prof.^a Dr^a Dulce Helena Ferreira de Souza, que me recebeu de braços abertos no LBFÉ e ofereceu todo o suporte possível quando precisei.

Aos colegas de trabalho e amigos queridos, em especial Kleyton Junior, Bruna Sant'Anna, Camilly Holanda, Luís Fernando, Igor Luz, Jocely de Lucena Dutra, Antônio Fernando e Noemi Moraes, por terem me mantido sã e por estarem lá pra mim sempre que precisei de um reagente, uma opinião ou um abraço.

À minha parceira Joana Flávia da Silveira, pelo amor e apoio incondicional e por estar comigo nos melhores e piores momentos.

Ao prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, chefe do LERCI, com o qual dividimos o espaço de laboratório, pelo convívio e pelo suporte.

Ao Prof. Dr. Gilberto Ferreira do Departamento de Química da UFSCar pela colaboração com as medidas de RMN 1D e 2D.

Ao Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento do IFSP pelas medidas de EPR e por compartilhar um pouco de seu vasto conhecimento comigo.

À FAPESP pelo financiamento do laboratório.

À CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Departamento de Química da UFSCar como um todo, aos muitos laboratórios que colaboraram indiretamente para a realização desse trabalho.

E ao meu irmãozinho Bruno Gabriel Conciani, que teve a honra de crescer comigo. Você que devia me agradecer, mas obrigada por estar sempre a uma mensagem de distância quando precisei. Ganhar de você é parte do que me moveu a vida inteira.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.3 – Tentativa de atribuição das bandas de IR do CuAL.....	27
Tabela 4.4 – Valores de análise elementar obtidos para o CuAL.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Substratos encontrados na parede celular de plantas e suas respectivas enzimas.....	2
Figura 1.2 – Métodos de pré-tratamento.....	3
Figura 1.3 – A) Estrutura tridimensional da LPMO. B) Sítio ativo.....	5
Figura 1.4 – Biomiméticos presentes na literatura.....	6
Figura 1.5 – Catalisadores sintetizados em laboratório.....	8
Figura 3.1 – Esquema de síntese do CuPTB.....	11
Figura 3.2 – Rota de Síntese do CuPol e CuAL.....	15
Figura 3.3 – Quebra do 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo.....	20
Figura 4.1 – Espectro de RMN de ^1H do ligante AL.....	23
Figura 4.2 – Espectro de RMN de ^{13}C do ligante AL.....	24
Figura 4.3 – Espectro de HSQC ^1H – ^{13}C do ligante AL.....	26
Figura 4.4 – Espectro de COSY ^1H – ^1H do ligante AL.....	28
Figura 4.5 – Espectro de Massas de baixa resolução para o ligante AL.....	29
Figura 4.6 – Espectro de Massas de alta resolução para o CuAL.....	30
Figura 4.7 – Espectro de massas de alta resolução do CuPol.....	31
Figura 4.8 – Espectro de infravermelho do ligante AL.....	32
Figura 4.9 – Espectro de infravermelho do CuAL.....	32
Figura 4.10 – Espectros de UV-Vis para o AL e o CuAL.....	34
Figura 4.11 – UV-Vis do complexo em soluções aquosas de diferentes concentrações.....	35
Figura 4.12 – Banda d-d do CuAL em alta concentração.....	36
Figura 4.13 – Curva de pKa para o CuAL.....	37
Figura 4.14 – Voltamograma do CuAL em pH 10,5.....	38
Figura 4.15 – Voltamograma em pH 7,5 para os complexos A) CuPol e B) CuAL.....	39
FIGURA 4.16 – Dados de EPR para o CuAL em nitrogênio líquido (A) e em temperatura ambiente (B).....	42
Figura 4.17 – Espectro de EPR para o CuPol.....	42
Figura 4.18 - Espectros de XPS na região N1s para os ligantes livres e seus respectivos complexos de cobre. A) AL; B) CuAL; C) PTB; D) CuPTB e E) CuPol.....	44
Figura 4.19 – Espectros de XPS na região C1s para os ligantes livres e seus respectivos complexos de cobre. A) AL; B) CuAL; C) PTB; D) CuPTB e E) CuPol.....	46
Figura 4.20 – Espectros de XPS de O1s para o CuPol e o CuAL.....	48

Figura 4.21 – Hidrólise do 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo catalisada pelos complexos de cobre e pelo controle CuCl_2 , na presença de H_2O_2	49
Figura 4.22 – Absorbância final para os diferentes sistemas catalíticos avaliados.....	50
Figura 4.23 – Resultados obtidos para o teste de DNS em diferentes sistemas.....	52
Figura 4.24 – Comparação dos resultados obtidos para o CuAL isolado e com a adição de diferentes agentes oxidantes.....	54
Figura 4.25 – Teste de atividade de endoglucanase e exoglucanase para o CuAL.....	55
Figura 4.26 – Banda identificada no espectro de UV-Vis.....	56
Figura 4.27 – Esquema de formação do cobre-oxil.....	57
Figura 4.28 – Espectro de EPR obtido para o CuAL + H_2O_2 + AscNa + DMPO.....	58
Figura 4.29 – Espectro de EPR obtido para o CuPol + DMPO.....	58

RESUMO

CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE EM COMPLEXOS DE COBRE BIOMIMÉTICOS A LPMO PARA DEGRADAÇÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. A transição para uma economia mais sustentável tem impulsionado a busca por tecnologias mais eficientes para a conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis. Neste contexto, as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) se destacam por sua capacidade de fazer a clivagem oxidativa de ligações glicosídicas em regiões cristalinas da celulose. Essa atividade é dada pelo sítio catalítico desta enzima, tendo um átomo de cobre coordenado a duas histidinas, uma delas em modo de coordenação tipo braçadeira. Tomando seu sítio ativo como inspiração, este trabalho teve o objetivo de sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade catalítica de complexos biomiméticos de cobre(II), com ênfase no desenvolvimento de um complexo inédito derivado da *L*-prolina (CuAL), e a comparação de seu desempenho com dois outros complexos que possuem atividade mimética à LPMO: CuPol e CuPTB. O ligante AL foi sintetizado a partir da *L*-prolina e caracterizado por técnicas de RMN, HRMS e IR. Seu complexo de cobre(II), foi obtido pela reação com $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e caracterizado por UV-Vis, IV, análise elementar, XPS, voltametria cíclica e EPR. Os dados de XPS revelaram deslocamentos nas energias de ligação dos átomos de nitrogênio e carbono consistentes com coordenação ao metal, indicando doação eletrônica dos sítios doadores e retrodoação π do metal para o ligante. A atividade catalítica dos complexos foi avaliada em diferentes substratos. Nos ensaios com 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, o CuAL apresentou desempenho superior (abs 405 nm $\sim 1,0$), seguido pelo CuPol ($\sim 0,7$) e CuPTB ($< 0,3$). Nos ensaios de atividade celulolítica total na ausência de aditivos (H_2O_2 ou ascorbato), o CuAL destacou-se novamente, liberando 0,14 mg/mL de equivalentes de glicose na ausência de H_2O_2 , valor superior ao CuPol (0,05 mg/mL) e ao extrato enzimático ($< 0,05$ mg/mL). Observou-se efeito sinérgico entre CuPol e a enzima, com liberação de 0,10 mg/mL. Ensaios com carboximetilcelulose indicaram atividade de endoglucanase para o CuAL, enquanto testes com celulose cristalina foram negativos, sugerindo atuação preferencial sobre substratos amorfos. A adição de H_2O_2 e ascorbato aos ensaios com papel filtro inibiu completamente a atividade do CuAL, sugerindo atuação por hidrólise e não por vias oxidativas. Os resultados obtidos demonstraram que a correlação entre estrutura e atividade oferece informações extremamente relevantes para o desenvolvimento de catalisadores. A substituição do grupo carboxilato do CuPol pelo grupo álcool primário no CuAL alterou significativamente o perfil de reatividade do complexo. Enquanto o CuPol apresenta alta densidade de radicais e opera preferencialmente por vias oxidativas dependentes de H_2O_2 , o CuAL demonstra atividade catalítica expressiva mesmo na ausência de oxidantes. Isso sugere que o grupo álcool coordenado favorece mecanismos hidrolíticos diretos, possivelmente por ativação de moléculas de água ou por interações mais favoráveis com as hidroxilas da celulose. A labilidade da ligação Cu–O no CuAL e a menor tendência à polimerização em solução contribuem para a maior acessibilidade do sítio metálico ao substrato, enquanto a ausência de radicais estabilizados no ligante limita a proteção contra danos oxidativos e direciona a catálise para vias hidrolíticas.

ABSTRACT

CORRELATION BETWEEN STRUCTURE AND ACTIVITY IN LPMO BIOMIMETIC COPPER COMPLEXES FOR DEGRADATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS.

The transition toward a more sustainable economy has driven the search for more efficient technologies for the conversion of lignocellulosic biomass into biofuels. In this context, lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) stand out for their ability to promote the oxidative cleavage of glycosidic bonds in crystalline regions of cellulose. This activity is conferred by the enzyme's catalytic site, which features a copper ion coordinated by two histidine residues, one of them in a histidine brace coordination mode. Taking this active site as inspiration, this work aimed to synthesize, characterize, and evaluate the catalytic activity of biomimetic copper(II) complexes, with emphasis on the development of a novel *L*-proline-derived complex (CuAL), and to compare its performance with two other LPMO-mimetic complexes: CuPol and CuPTB. The AL ligand was synthesized from *L*-proline and characterized by NMR, HRMS, and IR spectroscopy. Its copper(II) complex was obtained by reaction with $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and characterized by UV-Vis, IR, elemental analysis, XPS, cyclic voltammetry, and EPR. XPS data revealed shifts in the binding energies of nitrogen and carbon atoms consistent with metal coordination, indicating electron donation from the donor sites and π -backdonation from the metal to the ligand. The catalytic activity of the complexes was evaluated using different substrates. In assays with 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, CuAL exhibited superior performance (Abs 405 nm ~ 1.0), followed by CuPol (~ 0.7) and CuPTB (< 0.3). In total cellulolytic activity assays carried out in the absence of additives (H_2O_2 or ascorbate), CuAL again stood out, releasing 0.14 mg/mL of glucose equivalents without H_2O_2 , a value higher than those obtained for CuPol (0.05 mg/mL) and the enzymatic extract (< 0.05 mg/mL). A synergistic effect between CuPol and the enzyme was observed, with a release of 0.10 mg/mL. Assays with carboxymethylcellulose indicated endoglucanase-like activity for CuAL, while tests with crystalline cellulose were negative, suggesting preferential action on amorphous substrates. The addition of H_2O_2 and ascorbate to the filter paper assays completely inhibited CuAL activity, indicating that the complex acts via hydrolysis rather than oxidative pathways. The results demonstrated that the structure–activity correlation provides highly relevant insights for catalyst development. The substitution of the carboxylate group in CuPol by the primary alcohol group in CuAL significantly altered the reactivity profile of the complex. While CuPol exhibits a high density of ligand-centered radicals and operates preferentially through H_2O_2 -dependent oxidative pathways, CuAL displays significant catalytic activity even in the absence of oxidants. This suggests that the coordinated alcohol group favors direct hydrolytic mechanisms, possibly through water molecule activation or more favorable interactions with cellulose hydroxyl groups. The lability of the Cu–O bond in CuAL and its lower tendency towards polymerization in solution contribute to greater accessibility of the metal site to the substrate, while the absence of stabilized ligand-centered radicals limits protection against oxidative damage and directs catalysis toward hydrolytic pathways.

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	9
2.1	Geral	9
2.2	Específicos.....	9
3.	Parte experimental	11
3.1	Síntese dos complexos	11
3.1.1	Síntese do CuPTB	11
3.1.1.1	Síntese dos compostos prolinato de metila (1) e prolinato (piridin-2-ilmetil) de metila (2)	11
3.1.1.2	Síntese do difenil(1-(piridin-2-il-metil)pirrolidin-2-il)metanol (3).....	12
3.1.1.3	Síntese do 2-((2-(azidodifenilmetil)pirrolidin-1-il)metil)piridina(4) ..	13
3.1.1.4	Síntese do ligante PTB	14
3.1.1.5	Síntese do complexo CuPTB.....	14
3.1.2	Síntese do CuPol e CuAL	15
3.1.2.1	Síntese do Ligante Pol.....	16
3.1.2.2	Síntese do complexo CuPol.....	16
3.1.2.3	Síntese do Ligante AL.....	17
3.1.2.4	Síntese do complexo CuAL	17
3.2	Técnicas de Caracterização.....	17
3.2.1	Caracterização do Ligante AL	17
3.2.1.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	17
3.2.1.2	Espectrometria de massas	18
3.2.1.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	18
3.2.2	Caracterização do Complexo CuAL	18
3.2.2.1	Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível	18
3.2.2.2	Voltametria Cíclica.....	18
3.2.2.3	Análise elementar.....	19
3.2.2.4	Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	19
3.2.2.5	XPS	19
3.3	Testes de atividade	20
3.3.1	Atividade catalítica	20
3.3.2	Atividade celulolítica total.....	20
3.3.3	Atividade de Endoglucanase.....	21
4.	Resultados e Discussão.....	22
4.1	Caracterizações	22

4.1.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	22
4.1.2	Espectrometria de Massas	28
4.1.2.1	Ligante AL	28
4.1.2.2	Complexo CuAL	28
4.1.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho	30
4.1.4	Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível	33
4.1.5	pKa	35
4.1.6	Voltametria Cíclica	37
4.1.7	Análise elementar	39
4.1.8	Ressonância Paramagnética Eletrônica	40
4.1.9	XPS.....	42
4.1.9.1	N1s	43
4.1.9.2	C1s	44
4.1.9.3	O1s	47
4.2	Estudos Mecanísticos	48
4.2.1	Correlação estrutura-atividade nos complexos avaliados.....	48
4.2.1.1	Teste de atividade catalítica.....	48
4.2.1.2	Atividade celulolítica total.....	51
4.2.1.3	Atividade de endoglucanase.....	54
4.2.2	Formação de Radicais	55
5.	Conclusões	60
6.	Perspectivas Futuras.....	62
REFERÊNCIAS		63

1. Introdução

1.1 Contexto atual

A transição para uma bioeconomia circular de baixo carbono e a necessidade urgente de encontrar fontes energéticas sustentáveis têm se consolidado nas últimas décadas como uma das maiores prioridades globais, principalmente no que se refere ao enfrentamento das mudanças climáticas e na redução da dependência de combustíveis fósseis.^{1,2} Esse movimento está associado à busca por alternativas que possam substituir gradualmente o petróleo e seus derivados, sem comprometer o abastecimento energético ou agravar questões ambientais.

A aplicação de tecnologias de conversão de biomassa em larga escala, transformando resíduos alimentares em biogás e bioetanol, pode prevenir o aumento da temperatura global. Projeções estimam que, processando metade do lixo orgânico dos quatro maiores países produtores desse resíduo (China, EUA, Índia e Brasil), seria possível gerar até 34 exajoules de energia renovável e reduzir as emissões em até 26,8 gigatoneladas de CO₂ equivalente, o que evitaria uma alteração de 0,06 a 0,07°C no aquecimento global até 2050.³

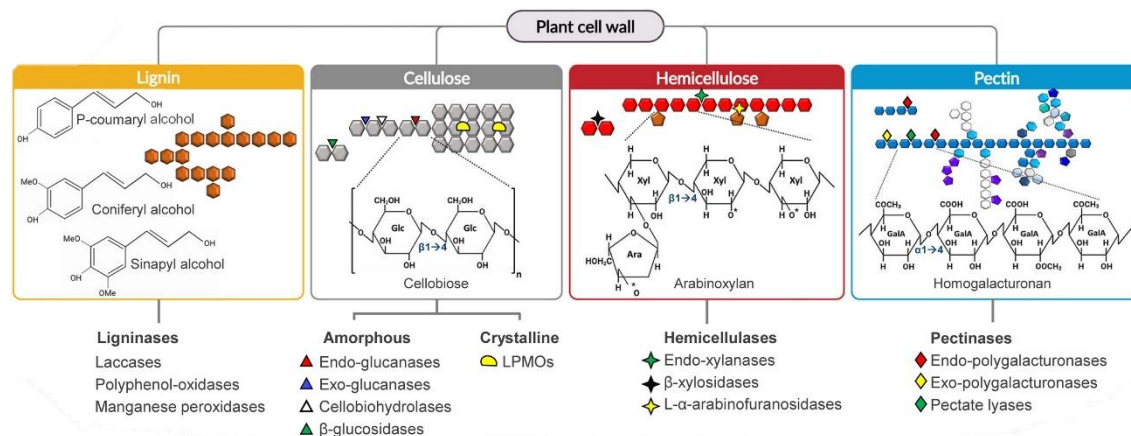
Para além dos resíduos alimentares, essa lógica de aproveitamento energético pode ser estendida a outras fontes de biomassa igualmente promissoras, como a biomassa lignocelulósica proveniente de resíduos agrícolas e florestais. Esta destaca-se como o recurso renovável mais abundante do planeta, com uma produção anual estimada entre 181,5 e 220 bilhões de toneladas⁴. Sua ampla disponibilidade e baixo custo relativo a tornam uma matéria-prima muito eficiente para o desenvolvimento de tecnologias mais limpas e descentralizadas para produção de energia e insumos químicos. Dessa forma, esse recurso representa uma via promissora para a implantação de biorrefinarias integradas, capazes de transformar resíduos em biocombustíveis, bioquímicos e bioenergia, sem comprometer a produção de alimentos.^{5,6}

Contudo, a utilização eficiente dessa biomassa é limitada pela sua complexidade estrutural e recalcitrância natural, características que impõem desafios significativos aos processos de conversão biotecnológica. As paredes celulares das plantas, evoluídas ao longo de milhões de anos para conferir proteção e suporte mecânico aos tecidos vegetais, são constituídas por uma matriz intrincada e altamente

organizada de celulose, hemicelulose e lignina.^{7,8} Uma arquitetura complexa como essa é o resultado de um processo evolutivo que visa justamente dificultar a degradação por microrganismos e patógenos.

Entre esses componentes, destaca-se a celulose, um polímero linear de glicose unido por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, que se organiza em microfibrilas cristalinas insolúveis que conferem resistência à estrutura vegetal. Essas microfibrilas são envolvidas por uma matriz amorfa de hemicelulose e, mais externamente, por uma barreira hidrofóbica de lignina, formando um complexo lignocelulósico que dificulta o acesso de agentes biológicos e químicos aos carboidratos fermentáveis.⁸ A lignina, em particular, atua como uma barreira física e não produtiva que adsorve enzimas de forma irreversível, reduzindo a eficiência da hidrólise enzimática e comprometendo o rendimento do processo⁹. A Figura 1.1 abaixo contém um esquema com ilustrações da estrutura básica desses compostos e uma listagem das enzimas comumente utilizadas para cada substrato.

Figura 1.1 – Substratos encontrados na parede celular de plantas e suas respectivas enzimas.



Extraído de Giovannoni *et al*, 2021.

A cristalinidade da celulose impõe uma barreira física significativa à ação enzimática, exigindo o uso de enzimas que possuam mecanismos especializados de reconhecimento e degradação.¹⁰ Nesse âmbito, estudos recentes destacam que domínios específicos de ligação à celulose, quando acoplados a enzimas oxidativas, são cruciais para reconhecer superfícies hidrofóbicas da celulose cristalina nativa, o que facilitaria a adsorção e a catálise em regiões de difícil acesso¹⁰. Ainda assim, a estrutura complexa da parede celular das plantas torna a biomassa em geral um

substrato que, apesar de possuir grande potencial para geração de energia renovável, tem sua utilização em grande escala prejudicada.^{1,8}

Em função disso, para a produção de energia renovável utilizando biomassa, torna-se necessário realizar etapas de pré-tratamento para desconstruir essa estrutura protetora e liberar os polissacarídeos para a conversão em açúcares fermentáveis.¹¹ Esses pré-tratamentos podem ser físicos (como irradiação de microondas ou tratamentos mecânicos), químicos (como Hidrólise ácida ou básica/alcalina, Líquidos iônicos (LIs) e solventes eutéticos profundos (SEPs)), ou físico-químicos (Explosão de vapor, Água quente líquida (LHW) ou os métodos à base de amônia),^{11,12} conforme ilustrado na Figura 1.2.

Além destes tratamentos, pode-se citar os pré-tratamentos biológicos, que consistem basicamente no uso de micro-organismos e enzimas para a degradação da biomassa, chamado digestão enzimática.¹³ Esse processo, embora apresente as vantagens de ser energeticamente eficiente, sustentável e seletivo, com baixa formação de inibidores e sulfonação de celulose e livre de produtos químicos, ainda tem as desvantagens de possuir uma difícil aplicação em larga escala, alto tempo de retenção, e baixo rendimento em relação aos métodos mais tradicionais.¹⁴

Figura 1.2 – Métodos de pré-tratamento.



Adaptado de Devi *et al*, 2021.

Novos métodos mais modernos estão em constante desenvolvimento na tentativa de superar essas barreiras¹⁵, mas, embora essenciais, no cenário atual os

pré-tratamentos continuam sendo um dos principais entraves econômicos e energéticos da cadeia de produção de biocombustíveis de segunda geração.¹⁶

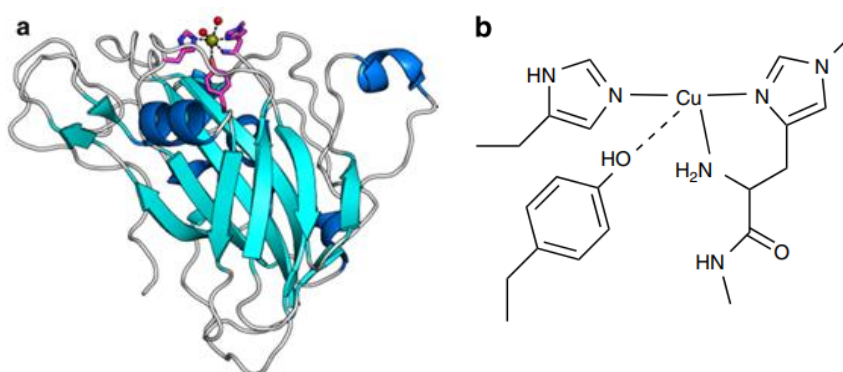
1.2 Degradação Enzimática

Paralelamente ao desenvolvimento de diversos outros pré-tratamentos mais eficientes, a hidrólise enzimática também tem experimentado avanços importantes. A degradação enzimática convencional, baseada no uso de coquetéis de glicosil-hidrolases (GHs), como celulasas e hemicelulasas, que atuam de forma sinérgica na despolimerização da parede celular vegetal, tem sua eficiência limitada pela baixa acessibilidade às regiões cristalinas da celulose, cuja compactação restringe a ação catalítica dessas enzimas.^{5,17}

Nesse contexto, a descoberta das LPMOs, enzimas dependentes de cobre revolucionou o entendimento sobre os mecanismos de degradação da biomassa lignocelulósica.^{18,19} Diferentemente das hidrolases tradicionais, as LPMOs catalisam a clivagem oxidativa de ligações glicosídicas nas superfícies cristalinas de polissacarídeos, como celulose e quitina, e até mesmo em hemiceluloses, introduzindo quebras na estrutura compacta do substrato^{17, 20}. Ao criar novos pontos de acesso, essas enzimas potencializam a ação das celulasas convencionais, promovendo um efeito sinérgico que aumenta a eficiência global da hidrólise.

Do ponto de vista estrutural, as LPMOs possuem um sítio ativo singular, denominado "*histidine brace*", (em tradução livre: braçadeira de histidina), no qual um átomo de cobre é coordenado por duas histidinas, uma delas o resíduo N-terminal da proteína, sendo essa uma característica que distingue essa família enzimática e é fundamental para sua atividade catalítica.^{21,22} A Figura 1.3 A demonstra uma ilustração da estrutura tridimensional da LPMO e a Figura 1.3 B ilustra a estrutura de seu centro ativo.

Figura 1.3 – A) Estrutura tridimensional da LPMO. B) Sítio ativo.



Adaptado de EIJSINK *et al*, 2019

A reação catalisada pelas LPMOs depende da presença de um doador de elétrons externo e de um cossubstrato oxidante, cuja identidade tem sido objeto de diversos debates no meio científico nos últimos anos, oscilando entre o oxigênio molecular (O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Embora o oxigênio molecular tenha sido inicialmente considerado o oxidante primário, investigações teóricas avançadas utilizando métodos de mecânica quântica e molecular indicam que, para algumas LPMOs como a LsAA9, a via impulsionada por O_2 é energeticamente inviável, enquanto a ativação por peróxido de hidrogênio é termodinâmica e cineticamente favorável, envolvendo a formação de intermediários reativos como o Cu(II)-oxil²³.

Ainda assim, o mecanismo de funcionamento das LPMOs permanece sendo um objeto de intenso debate na academia, uma vez que não há consenso na literatura sobre sua real dinâmica catalítica.^{24,25} A família das LPMOs é extremamente variada e permanece em expansão²⁶, portanto, ainda há muito que investigar no que tange a compreensão das especificidades de cada enzima.

1.3 Os Biomiméticos

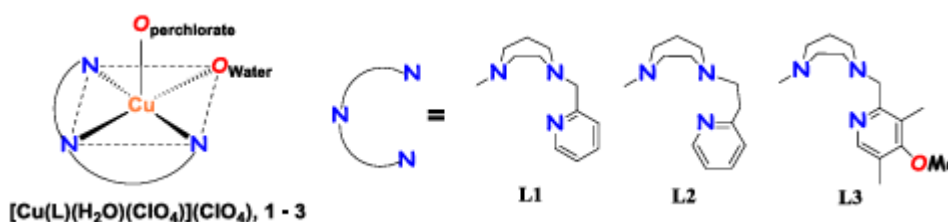
Diante da complexidade estrutural e da relevância industrial das LPMOs, o desenvolvimento de complexos sintéticos biomiméticos de cobre tem se destacado como uma estratégia promissora tanto para a elucidação de mecanismos de reação quanto para a obtenção de novos catalisadores aplicáveis à despolimerização de polissacarídeos. A premissa fundamental dessa abordagem consiste em replicar, em estruturas mais simples, o ambiente de coordenação do tipo braçadeira de histidina

que é característico dessas enzimas, utilizando ligantes nitrogenados que estabilizem o centro metálico e permitam a ativação de espécies oxidantes^{27,28}.

Visando entender mais sobre o funcionamento das LPMOs, estudos recentes com complexos de cobre(I) e H_2O_2 demonstraram que a química do tipo Fenton pode ser direcionada para realizar uma hidroxilação específica em certos sítios de ligantes, sugerindo que a atividade de peroxigenase observada nas LPMOs pode operar através de mecanismos similares, envolvendo espécies de Cu-OH e radicais hidroxila²⁹.

Para replicar a geometria em forma de T do sítio ativo biológico, diversas abordagens tem optado por empregar ligantes tridentados do tipo Cu-N_3 , que exibem uma acidez de Lewis superior e taxas de clivagem oxidativa mais rápidas quando comparados a análogos estruturais com ligantes tetradentados do tipo Cu-N_4 .³⁰ Avanços recentes no design de complexos modelo permitiram mimetizar com alta precisão o grande ângulo de torção ($\sim 75^\circ$) entre os anéis de imidazol encontrados na enzima biológica³¹, além do uso de arranjos peptídicos heteroquirais que conseguem estabilizar a coordenação com o átomo de cobre de forma eficiente³². A estrutura de alguns dos biomiméticos já registrados na literatura podem ser observadas na Figura 1.4 abaixo.

Figura 1.4 – Biomiméticos presentes na literatura.



Extraído de MUTHURAMALINGAM *et al*, 2019.

A atividade catalítica desses compostos tem sido comprovada por meio de testes utilizando diversos substratos variados, englobando desde pequenas moléculas-modelo como o álcool benzílico e o p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (PNp), oligossacarídeos solúveis como a celobiose, até polímeros insolúveis complexos como quitina, celulose microcristalina e bagaço de agave.³⁰⁻³³

Apesar do progresso na síntese de biomiméticos, a comunidade científica ainda enfrenta desafios significativos no que tange as questões mecanísticas e metodológicas. A quantificação exata da eficiência desses complexos modelo esbarra

em limitações experimentais significativas, uma vez que em alguns testes, como os ensaios colorimétricos com PNP, os próprios complexos podem acabar degradando o cromóforo gerado durante a reação, o que pode resultar na subestimação dos valores reais de atividade catalítica³³.

Outro obstáculo na transição de sistemas sintéticos para a aplicação prática é a baixa estabilidade estrutural sob condições operacionais durante períodos prolongados. Durante a incubação com o co-substrato peróxido de hidrogênio, muitos compostos sofrem inativação rápida ou danos auto-oxidativos irreversíveis nos próprios ligantes, o que resulta na liberação de íons de cobre livres na solução³⁴.

Além disso, também é reportado que o uso de oxidantes mais fortes, como é o caso do H_2O_2 em relação ao O_2 , costuma gerar maior nível de degradação estrutural e até mesmo a diminuição da seletividade do processo oxidativo com o tempo³⁵. Portanto, desvendar essas vias de inativação e pensar na arquitetura da segunda esfera de coordenação de forma a proteger o centro metálico contra reações indesejadas representa um grande desafio nessa área de pesquisa³⁶.

Mesmo uma simples substituição do resíduo de glicina na posição 2 é capaz de alterar drasticamente a rede de ligações de hidrogênio, a geometria de coordenação do centro de cobre e a interação com o substrato, resultando em perda significativa de atividade.³⁷ Essa complexidade é amplificada quando se considera o papel crítico da esfera de coordenação secundária, onde pequenas mutações em um único resíduo não perturbam diretamente o campo de ligação do cobre, mas alteram consideravelmente o potencial de redução, as taxas de reoxidação e a estabilidade de intermediários radicais³⁸, o que significa que a atividade catalítica das LPMOs é dependente de interações sutis, o que dificulta sua reprodução em sistemas sintéticos.

Um dos principais debates na literatura reside na identificação incontestável das espécies reativas de oxigênio (ROS) responsáveis pela atividade catalítica da enzima. Atualmente, ainda há intensa discussão para determinar se o verdadeiro agente da clivagem é um intermediário mononuclear de cobre-hidroperoxo estável, uma espécie cobre-oxil altamente reativa, ou radicais hidroxila livres que operam via reações inespecíficas do tipo Fenton³⁶, onde há estudos propondo um papel central para o peróxido de hidrogênio e questionando a real relevância da atividade diretamente dependente de O_2 .³⁹

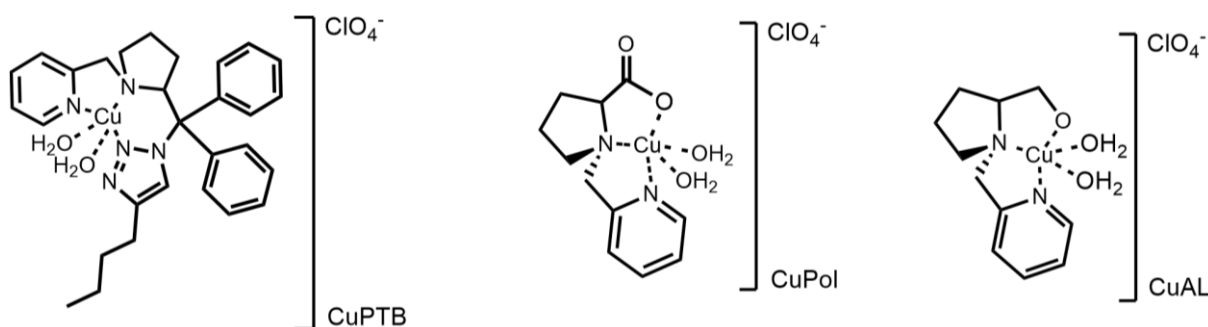
Enquanto a natureza dos intermediários reativos gerados na clivagem da ligação O-O também gera controvérsias, simulações computacionais com base em

complexos biomiméticos indicam que há a formação de espécies $\text{trans-Cu(II)-(OH)}_2$ em detrimento dos tradicionalmente propostos radicais hidroxila ou intermediários Cu(II)-oxil .⁴⁰ Essa variedade de mecanismos possíveis, aliada à complexa relação entre a ligação do polissacarídeo e do cosubstrato, à influência do ambiente redox repleto de fenóis e lignina, e à necessidade de controle da produção de H_2O_2 para evitar danos oxidativos, evidencia que fazer uma réplica sintética fiel do sítio ativo das LPMOs é apenas uma parte do problema, sendo indispensável uma compreensão do sistema que integre desde efeitos quânticos locais até o comportamento do substrato a nível molecular para que seja possível desenhar catalisadores sintéticos à altura das enzimas LPMO.

A necessidade de superar essas barreiras operacionais e analíticas fundamenta a relevância desse tipo de estudo. O design e síntese de catalisadores modelo mais robustos e estáveis, que consigam aliar a fidelidade à braçadeira de histidina do sistema biológico a uma alta resiliência termodinâmica contra reações de auto-oxidação permanece um desafio para os químicos inorgânicos.

Nesse sentido, o presente trabalho busca analisar as diferenças entre diferentes biomiméticos sintetizados no laboratório, conforme Figura 1.5, e propor modelos mais estáveis e eficientes com base nesses dados, de forma a contribuir com o esforço coletivo para tornar a catálise com complexos de cobre sintéticos mais próxima de possíveis aplicações práticas e sustentáveis na área de conversão de biomassa.

Figura 1.5 – Catalisadores sintetizados em laboratório.



2. Objetivos

2.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo geral a síntese de um novo biomimético de LPMO derivado da L-Prolina para atuar como catalisador no processo de degradação de biomassa lignocelulósica, e o estudo da correlação estrutura-atividade em diferentes complexos de cobre elaborados e sintetizados dentro do grupo de pesquisa, a fim de identificar quais características estruturais são determinantes para maior atividade catalítica, apontando caminhos mais promissores para o desenho de catalisadores com atividade otimizada.

2.2 Específicos

- Sintetizar um ligante novo (AL) baseado na estrutura da L-Prolina com baixo impedimento estérico.
- Caracterizar o ligante AL pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D, Espectroscopias na Região do Infravermelho, Ultravioleta e Visível, Espectrometria de Massas, XPS e Voltametria Cíclica.
- Sintetizar um complexo de cobre (II) inédito, proveniente do perclorato de cobre hexahidratado com o ligante AL previamente sintetizado e caracterizado.
- Caracterizar o novo complexo com as técnicas de Espectroscopias na Região do Infravermelho, Ultravioleta e Visível, Espectrometria de Massas, XPS e Voltametria Cíclica, além das técnicas de Análise Elementar e Ressonância Paramagnética Eletrônica.
- Verificar se o novo complexo apresenta atividade catalítica por meio de testes utilizando 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (PNp) e papel filtro como substratos.
- Realizar uma análise comparativa entre o CuAL e dois outros complexos sintetizados no grupo de pesquisa com ligantes distintos, de

modo a correlacionar mudanças nas estruturas dos complexos com sua atividade catalítica e mecanismos de ação

- Detectar a presença de radicais no processo de catálise de forma a compreender o mecanismo de funcionamento do catalisador.

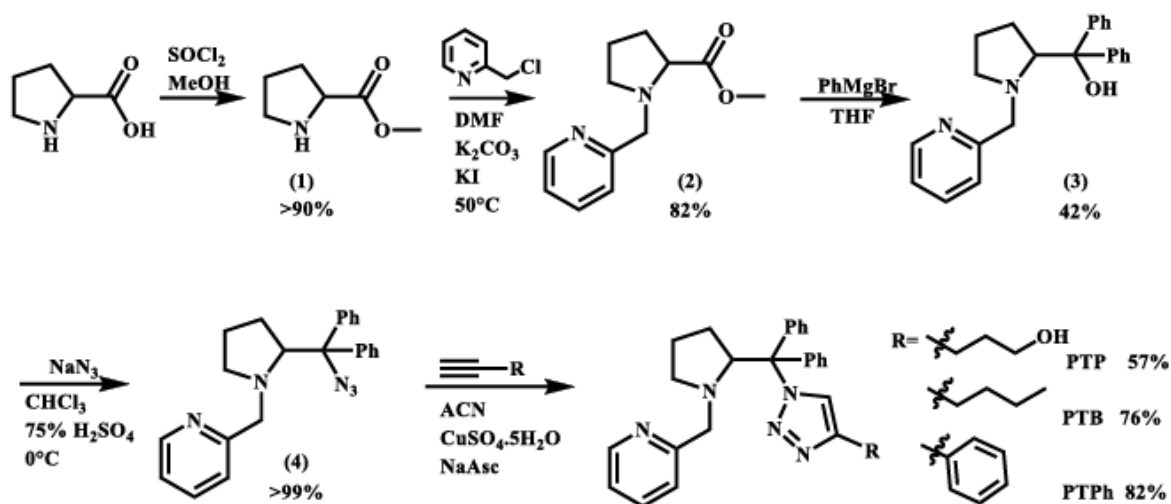
3. Parte experimental

3.1 Síntese dos complexos

3.1.1 Síntese do CuPTB

O complexo CuPTB é um mimético cuja síntese e caracterização foi desenvolvida previamente no grupo de pesquisa⁴¹, sendo inicialmente pensado para catalisar a reação de redução de nitrito.

Figura 3.1 – Esquema de síntese do CuPTB



Ferreira, 2022.

3.1.1.1 Síntese dos compostos prolinato de metila (1) e prolinato (piridin-2-ilmetil) de metila (2)

Em um balão Schlenk de 250 mL, sob atmosfera inerte de argônio, foram introduzidos 40 mL de metanol anidro. O sistema foi resfriado em banho de gelo até atingir 0°C . Nessa temperatura, adicionou-se 8,4 mL (0,115 mol) de SOCl_2 gota a gota. Na sequência, acrescentou-se 12 g (0,104 mol) de L-prolina à mistura reacional, que foi mantida sob agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período, o solvente foi eliminado por evaporação, obtendo-se 17,2 g do intermediário (1) na forma de um óleo de coloração amarela clara.

O material obtido (17,2 g; 0,104 mol) foi então dissolvido em 70 mL de DMF. Em seguida, adicionaram-se 33 g (0,311 mol) de K_2CO_3 , 18,8 g (0,114 mol) de 2-(clorometil)piridina hidrocloreto e 7,91 g (0,047 mol) de KI. A suspensão resultante foi agitada a 50 °C por 16 horas. Passado esse intervalo, adicionaram-se 50 mL de água e realizou-se a extração do produto com diclorometano (três porções de 30 mL). A fase orgânica combinada foi seca sobre $MgSO_4$, e o solvente foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O composto (2) foi isolado como um óleo vermelho-escuro, com rendimento de 82%.

RMN 1H : (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,53 (d, 1H); 7,66 (t, 1H); 7,46 (d, 2H); 7,19 (q, 1H); 4,04 (d, 1H); 3,82 (d, 1H); 3,67 (s, 3H); 3,44 (m, 1H); 3,14 (m, 1H); 2,54 (m, 1H) 2,19 (m, 1H); 1,95 (m, 1H); 1,84 ppm (m, 1H).

RMN ^{13}C : δ 174,49; 158,67; 148,95; 136,47; 122,99; 122,08; 66,37; 60,30; 55,53; 51,33; 29,33; 23,20 ppm.

3.1.1.2 Síntese do difenil(1-(piridin-2-il-metil)pirrolidin-2-il)metanol (3)

Em um balão Schlenk de 250 mL contendo 0,653 g (0,026 mol) de magnésio metálico, foi feita a flambagem do sistema sob vácuo, seguida de resfriamento até temperatura ambiente.

Sob atmosfera inerte de argônio, adicionaram-se 30 mL de THF anidro e aproximadamente 20 mg de iodo. Após dissolução completa do I_2 , 2,86 mL (0,026 mol) de brometo de benzila foram introduzidos gota a gota. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente até o consumo total do magnésio metálico. Em seguida, o sistema foi resfriado em banho de gelo e 2,96 g (0,013 mol) do composto (2) foram adicionados gota a gota. A reação foi então mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Transcorrido esse período, adicionaram-se 10 mL de HCl a 10% e a mistura permaneceu sob agitação por mais 1 hora. A solução resultante foi neutralizada com NaOH 0,1 M e submetida à extração com diclorometano (três porções de 50 mL). A fase orgânica combinada foi seca sobre $MgSO_4$ anidro, e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como fase móvel

uma mistura de acetato de etila e hexano (50:50). O produto final foi isolado na forma de um sólido amarelo-claro, com rendimento de 42%.

RMN ^1H : (400 MHz, CDCl_3): δ 8,45 (d, 1H); 7,70 (d, 2H); 7,60 (m, 3H); 7,19 (q, 1H); 7,32 (m, 4H); 7,27 (m, 1H); 7,10 (m, 3H); 5,05 (br, 1H) 4,10 (s 1H); 3,41 (m, 2H); 3,02 (m, 1H); 2,58 (m, 1H); 1,99 (m, 1H) 1,81 (m, 1H); 1,69 ppm (m, 1H).

RMN ^{13}C : δ 148,69; 146,34; 136,50; 128,20; 128,10; 126,54; 126,36; 125,70; 125,63; 122,74; 122,04; 78,14; 77,24; 70,36; 63,34; 54,05; 29,56; 24,38 ppm.

3.1.1.3 Síntese do 2-((2-(azidodifenilmetil)pirrolidin-1-il)metil)piridina(4)

Em um balão contendo 40 mL de clorofórmio foram dissolvidos 1 g (0,270 mmol) do composto (3) e 1 g (1,538 mmol) de azida de sódio. O sistema foi resfriado em banho de gelo e, sob agitação, adicionaram-se 10 mL de H_2SO_4 75% gota a gota. A mistura reacional foi mantida sob agitação constante à temperatura de 12 °C por um período de 24 horas. Após esse intervalo, a reação foi neutralizada pela adição de uma solução concentrada de bicarbonato de sódio. Em seguida, realizou-se a extração do produto com diclorometano (três vezes de 30 mL). A fase orgânica combinada foi seca sobre MgSO_4 anidro, filtrada e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O composto (4) foi obtido na forma de um óleo castanho, com massa de 1,07 g, correspondendo a um rendimento de aproximadamente 100%.

FTIR (pastilha de KBr, cm^{-1}): 2108 cm^{-1} , s [v (N=N=N)]

RMN ^1H : (400 MHz, CDCl_3): δ 8,45 (d, 1H); 7,62 (t, 1H); 7,53 (d, 2H); 7,47 (d, 2H); 7,38-7,20 (m, 8H); 7,11 (t, 1H); 4,20 (dd, 1H); 3,9 (d, 1H); 3,65 (d, 1H); 2,89 (m, 1H); 2,44 (m, 1H); 2,12 (m, 1H); 1,89 (m, 1H) 1,63 (m, 1H) 1,39 ppm (m, 1H).

RMN ^{13}C : 160,30; 148,30; 142,19; 141,4; 136,08; 128,01; 127,90; 127,42; 127,37; 122,81; 121,70; 77,25; 76,47; 72,71; 64,27; 57,71; 31,69; 23,32 ppm.

3.1.1.4 Síntese do ligante PTB

Em um balão de 50 mL, sob atmosfera inerte de argônio, foram adicionados 1 g (0,270 mmol) do composto (4) e 4 mL de acetonitrila. À solução resultante, acrescentou-se 0,270 mmol de 1-hexino, seguido de 33 mg (5 mol%) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 53 mg (10 mol%) de ascorbato de sódio e 1 mL de água. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente, em atmosfera de argônio, por um período de 24 horas. Após esse tempo, adicionaram-se 15 mL de água e realizou-se a extração do produto com diclorometano (três porções de 30 mL). A fase orgânica combinada foi seca sobre MgSO_4 anidro e o solvente foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etila e hexano (50:50). O produto puro foi isolado na forma de um sólido amarelo-claro, com rendimento de 76%.

FTIR (pastilha de KBr, cm^{-1}): 3059 $\nu(\text{C-H})$ sp^2 ; 2953, 2958, 2870, 2808 $\nu(\text{CH})\text{sp}^3$; 1590, 1568 $\nu(\text{C=N})$; 1493, 1474, 1447, 1433 $\nu(\text{C=C})$; 1042 $\nu(\text{C-N})$; 703, 754 δ fora do plano($=\text{C-H}$).

^1H NMR: (400 MHz, acetona- d_6): δ 7,71 (s, 1H); 7,61 (t, 1H); 7,54 (m, 2H); 7,41 (m, 2H); 7,37-7,27 (m, 6H); 7,14 (m, 1H); 6,93 (d, 1H); 5,16 (dd, 1H); 4,17 (d, 1H); 3,66 (d, 1H); 2,63 (t, 2H); 2,51 (m, 1H) 2,404 (m, 2H); 1,80 (m, 1H); 1,57 (quin, 2H); 1,36 (m, 1H); 1,31 (m, 2H); 0,86 (t, 3H); 0,24 ppm (m, 1H).

^{13}C NMR: δ 160,69; 148,54; 146,14; 141,93; 140,48; 135,97; 130,47; 128,64; 127,77; 127,69; 127,40; 127,31; 123,43; 122,48; 121,54; 77,28; 69,64; 63,35; 55,00; 31,60; 30,73; 25,03; 23,45; 21,90; 13,22 ppm.

HRMS: $[\text{MH}]^+$: 452.2809 (Experimental); 452.2814 (calc. for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_5$)

3.1.1.5 Síntese do complexo CuPTB

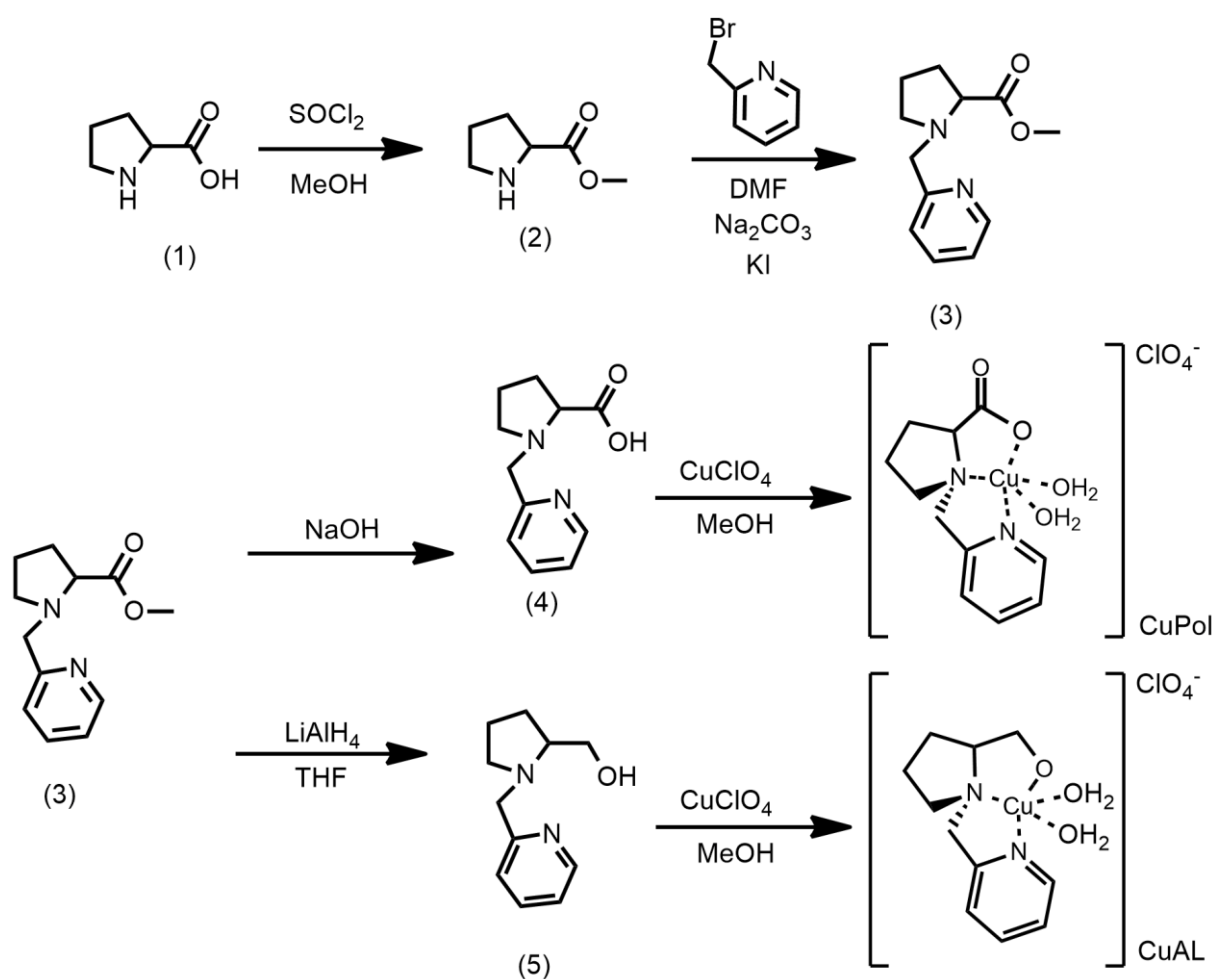
Em 6 mL de metanol foi adicionado 0,148 mmol do sal $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e em seguida foi adicionado 0,148 mmol do ligante. A reação foi deixada em agitação e temperatura de 50°C por 4h. Após esse tempo, o solvente foi removido sob pressão

reduzida. O sólido obtido foi lavado com éter e mantido no dessecador, e o rendimento obtido foi de 90%.

3.1.2 Síntese do CuPol e CuAL

O complexo CuPol, desenvolvido recentemente⁴², representa o primeiro mimético de LPMO sintetizado pelo grupo de pesquisa com a finalidade de catalisar reações de clivagem de biomassa. Inspirado na estrutura do CuPol, o complexo CuAL foi sintetizado com o objetivo de apresentar desempenho superior ao seu precursor. A rota sintética para a obtenção tanto do CuPol quanto do CuAL está esquematizada na Figura 3.2.

Figura 3.2 – Rota de Síntese do CuPol e CuAL



Para todas as reações, foram utilizados reagentes de grau analítico, não havendo necessidade de purificação prévia, exceto para o cloreto de tionila que foi destilado previamente. Para garantir a ausência de água ou oxigênio nos solventes utilizados, estes foram colocados sob refluxo em atmosfera de N₂ durante 1 hora.

As sínteses dos ligantes precursores (2) e (3) ocorreu da mesma forma que na seção 3.1.1.1.

3.1.2.1 Síntese do Ligante Pol

Em um balão schlenk de 50 mL, sob atmosfera inerte de argônio, foram adicionados 20mL uma solução 1M de NaOH, e 881mg do composto (3), o equivalente a 8mmol. A proporção utilizada foi de 5:1. A mistura reacional ficou sob agitação durante 17 horas, em seguida foi neutralizada com solução de HCl 0,1M, filtrada e a solução contendo o ligante foi submetida a pressão reduzida em evaporador rotatório para remoção do solvente.

3.1.2.2 Síntese do complexo CuPol

A um balão schlenk de 50mL com 8 mL de metanol anidro sob atmosfera de argônio, foram adicionados 154 mg de Cu(ClO₄)₂·6H₂O (0.414 mmol). Depois de 5 minutos em agitação, uma solução de 91 mg do ligante Pol (0.414 mmol) em metanol foi adicionada gota-a-gota. A reação ficou sob agitação constante a 40 °C por 4 horas. Depois disso, a mistura reacional foi resfriada a temperatura ambiente até a formação de cristais azuis. Uma mistura de metanol e éter etílico foi adicionada ao sobrenadante para obter uma quantidade maior de cristais. Os cristais foram lavados com éter etílico e foram obtidos 112 mg de complexo. O rendimento foi calculado em 70%.

HRMS (m/z) cluster isotópico [CuPol]₃Cu]²⁺: 452.5138 (calculado: 451.5158).

FTIR in KBr (cm⁻¹): 3477; 2964, 2947; 1651, 1614; 1566; 1483, 1446, 1421, 1357, 1300; 1109, 1093; 765, 627.

Análise elementar calculada para C₁₁H₁₅ClCuN₂O₇: C 34.21; H 3.91; N 7.25.

Valor experimental: C: 34.08; H: 4.22; N 7.36.

3.1.2.3 Síntese do Ligante AL

A um balão schlenk de 50mL, sob atmosfera de argônio, foram adicionados 8 mL de THF anidro. Em seguida, foram dissolvidos 300 mg (1,362mmol) do composto (3). Adicionou-se então 52mg de LiH_4Al (~1,37 mmol) à mistura reacional e a reação ficou sob agitação e refluxo a 50 °C durante 17 horas. A solução foi posteriormente resfriada à temperatura ambiente e adicionou-se 5 gotas de solução de NH_4Cl 5%. A solução final foi filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O rendimento foi de 90%.

3.1.2.4 Síntese do complexo CuAL

A um balão schlenk de 50 mL com 20 mL de metanol anidro sob atmosfera de argônio, foram adicionados 578 mg de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,56 mmol). Depois de 5 minutos em agitação, uma solução de 300 mg do ligante AL (1,56 mmol) em metanol foi adicionada gota-a-gota. A reação ficou sob agitação constante a 40 °C por 4 horas. Depois disso, a mistura reacional foi resfriada a temperatura ambiente e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Foi obtido um pó azul que foi lavado com acetona e éter etílico. O rendimento foi calculado em 82%.

3.2 Técnicas de Caracterização

3.2.1 Caracterização do Ligante AL

3.2.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros foram obtidos através do espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, liderado pelo prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira. Foram realizadas as técnicas unidimensionais de ^1H e ^{13}C e correlações bidimensionais COSY e HSQC. Os experimentos foram realizados utilizando os solventes CDCl_3 , D_2O e $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

3.2.1.2 Espectrometria de massas

Os espectros de massas dos complexos de Cu^{2+} e dos ligantes foram obtidos em colaboração com o laboratório da professora Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, do Departamento de Química da UFSCar. Para os ligantes, a ionização foi realizada pelo método de ionização química por metano e para os complexos foi utilizada ionização por electrospray (ESI+).

3.2.1.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho

O espectro de IR do complexo foi obtido utilizando um espectrômetro FTIR Shimadzu Prestige-21 com acessório de ATR, pertencente a Central Analítica do departamento de química da UFSCar. Os espectros foram adquiridos na faixa de 4.000 a 400 cm^{-1} , e a calibração do equipamento foi verificada com um padrão de poliestireno antes das análises.

3.2.2 Caracterização do Complexo CuAL

3.2.2.1 Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível

Os espectros eletrônicos na região do UV-Vis do complexo foram obtidos em um espectrofotômetro HP – Hewlett Packard 8452 A. As amostras foram analisadas em soluções utilizando uma célula de quartzo retangular com capacidade para volume de 1 mL , e caminho óptico de $1,0\text{ cm}$.

3.2.2.2 Voltametria Cíclica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato EG&G Princeton Applied Research Model 273^a, utilizando uma célula convencional de vidro com entrada para os três eletrodos. Os eletrodos utilizados foram: carbono vítreo ($0,071\text{ cm}^2$), platina e $\text{Ag(s)}/\text{AgCl(s)}|\text{KCl (3,5M)}$ como eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência, respectivamente. As medidas foram realizadas em metanol contendo perclorato de tetrabutylamônio (PTBA) $0,1\text{ mol/L}$ como eletrólito de suporte.

Os parâmetros eletroquímicos foram obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos dos processos reversíveis, ou quase-reversíveis, em que apresentam linhas de base anódica e catódica bem definidas. Os potenciais de pico anódico (E_a) e catódico (E_c) foram determinados pelas projeções verticais dos máximos das correntes sobre os eixos.

3.2.2.3 Análise elementar

As medidas de análise elementar foram realizadas na central analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos para determinação da porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes nas amostras. O equipamento utilizado foi o EAGER 200 CE Instruments.

3.2.2.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica

Os resultados de EPR foram obtidos em colaboração com o Prof. Otaciro Rangel Nascimento do Instituto de Física da USP campus II. As medidas foram realizadas em tampão de carbonato de cálcio pH10,5, à temperatura ambiente (296 K) e congeladas em N₂ líquido (77K). As medidas foram realizadas utilizando o equipamento de EPR Modelo Varian E109, banda X, utilizando a cavidade retangular e modulação de campo a 100 kHz. Os parâmetros de ajuste das medidas foram: potência de microondas de 20 mW, amplitude de modulação de 0,4 mT pico a pico, ganho ajustável para cada amostra, varredura de campo de 160 mT, constante de tempo de 0,064 s, tempo de varredura de 3 minutos. Para as medidas sob N₂ líquido foi utilizado o Dewar de imersão. Utilizou-se um padrão de EPR para calibração do campo magnético (cristal de MgO:Cr^(III), $g = 1,9797$) e a frequência de ressonância foi medida com um frequencímetro de micro-ondas.

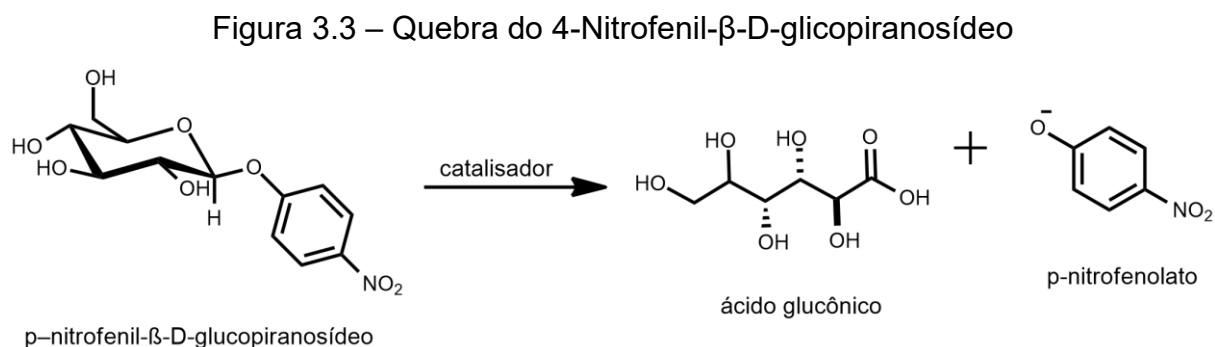
3.2.2.5 XPS

Os espectros foram obtidos utilizando o espectrofotômetro de raios-X ESCA+ da Scienta Omicron, equipado com monocromador com fonte de raios X Al K α ($h\nu = 1486,7$ eV), operado pelo Prof. Valmor Mastelaro do Laboratório de Nanomateriais e Cerâmicas Avançadas (NaCA) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC - USP).

3.3 Testes de atividade

3.3.1 Atividade catalítica

Para verificar se os complexos possuíam atividade catalítica, foram realizados testes com 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como substrato, sendo esses baseados em uma metodologia já conhecida⁴³, com algumas adaptações. O composto 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo tem estrutura similar à da celobiose, que é o substrato da enzima β -glucosidase. Ao sofrer a quebra da ligação β (1 $\rightarrow$ 4), são liberadas uma molécula de ácido glucônico e o íon p-nitrofenolato (Figura 3.3), que possui absorvância em cerca de 405nm.



O procedimento adaptado consistiu na adição, ao meio reacional, de 100 μ L de solução do complexo (1 mmol) em solução tampão de pH mais alto, o carbonato de sódio pH 10,5, para que o íon p-nitrofenolato formado fique mais estável em solução. Em seguida, adiciona-se 500 μ L de solução do substrato (50 mmol em tampão), 100 μ L de solução de H_2O_2 (~9 mmol em água destilada) e 300 μ L de solução tampão, totalizando um volume final de 1 mL.

3.3.2 Atividade celulolítica total

Para o teste de atividade celulolítica total utilizou-se papel filtro como substrato⁴⁴ e a absorvância foi medida pelo método DNS⁴⁵, em que há a redução do ácido dinitrosalicílico pelos açúcares redutores à ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, cuja absorvância máxima é em torno de 540 nm.

Ao meio reacional, adicionou-se uma amostra de 0,5 x 0,75 cm de papel de filtro, 31,2 µL de solução de complexo 1mM e 62,4 µL de tampão carbonato de sódio pH 10,5, e então a mistura foi encubada a 45°C durante 1 hora. Após esse processo, adicionou-se 188 µL de DNS e a mistura foi aquecida a 100°C e agitada por 15 minutos.

Em seguida, a mistura foi refrigerada até a temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 1250 µL de água. Fez-se uma pausa de 20 minutos e então foi lida a absorbância utilizando uma curva padrão de glucose. Os experimentos foram realizados em triplicata e foi feito um controle adicionando apenas solução tampão, sem o complexo, que foi utilizado como branco e cujos valores foram reduzidos dos valores finais de absorbância pelo próprio software do equipamento.

3.3.3 Atividade de Endoglucanase

Para fins de determinação de atividade específica para endoglucanase, foi realizado um teste utilizando CMC como substrato (4), também pelo método do DNS (5). Da mesma forma que o teste anterior, a mistura reacional continha 31,25 µL de solução de complexo 1mM e 31,25 µL de substrato CMC 0,03125% preparado em tampão citrato 50 mM pH 4,8, e foi incubada a 45°C durante 1 hora. Em seguida, 188 µL de DNS foram adicionados e a amostra foi aquecida a 100°C e agitada por 15 minutos.

Em seguida, a amostra foi resfriada até a temperatura ambiente e adicionou-se 1250 µL de água. Fez-se uma pausa de 20 minutos e então foi lida a absorbância utilizando uma curva padrão de glucose. Os experimentos foram realizados em triplicata.

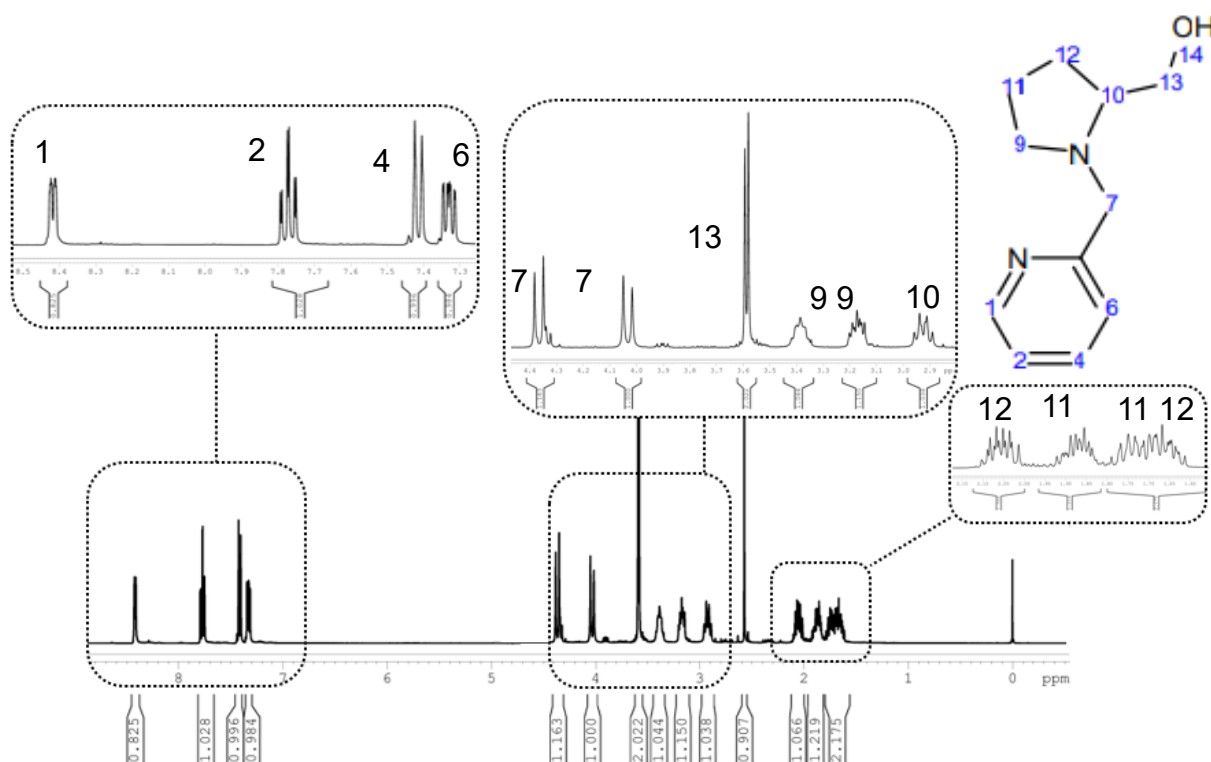
4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterizações

4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Para caracterização do ligante final AL, foram obtidos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 4.1 e 4.2), além de espectros bidimensionais de HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ e COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (Figuras 4.3 e 4.4) que foram analisados utilizando o software Spectrus da ACD/Labs.

Figura 4.1 – Espectro de RMN de ^1H do ligante AL em D_2O .



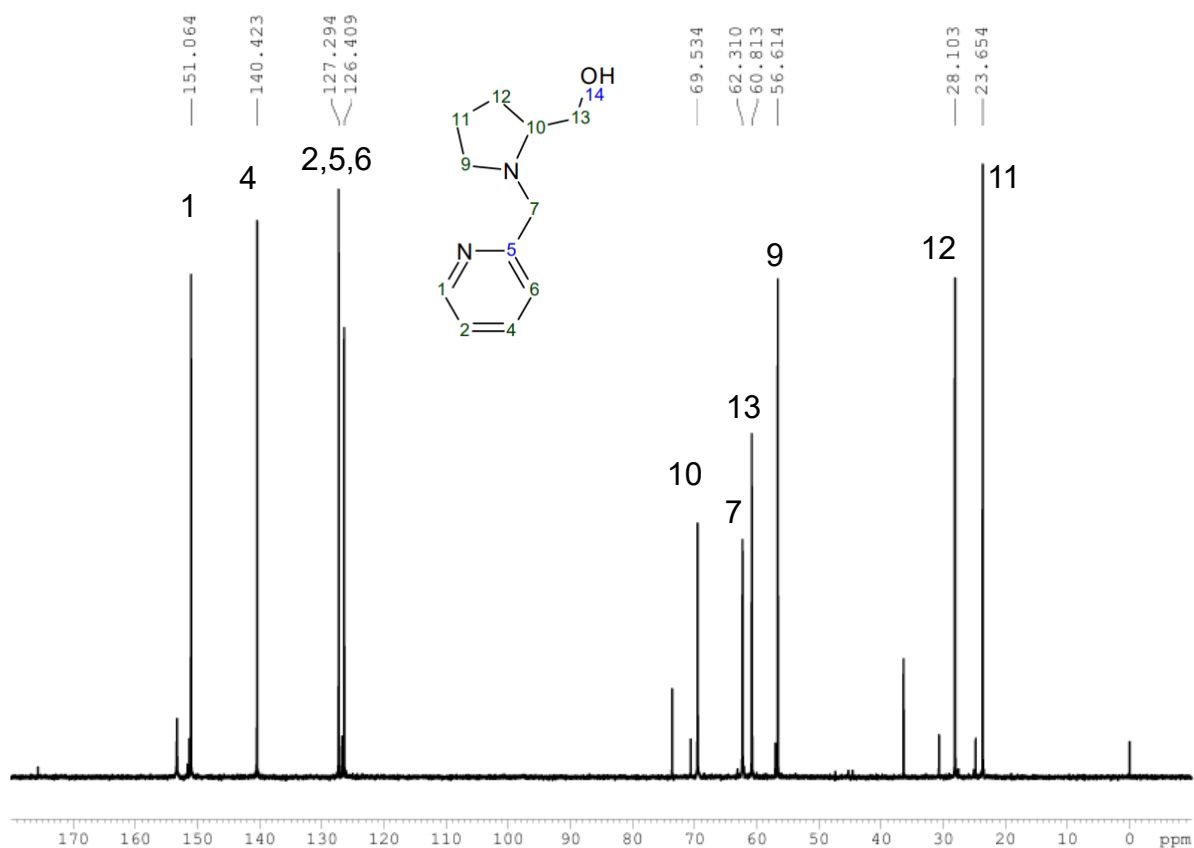
No espectro de RMN ^1H , os hidrogênios aromáticos do anel piridínico são observados entre 7,3 e 8,5 ppm, com o sinal em 8,42 ppm atribuído ao hidrogênio orto ao nitrogênio da piridina, mais desblindado.

Os dois hidrogênios do carbono C7, que servem como uma “ponte” entre a piridina e o nitrogênio da pirrolidina, são diastereotópicos devido à quiralidade do centro pirrolidínico e à proximidade com o anel aromático, apresentando-se como dois dupletos “espelhados” na região de 4,2–4,5 ppm. Em seguida, os dois hidrogênios no carbono C13 exibem um sinal em 3,58 ppm, sendo esse um duplete por ocorrer acoplamento com o hidrogênio do C10.

No anel pirrolidina, os hidrogênios do carbono C9 formam dois multipletos de integral 1 entre 2,8 e 3,3 ppm, e o hidrogênio do carbono quiral C10 aparece como um multiplete em 2,93 ppm.

Os hidrogênios dos carbonos C11 e C12 aparecem como multipletos na região de 1,6–2,0 ppm, sendo os prótons do C12 ligeiramente mais desblindados em relação aos do C11, o que pode ser observado pelo fato de que os multipletos referentes aos hidrogênios do C11 possuem maior valor de J e estão, portanto, e pode ser explicado pela proximidade conformacional com o oxigênio do grupo hidroxila.

Figura 4.2 – Espectro de RMN de ^{13}C do ligante AL em D_2O .



No RMN de ^{13}C do ligante, é possível observar sinais referentes aos carbonos presentes na estrutura molecular, considerando a ausência de elementos de simetria que tornariam alguns núcleos equivalentes entre si.

Os carbonos do anel piridínico aparecem na região característica entre 120 e 160 ppm, típica de sistemas aromáticos nitrogenados. Nessa faixa, foram identificados 4 sinais, em 151, 140, 127 e 126 ppm, o sinal em 151 ppm é atribuído ao carbono 1, diretamente ligado ao nitrogênio do anel piridínico, que sofre forte desblindagem por efeito indutivo e de ressonância.

O sinal em 140 ppm corresponde ao carbono 4, em posição para em relação ao nitrogênio, também desblindado pela aromaticidade do anel. Já os sinais em 127 e 126 ppm são atribuídos aos carbonos 2 e 5, respectivamente. No entanto, a intensidade ligeiramente superior do sinal em 127 ppm sugere uma sobreposição de sinais, muito provavelmente envolvendo os carbonos 2 e 6, que por estarem em posições próximas e sujeitos a influências eletrônicas semelhantes, acabam ressoando em valores muito próximos.

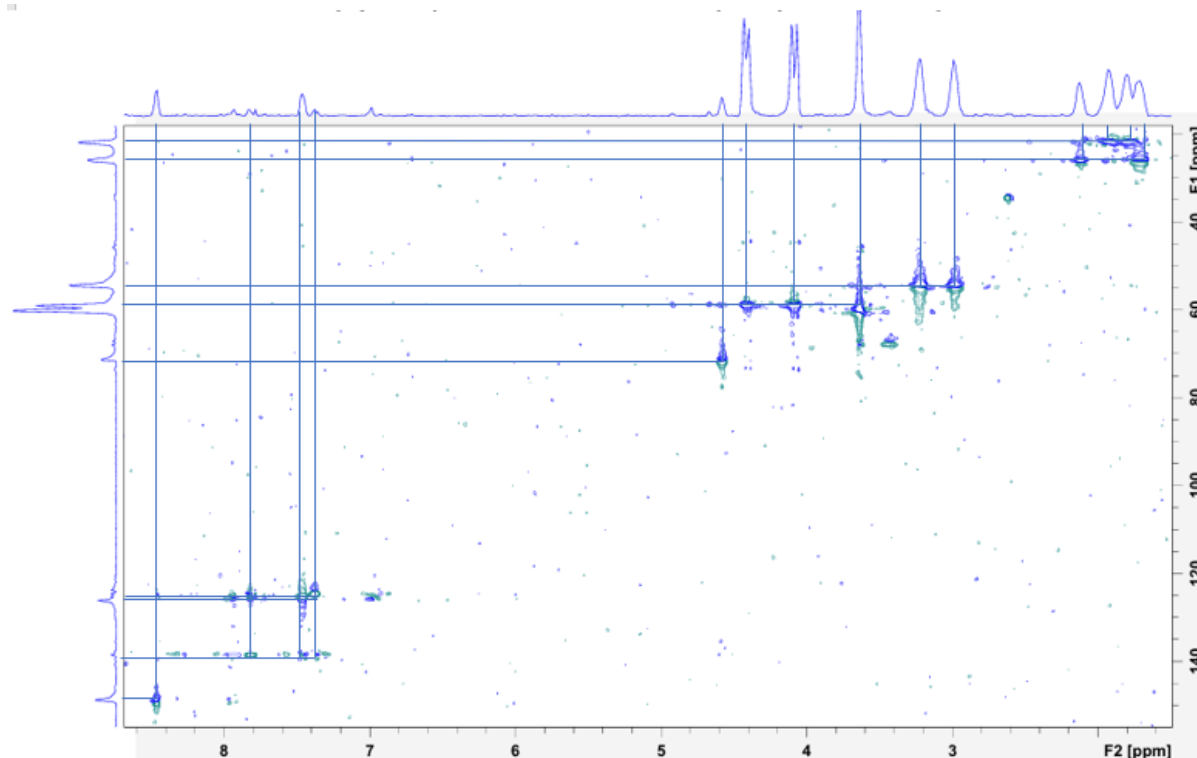
O carbono identificado como C13 na figura acima, se encontra em 69,5 ppm, um deslocamento significativamente mais alto em comparação aos demais carbonos da pirrolidina. Isso pode ser justificado pela ligação com o átomo de oxigênio do grupo hidroxila, que atua desblindando fortemente esse carbono. Esse efeito é ainda mais pronunciado por se tratar de um carbono secundário ligado diretamente a um heteroátomo eletronegativo, deslocando seu sinal para a região típica de carbonos sp^3 oxigenados.

Em seguida, os carbonos 7, 9 e 10, que estão diretamente conectados ao nitrogênio do anel pirrolidínico, aparecem em regiões intermediárias do espectro, com deslocamentos químicos influenciados pela vizinhança com este heteroátomo. O carbono 7, que faz a ponte entre o anel piridínico e o nitrogênio da pirrolidina, sofre desblindagem tanto pelo nitrogênio pirrolidínico quanto pelo anel aromático, aparecendo em 62 ppm. Os carbonos 9 e 10, apresentam deslocamentos na faixa de 55 a 60 ppm, compatíveis com carbonos em posição alfa a um átomo de nitrogênio em amins terciárias.

Por fim, os carbonos 11 e 12, que compõem a porção mais interna do anel pirrolidínico, aparecem na região de alto campo do espectro, com deslocamentos químicos menores, entre 23 e 28 ppm, assim como no espectro de ^1H , em que também

se encontram em valores mais baixos do espectro, justamente por estarem mais blindados que os demais carbonos na molécula.

Figura 4.3 – Espectro de HSQC ^1H – ^{13}C do ligante AL em D_2O .



No espectro de HSQC, podemos observar as correlações diretas entre hidrogênios e carbonos diretamente ligados, permitindo confirmar as atribuições propostas nos espectros de carbono e hidrogênio, e estabelecendo uma correspondência entre os sinais de próton e carbono na estrutura molecular proposta.

O hidrogênio em 8,46 ppm, característico da posição orto ao nitrogênio, correlaciona-se com o carbono em 149,6 ppm, valor compatível com o C1 da piridina, que em seu espectro de ^{13}C aparece em 151 ppm. O sinal em 7,81 ppm mostra correlação direta com o carbono em 138,5 ppm, correspondente ao C4, cujo deslocamento no espectro unidimensional é de 140 ppm.

Os hidrogênios em 7,46 ppm e 7,37 ppm, típicos das posições meta em relação ao nitrogênio, correlacionam ambos com um o carbono em 125 ppm, indicando que os carbonos C2 e C6 ressoam em valores muito próximos, em torno de 126 e 127 ppm no espectro de ^{13}C . Por fim, observa-se um carbono em 124,56 ppm que não apresenta correlação com qualquer hidrogênio no HSQC, confirmando tratar-se do C5, o carbono quaternário do anel piridínico ligado à cadeia lateral. Essa distribuição

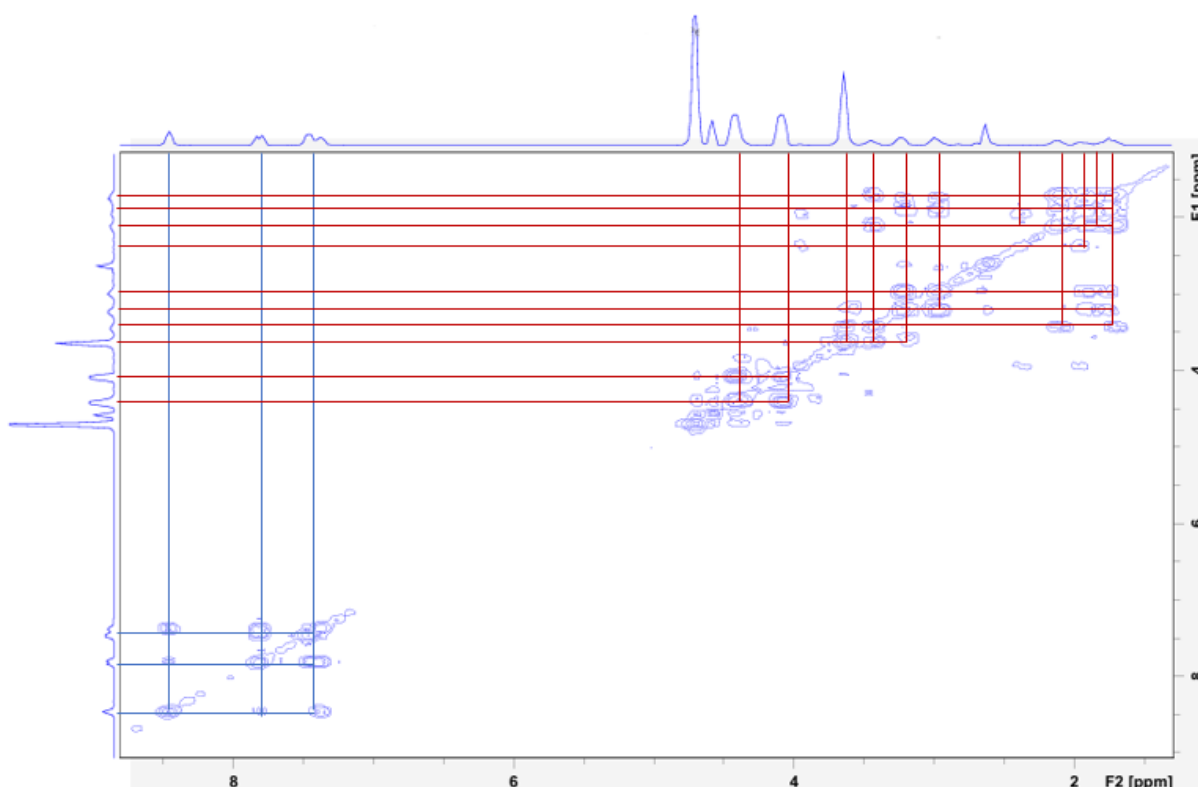
ajuda a validar a atribuição proposta de uma sobreposição dos sinais de C2 e C6 na região de 126 ppm do espectro de carbono.

Na região de campo mais alto, as correlações vão se tornando mais complexas devido à sobreposição parcial dos sinais de hidrogênio e à presença de múltiplos grupos CH₂ na estrutura. O hidrogênio em 4,5 ppm, que corresponde a um dos hidrogênios diastereotópicos do carbono 7, correlaciona com dois carbonos diferentes: um em 69 ppm e outro em 62 ppm. Essa dupla correlação está relacionada a estrutura tridimensional da molécula, onde um dos hidrogênios do carbono 7 está próximo ao carbono no anel pirrolidínico. O outro hidrogênio diastereotópico do carbono 7, em 4,4 ppm, correlaciona-se com o carbono em 62 ppm, indicando que esse carbono é o C7, cujo deslocamento em torno de 69 ppm é justificado pela vizinhança com o nitrogênio e o anel aromático.

O hidrogênio em 2,98 ppm mostra correlação com o carbono em 72,10 ppm, valor atípico para um CH₂ comum, mas compatível com um CH em ambiente desblindado, possivelmente o hidrogênio do carbono quiral 10. Já os hidrogênios entre 3,63 e 3,21 ppm correlacionam-se com carbonos na faixa de 54,31 a 59,98 ppm, região típica de carbonos ligados a nitrogênio. Esses sinais são atribuídos aos hidrogênios dos carbonos 9 e 10 cujos deslocamentos se sobrepõem parcialmente nessa região.

O hidrogênio em 2,97 ppm correlaciona-se com o carbono em 54,13 ppm, reforçando a presença de um grupo CH₂ ou CH ligado a nitrogênio, enquanto o sinal em 2,11 ppm mostra correlação com o carbono em 55,35 ppm, sugerindo tratar-se de outro hidrogênio do mesmo sistema. Na região mais blindada, os multipletos entre 2,1 e 1,7 ppm, de integral 4, correlacionam-se com carbonos entre 21,73 e 34,52 ppm. Esses valores são característicos para os CH₂ mais internos do anel pirrolidínico, que estão mais afastados dos heteroátomos e, portanto, mais blindados, sendo esses os carbonos 11 e 12.

A distribuição das correlações no mapa HSQC valida, portanto, a atribuição conjunta dos espectros de hidrogênio e carbono, permitindo uma visão integrada da estrutura do ligante em solução.

Figura 4.4 – Espectro de COSY ^1H – ^1H do ligante AL em D_2O .

No espectro de cosy, é possível observar correlações entre os hidrogênios do anel piridínico, relativamente isolados do resto da molécula, onde já era esperado haver tanto acoplamento geminal quanto vicinal. Também é possível verificar correlações entre os hidrogênios do carbono C7, que por estarem em um carbono ligado unicamente a um nitrogênio e um carbono quaternário, ambos em cadeias fechadas, também estão relativamente isolados dos demais átomos na parte “superior” da molécula.

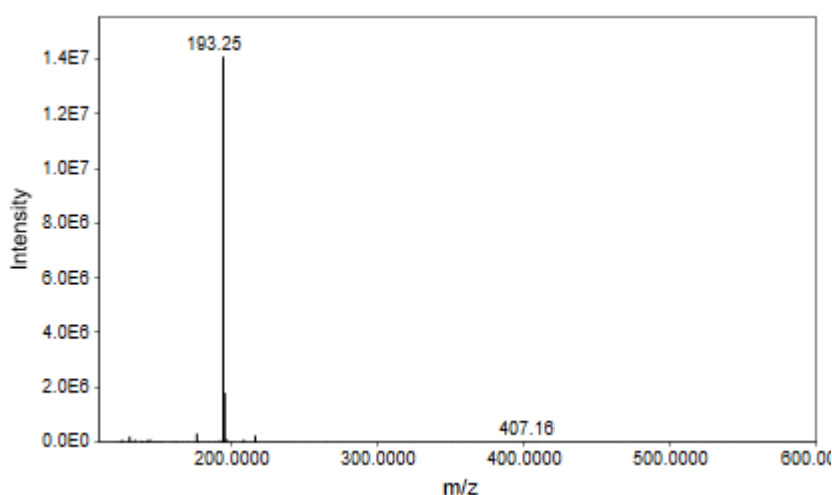
Os dois hidrogênios no carbono 13, além de se correlacionarem entre si, também apresentaram correlações cruzadas com o hidrogênio do carbono quiral C10, permitindo assim confirmar a conectividade entre o grupo CH_2OH e o anel pirrolidínico. Adicionalmente, observam-se correlações entre os hidrogênios do sistema C9-C10-C11-C12, que formam uma rede de acoplamentos ao longo do anel pirrolidínico. Os hidrogênios de C9, mais desblindados pela vizinhança com o nitrogênio, mostram correlações com os hidrogênios de C10 e C11, enquanto estes, por sua vez, se correlacionam com os hidrogênios de C12, permitindo o mapeamento completo da conectividade da pirrolidina.

4.1.2 Espectrometria de Massas

4.1.2.1 Ligante AL

Para corroborar com os espectros de RMN na caracterização dos ligantes orgânicos, foi obtido um espectro de massas de baixa resolução do ligante em metanol.

Figura 4.5 – Espectro de Massas de baixa resolução para o ligante AL.



O espectro de massas de baixa resolução apresentou um pico em m/z 193,25, próximo ao valor esperado para o íon $[M+H]^+$ do ligante (calculado: 193,1378). A pequena diferença de 0,112 Da está dentro de uma faixa aceitável considerando que o espectro possui baixa resolução.

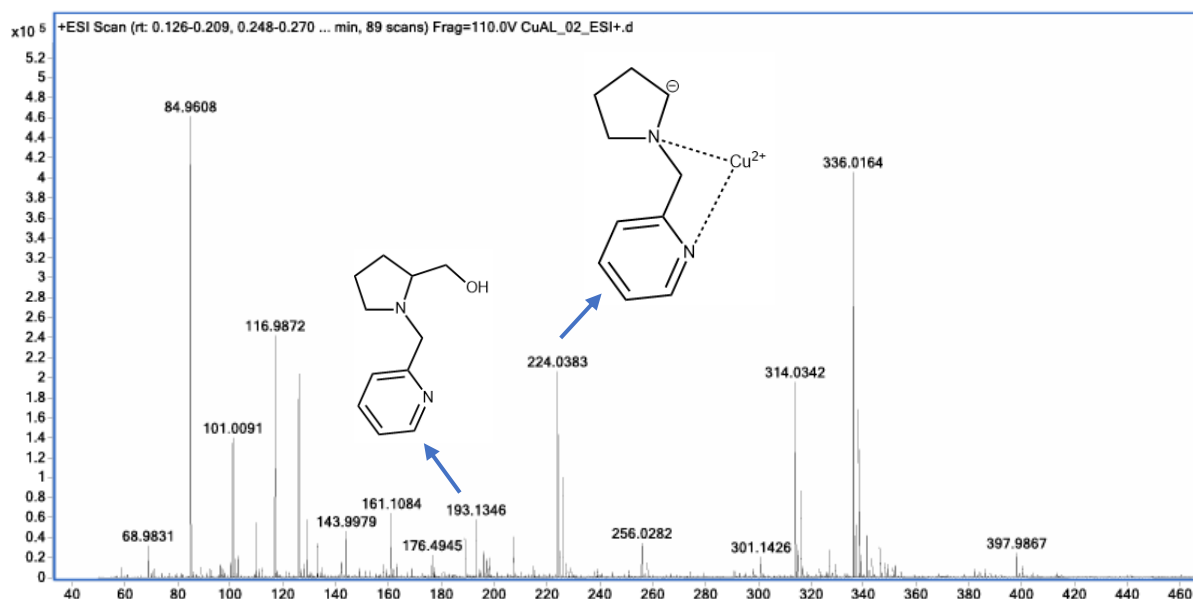
Além disso, os espectros de RMN de 1H e ^{13}C apresentaram fortes indícios de que a estrutura do composto corresponde ao ligante proposto, uma vez que os deslocamentos químicos e as multiplicidades observadas são consistentes com o esperado. Dessa forma, em conjunto com as demais técnicas espectroscópicas, os dados obtidos na espectrometria de massas corroboram a identidade do ligante.

4.1.2.2 Complexo CuAL

Para o complexo, foi obtido um espectro de massas de alta resolução utilizando uma solução aquosa do complexo, que foi analisada por injeção direta e apresentou os padrões de fragmentação esperados para o complexo. No espectro, que se

encontra na Figura 4.6 abaixo, é possível observar um pico em m/z 193,1346 corresponde à estrutura do ligante, e o pico em 224,0383 foi atribuído ao fragmento correspondente à estrutura do complexo sem o braço CH_2OH , com valor calculado de 224,0375. A acurácia foi calculada em 3,57 ppm, o que está dentro do aceitável em espectrometria de massas de alta resolução.⁴⁶

FIGURA 4.6 – Espectro de Massas de Alta Resolução para o CuAL.



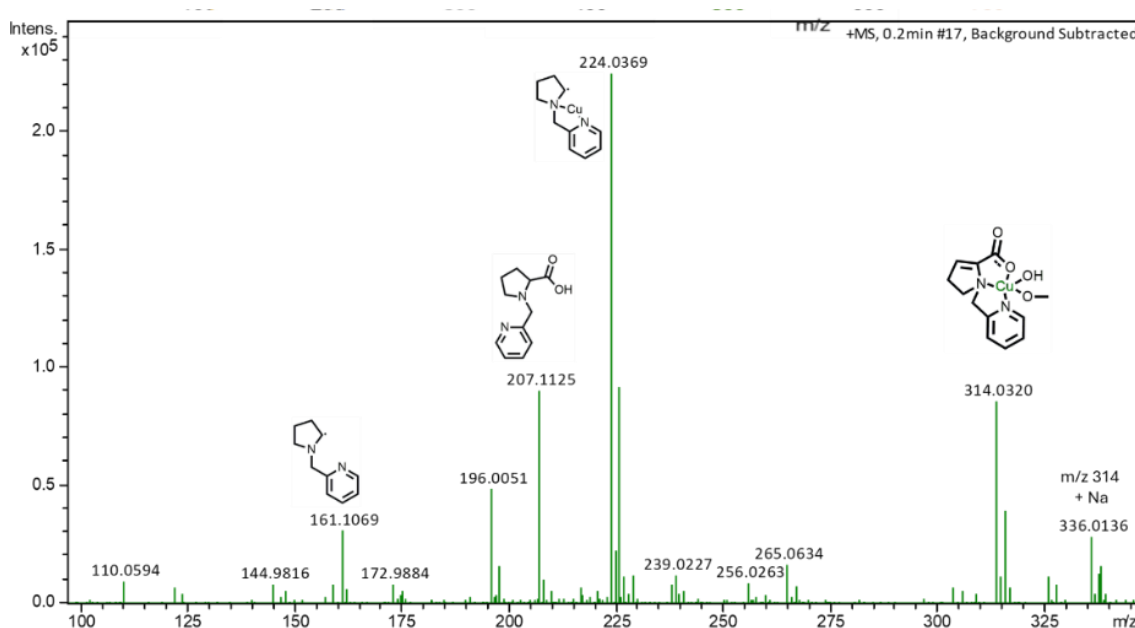
Dado que a metodologia utilizada foi a de injeção direta (ESI-MS), o braço CH_2OH do complexo acaba se fragmentando muito facilmente da estrutura principal, o que é bastante comum para radicais hidroximetila.⁴⁷ Para observar o complexo com o grupo CH_2OH intacto, o ideal seria utilizar LC-MS com separação cromatográfica. No entanto, a presença de cobre inviabiliza o uso de colunas, pois metais de transição contaminam irreversivelmente a fase estacionária. Por isso, optou-se pela injeção direta, mesmo ciente de que isso poderia induzir a fragmentação. O modo negativo (ESI-) poderia minimizar essas perdas, mas o complexo é naturalmente catiônico, resultando em menor sensibilidade, por isso sendo preferido o modo positivo.

4.1.2.3 Complexo CuPol

Comparando os resultados obtidos com o espectro do CuPol (Figura 4.7 abaixo), é possível observar diversas semelhanças e dissimilaridades. O pico em 224 referente ao fragmento sem o “braço” se mantém, porém, também os picos em 314 e

336 ppm estão presentes, com valores próximos o suficiente para atribuir a ambos os complexos. O pico em 207, entretanto, é ausente no espectro do CuAL, revelando que não há ligante Pol envolvido em sua estrutura. Os fragmentos em 314 e 336 foram atribuídos a uma espécie monomérica coordenada com OH e MeOH, e seu sal de sódio, respectivamente.

Figura 4.7 – Espectro de massas de alta resolução do CuPol.

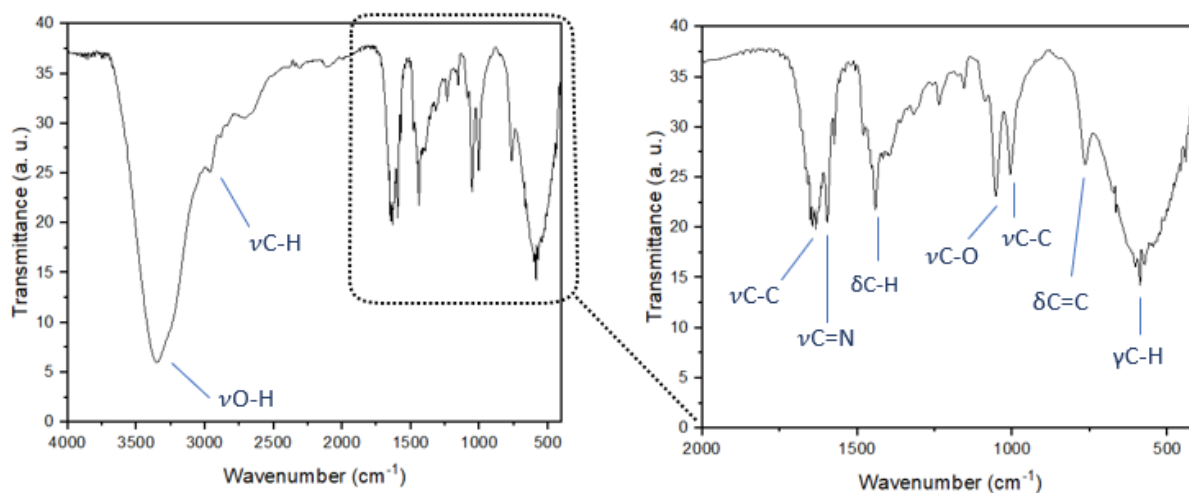


4.1.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho

4.1.3.1 Ligante AL

Tendo em vista a estrutura do ligante AL, em que estão presentes três heteroátomos em ambientes eletrônicos distintos devido à presença de sistemas ressonantes e cadeias saturadas, o espectro do ligante livre foi primeiramente interpretado para atribuição de suas bandas vibracionais características. O espectro obtido para o ligante AL pode ser observado na Figura 4.8 abaixo.

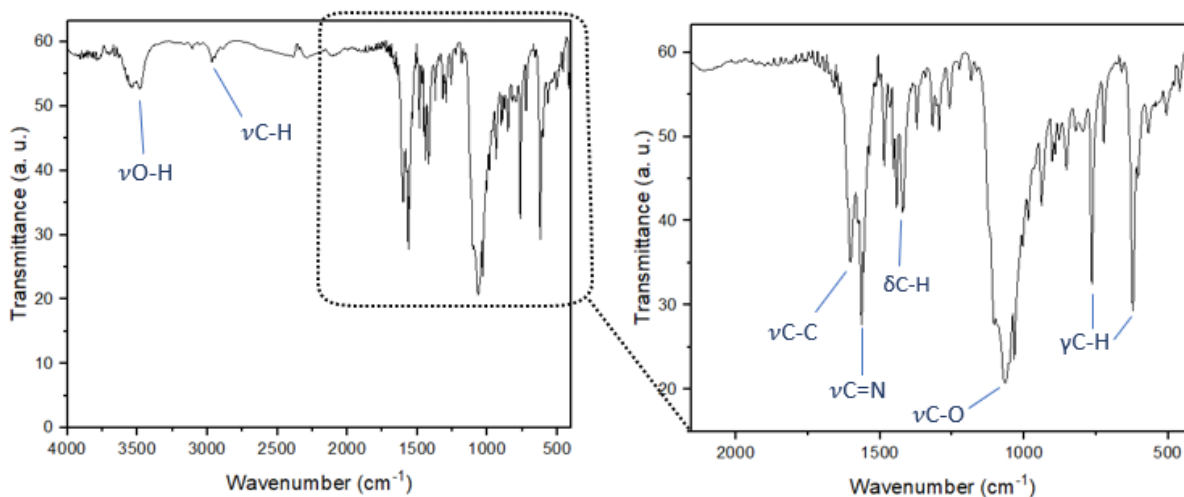
Figura 4.8 – Espectro de infravermelho do ligante AL.



4.1.3.2 Complexo CuAL

O espectro de IR para o complexo CuAL pode ser observado na Figura 4.9. Este foi comparado com o do ligante buscando correlacionar os deslocamentos observados com os sítios de coordenação.

Figura 4.9 – Espectro de infravermelho do CuAL.



Na Tabela 4.1 abaixo há uma proposta de atribuição das bandas vibracionais observadas nos espectros tanto do complexo quanto do ligante.

Tabela 4.1 – Tentativa de atribuição das bandas de IR do CuAL.

Atribuição Proposta	AL		CuAL	
	Intensidade	Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Intensidade	Comprimento de onda (cm ⁻¹)
ν O-H	intensa	3500	fraca	3500
ν C-H	fraca	3000	fraca	3000
ν C=N / anel	moderada	1598	intensa	1604
δ C-H	média	1442	média	1439, 1427
ν C-O	média	1053, 1006	média	1065
γ C-H	média	765	intensa	763
γ C-H	intensa	588	intensa	620

A banda intensa observada em 620 cm⁻¹ para o complexo e em 588 cm⁻¹ para o ligante foi atribuída a vibrações de deformação fora do plano (γ) do anel piridínico, assim como a banda também intensa em 763/765 cm⁻¹ foi atribuída a ν C=C para ambos.⁴⁸ A banda intensa em 1598 cm⁻¹ é atribuída ao alongamento C=N da metilpiridina, cuja diferença pequena em relação à piridina livre pode ser atribuída à substituição no anel. No espectro do complexo, esse deslocamento se torna ainda maior, o que indica uma diminuição da densidade eletrônica no anel piridínico devido à σ -doação do par de elétrons do nitrogênio para o Cu(II), o que aumenta a constante de força efetiva da ligação C=N.

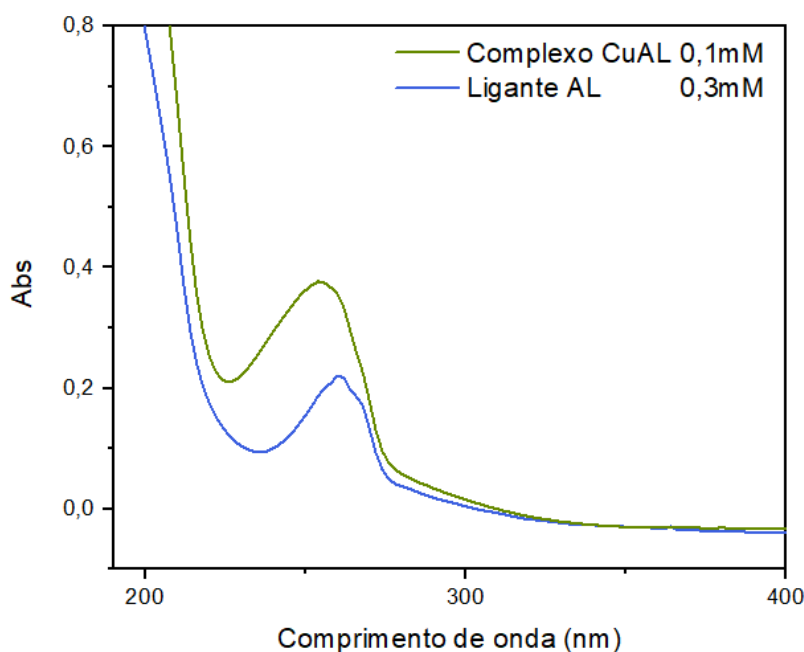
As bandas em torno de 1065/1653 cm⁻¹ foram atribuídas a ν C-O⁴⁹ e as bandas em torno de 1442, 1439 e 1427 cm⁻¹ foram atribuídas a δ C-H⁵¹ para ambos.

As bandas fracas observadas em torno de 3000 cm⁻¹ tanto para o ligante quanto para o complexo são atribuídas aos estiramentos das ligações C-H alifáticas da cadeia pirrolidínica. A banda em torno de ~3500 cm⁻¹ é característica de estiramentos O-H, e como esperado está bastante intensa para o ligante que possui OH na estrutura e é bastante higroscópico. Já no complexo, mostra-se mais baixa, porém ainda presente, provavelmente pelo CuAL não possuir essa característica, além de o OH estar coordenado ao átomo de cobre.

4.1.4 Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível foi empregada como ferramenta para caracterizar o ligante AL e o complexo CuAL, além de investigar suas transições eletrônicas características. Os espectros foram obtidos em solução aquosa utilizando água Milli-Q, a fim de observar adequadamente as bandas de interesse e calcular seus respectivos coeficientes de absorvidade molar. É possível observar um dos espectros obtidos tanto para o complexo quanto para o ligante na Figura 4.10 abaixo.

Figura 4.10 – Espectros de UV-Vis para o AL e o CuAL em solução aquosa.



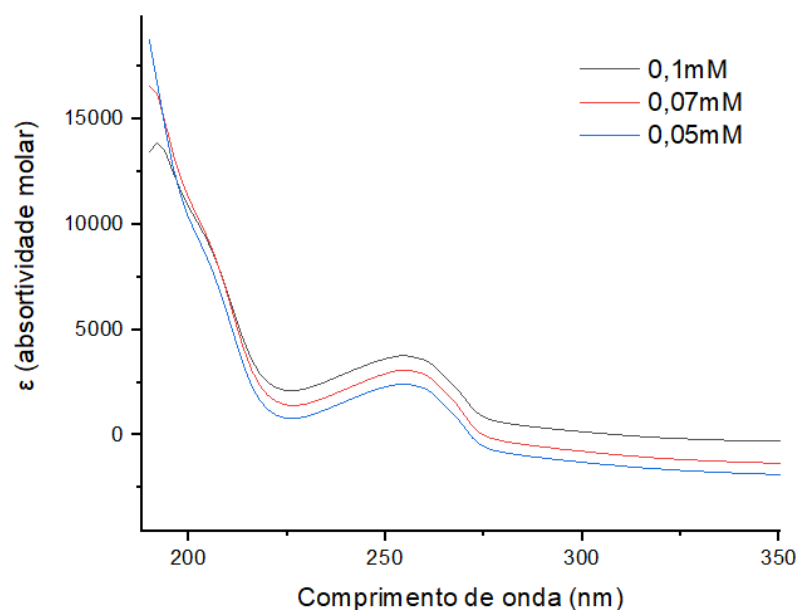
Em ambos os espectros, foi observada parte de uma banda intensa próxima de 200nm no espectro do ligante, que após a coordenação sofre efeito hipsocrômico, se deslocando para próximo de 190 nm no espectro do complexo. Essa banda pode ser apenas parcialmente observada nessas concentrações específicas, uma vez que em concentrações inferiores ela entra no limite inferior de detecção do equipamento, que é a região abaixo de 190 nm, e em concentrações superiores, sua absorbância, que já está extremamente elevada nas concentrações demonstradas na Figura 4.10, sobe ainda mais, não sendo possível sua quantificação adequada. Essa banda foi atribuída a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ de alta energia do sistema aromático conjugado, devendo

apresentar absorvidade molar da ordem de $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, característica de transições permitidas em cromóforos extensamente conjugados.⁴⁷

Também é possível observar que a segunda banda, melhor definida, está em torno de 260nm para o ligante, enquanto que após a coordenação ela se torna mais intensa (efeito hipercrômico) e mais alargada, e se desloca para 254nm. Essas alterações nos espectros corroboram com os comportamentos esperados referentes a coordenação com o átomo de cobre.⁵¹

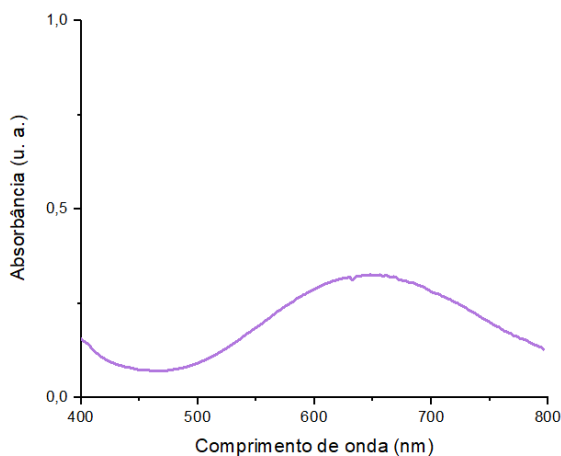
O complexo foi analisado em diferentes concentrações visando calcular o épsilon da banda bem definida em 254 nm, cujos valores de absorbância variaram linearmente com a concentração, com o ajuste linear dos dados resultando em um coeficiente de correlação $R^2 = 0,9989$, o que confirma a aderência à lei de Beer-Lambert na faixa estudada. A absorvidade molar calculada para a banda de 254nm foi de $3.769 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Figura 4.11 – UV-Vis do complexo em soluções aquosas de diferentes concentrações.



Um espectro em alta concentração, onde as bandas em 192 e 254nm não são discerníveis, foi obtido na intenção de observar a banda de transição d-d do Cu(II). É possível observar, na Figura 4.12, uma banda em 648nm, cujo coeficiente de absorvidade molar é de $53,33 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Figura 4.12 – Banda d-d do CuAL em concentração alta.



A presença desta banda representa mais um indicativo da coordenação do átomo de Cu(II) ao ligante, uma vez que átomos metálicos hidratados apresentam bandas d-d em regiões espectrais distintas, e sua intensidade relativamente baixa é típica de transições proibidas por regras de seleção de spin e simetria. Também é possível inferir, pela existência dessa banda, que o cobre apresenta geometria de coordenação de pirâmide de base quadrada distorcida.⁵²

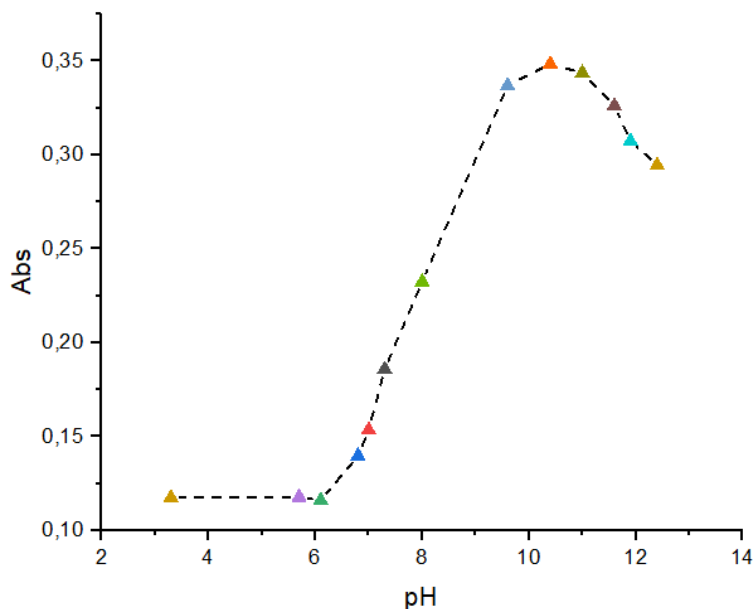
A presença dessa banda no espectro do complexo CuAL confirma a integridade do sistema coordenado, e, junto da banda em 254 nm, evidencia tanto a presença do centro metálico em seu estado de oxidação Cu(II) quanto a manutenção da estrutura eletrônica do ligante após a complexação.

4.1.5 pKa

O pKa dos complexos CuPol e CuAL foi determinado espectrofotometricamente por meio do monitoramento da banda de absorção em função da variação do pH.

As medidas foram realizadas em solução aquosa, variando-se o pH na faixa de 3,0 a 12,4, e os dados foram ajustados utilizando-se o modelo de curva sigmoidal, como pode ser observado na Figura 4.13 abaixo.

Figura 4.13 – Curva de pKa para o CuAL.



Os valores de pKa obtidos para ambos os complexos foram de 7,9, indicando que o equilíbrio ácido-base observado está associado à desprotonação de uma molécula de água coordenada ao centro de Cu(II). Esta atribuição é consistente com a literatura, que reporta valores de pKa na faixa de 7-9 para a água coordenada a complexos de Cu(II) com ligantes nitrogenados e oxigenados.⁵³

De forma alternativa, considerando a presença do grupo $\text{-CH}_2\text{OH}$ no ligante do complexo CuAL, este valor de pKa também poderia ser interpretado como referente à desprotonação de um álcool coordenado. No entanto, álcoois livres apresentam pKa em torno de 16,⁵⁴ sendo, portanto, ácidos muito fracos. A coordenação ao Cu(II), um íon metálico com alta densidade de carga e caráter ácido de Lewis pronunciado, polariza significativamente a ligação O–H do grupo álcool coordenado, facilitando sua desprotonação e reduzindo drasticamente o pKa.⁵⁵ Este efeito de acidificação de ligantes próticos coordenados a metais de transição resulta da retirada de densidade eletrônica do átomo de oxigênio pelo metal, enfraquecendo a ligação O–H e estabilizando a base conjugada.⁵⁵

A partir do valor de pKa determinado, é possível inferir o comportamento das espécies em diferentes faixas de pH. Em valores abaixo de 7,9, o grupo -OH da água coordenada encontra-se majoritariamente protonado, e o complexo existe como

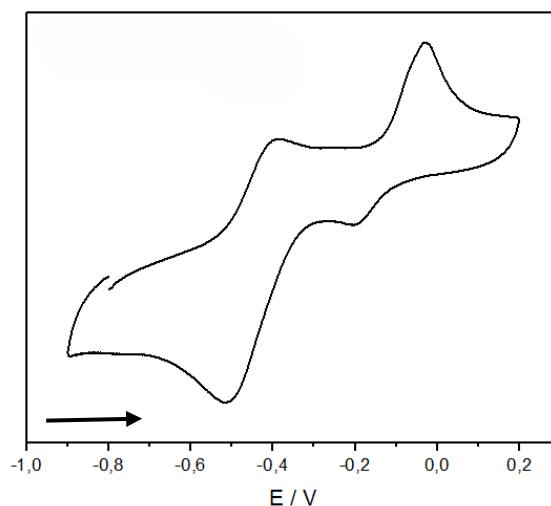
espécie catiônica. Em valores acima de 7,9, ocorre a desprotonação para -O^- , gerando um ligante aniônico (hidroxo ou alcóxido) que confere maior estabilidade ao complexo, o que é bom principalmente para os processos redox que ocorrem em meio básico.

4.1.6 Voltametria Cíclica

Com o objetivo de entender mais sobre os processos envolvidos nos complexos, os testes de voltametria cíclica foram realizados em dois pHs diferentes, sendo o primeiro em tampão carbonato de sódio pH 10,5 e o segundo em tampão HEPES de pH 7,5. Inicialmente, para todos os complexos, partiu-se de uma solução de 1mmol.L^{-1} em tampão contendo também PTBA $0,1\text{ mol.L}^{-1}$, sob atmosfera de argônio. Foram utilizados os eletrodos de Ag/AgCl/KCl ($3,0\text{ mol.L}^{-1}$) como eletrodos de controle e referência, e carbono vítreo para trabalho. O voltamograma então foi obtido aplicando-se a corrente elétrica tanto a partir de valores positivos quanto negativos.

Inicialmente, utilizando o tampão de pH 10,5, aplicou-se corrente elétrica a partir de $-0,8\text{ V}$ até $+0,2$, depois voltou-se para $-0,9\text{ V}$, e fechou-se o ciclo ao voltar para $-0,8\text{ V}$, conforme Figura 4.14.

Figura 4.14 – Voltamograma do CuAL em pH 10,5.



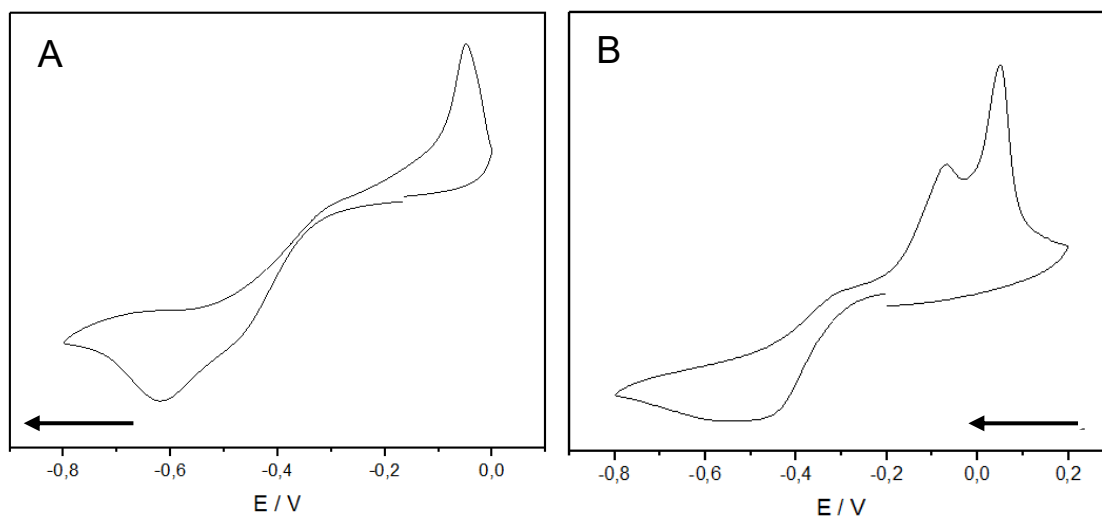
Os picos anódicos observados em $-0,4\text{V}$ e $0,0\text{V}$ correspondem, respectivamente, à oxidação de $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-(OH)}$ para $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-(OH)}$ e a uma possível oxidação em um dos oxigênios coordenados ao complexo, o que pode ou não ser uma espécie $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-oxil}$. Levando em consideração o pH, espera-se que os oxigênios coordenados

(tanto do grupo hidroxila quanto da água) estejam desprotonados.⁵⁶ Os picos catódicos em -0,19 V e -0,51 V mostrariam o efeito contrário, a espécie com radical voltando a ser $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-(OH)}$ e o Cu^{II} sendo reduzida para Cu^{I} em seguida.

Para fins de comparação, e levando em consideração o pKa calculado para os complexos, as voltametrias cíclicas do complexo CuAL e do complexo CuPol foram repetidas em tampão HEPES de pH 7,5, mantendo-se as concentrações anteriores de complexo e do eletrólito suporte, sob atmosfera inerte.

A varredura foi iniciada em -0,2 V, prosseguindo inicialmente para potenciais negativos até -0,8 V, e então invertendo o sentido para potenciais positivos até 0 V, completando-se o ciclo com o retorno ao potencial final de -0,2 V. Os voltamogramas obtidos nesta condição apresentaram perfis distintos daqueles observados em pH 10,5, conforme ilustrado na Figura 4.15 abaixo.

Figura 4.15 – Voltamograma em pH 7,5 para os complexos A) CuPol e B) CuAL



No sentido catódico inicial, para o CuPol observou-se um pico de redução em -0,62 V, atribuído à redução de Cu^{II} para Cu^{I} . O deslocamento deste pico pode ser explicado pela protonação do ligante causada pela mudança de pH.⁵⁷ Após a inversão do sentido da varredura para potenciais positivos, surgiu um pico anódico fino e bem definido em -0,05 V, correspondente à oxidação de Cu^{I} para Cu^{II} . A nitidez deste pico também está relacionada à protonação do ligante em pHs mais baixos.⁵⁸

Para o CuAL, o processo de redução em -0,51V em pH 10,5 que foi atribuído a redução de Cu^{II} para Cu^I não sofreu deslocamento, mas o pico aparece bastante alargado em pH 7,5. Na volta para valores positivos, é possível observar dois processos de oxidação, onde supõe-se que há a oxidação de Cu^I para Cu^{II} e em seguida o braço hidroximetil sofre um processo de oxidação, o que possivelmente degradaria o complexo. Com um pH abaixo do valor de pKa, não seria surpreendente haver a degradação dos complexos e o acúmulo no eletrodo.⁵⁹

A ausência do segundo processo de redução, presente em pH 10,5, e corrobora com a hipótese de que em pH básico, tanto o complexo CuPol quanto CuAL apresentam um comportamento eletroquímico mais estável por conta da desprotonação dos oxigênios coordenados.

A diferença significativa entre os potenciais de redução (-0,62 V) e oxidação (-0,05 V), não caracteriza um perfil simétrico típico de processos reversíveis, e indica que a transferência eletrônica pode gerar processos separados daqueles referentes apenas ao centro de cobre em si, como a formação de espécies radicalares, que é grandemente influenciada pela protonação ou desprotonação de grupos do ligante.

4.1.7 Análise elementar

Analizando comparativamente os valores obtidos para o complexo CuAL, considerando a estrutura final proposta na Figura 3.2 para os dados teóricos e os dados experimentais obtidos na análise, é possível observar uma concordância relativamente satisfatória, principalmente no que tange o carbono e o nitrogênio. As discrepâncias observadas para o hidrogênio, apesar de não estarem dentro da margem de erro experimental aceitável para análise elementar, podem ser atribuídas a fatores como umidade residual, visto que a amostra é extremamente higroscópica, ou variações inerentes ao método. Esses dados podem ser observados na Tabela 4.2 abaixo:

Tabela 4.2 – Valores de análise elementar obtidos para o CuAL

Valores	%C	%H	%N	%S
Teórico	51,95	5,93	10,99	0
Experimental	51,93	7,02	10,86	0

Considerando os demais resultados experimentais, que corroboram a estrutura proposta para o complexo, considerou-se que a variação no H é negligenciável, e que a síntese foi efetiva.

4.1.8 Ressonância Paramagnética Eletrônica

Visando a obtenção de mais informações sobre a estrutura molecular e os mecanismos de ação dos complexos biomiméticos sintetizados, foram realizadas medidas utilizando a técnica de EPR tanto para o complexo CuAL como para o CuPol.

A técnica, também conhecida como Ressonância de Spin Eletrônico (RSE), é uma técnica espectroscópica seletiva para a detecção de espécies que possuem elétrons desemparelhados, como radicais livres, átomos de metais de transição e defeitos em sólidos. Ela se baseia na interação entre os momentos magnéticos desses elétrons e uma radiação eletromagnética na faixa de micro-ondas, aplicada sob a influência de um campo magnético externo variável. O resultado é um espectro de absorção de micro-ondas que fornece informações detalhadas sobre o ambiente químico e magnético local dessas espécies paramagnéticas, incluindo dados sobre concentração, níveis de energia, simetria local e interações entre spins eletrônicos e nucleares.⁶⁰

Essa técnica é particularmente relevante para o estudo de complexos de cobre(II), uma vez que esses possuem configuração d^9 , ou seja, há um elétron desemparelhado, o que os torna os candidatos perfeitos. A análise dos espectros fornece o fator g e a constante de acoplamento hiperfino, que revelam a simetria do complexo, a geometria do sítio metálico (octaédrica distorcida ou quadrado-planar) e a covalência das ligações, sendo fundamental para estudos de coordenação, bioinorgânica e catálise, como pode ser observado na literatura.⁶¹⁻⁶⁴

As análises foram feitas em solução tampão de carbonato de sódio pH 10,5, tanto em temperatura ambiente (293K) quanto congelado (77K) em nitrogênio líquido.

Foram realizados diversos testes incluindo peróxido de hidrogênio, envolvido no mecanismo de ação do catalisador, e DMPO (5,5-Dimetil-1-pirrolina-N-óxido), uma substância amplamente utilizada na detecção de radicais livres para a técnica de EPR. Os espectros obtidos para o CuAL constam na Figura 4.16, e para o CuPol constam na Figura 4.17.

FIGURA 4.16 – Dados de EPR para o CuAL em nitrogênio líquido (A) e em temperatura ambiente (B).

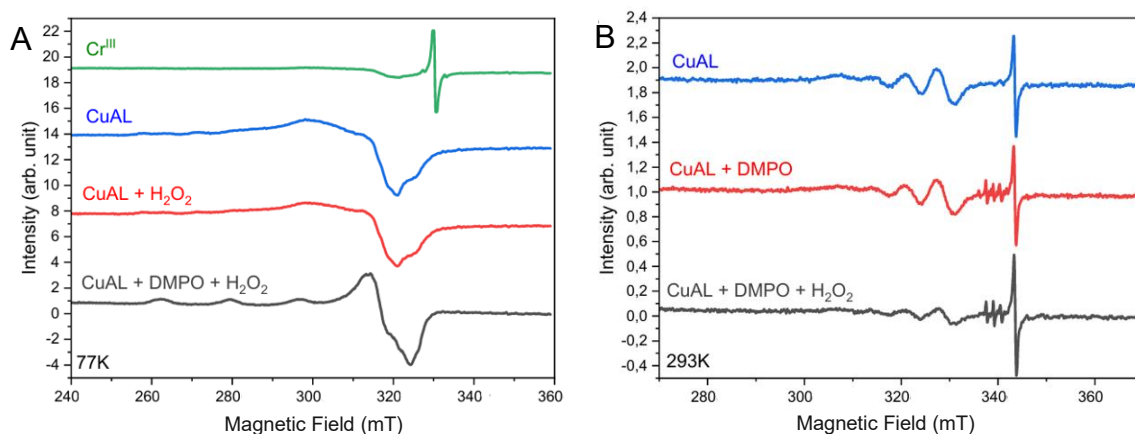
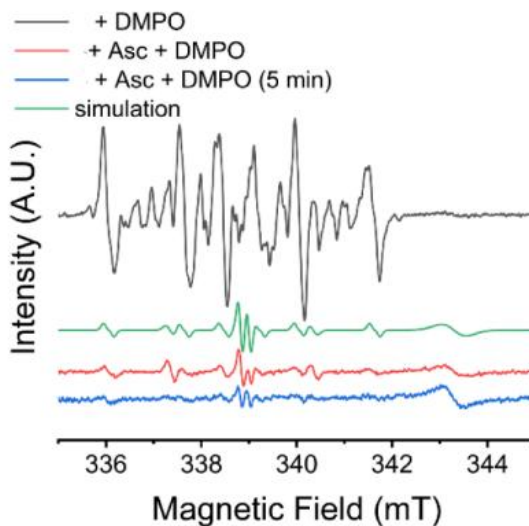


Figura 4.17 – Espectro de EPR para o CuPol (293K).



Os dados obtidos revelaram comportamentos distintos entre os dois complexos. No caso do CuPol, verificou-se a presença de uma quantidade significativa de radicais de carbono, que se supõe que sejam estabilizados pela coordenação ao centro de Cu(II), possivelmente através de um mecanismo de tautomerização seguido de oxidação do ligante prolina, o que mimetiza o mecanismo de *hole-hopping* proposto para as LPMOs.⁴² Em contraste, o CuAL sob condições

experimentais análogas de concentração e pH apresentou uma formação bastante inferior de espécies radicalares. Essa diferença drástica sugere que a pequena diferença na estrutura do ligante é um fator crucial para sua capacidade de estabilizar radicais. Enquanto o CuPol possui um braço de ácido carboxílico que favorece a deslocalização de elétrons e a formação de radicais no anel piridínico e no anel pirrolidínico, o álcool primário no CuAL parece não oferecer o mesmo nível de estabilização, inibindo a geração e/ou o acúmulo dessas espécies.

A baixa propensão do CuAL em formar radicais centrados no ligante pode ser explicada com base em sua estrutura mononuclear em soluções básicas, como já discutido previamente na sessão de voltametria cíclica. Diferente do CuPol, que no estado sólido forma polímeros de coordenação unidimensionais, mas que em solução acredita-se que seja monomérico e ainda assim capaz de gerar radicais, o CuAL não apresenta evidências de processos de agregação ou acoplamento que pudessem resultar em espécies silenciosas no EPR ou radicais estáveis.

Essa grande diferença na formação radicais entre os dois complexos tem influência direta em seus mecanismos de reação, o que, junto dos dados experimentais discutidos previamente, sugere que o CuPol seja mais propenso a possuir a mecanismos de proteção contra o dano oxidativo, mas também seja provavelmente mais reativo em processos que dependem de intermediários radicalares, enquanto o CuAL deve operar por uma via catalítica distinta.

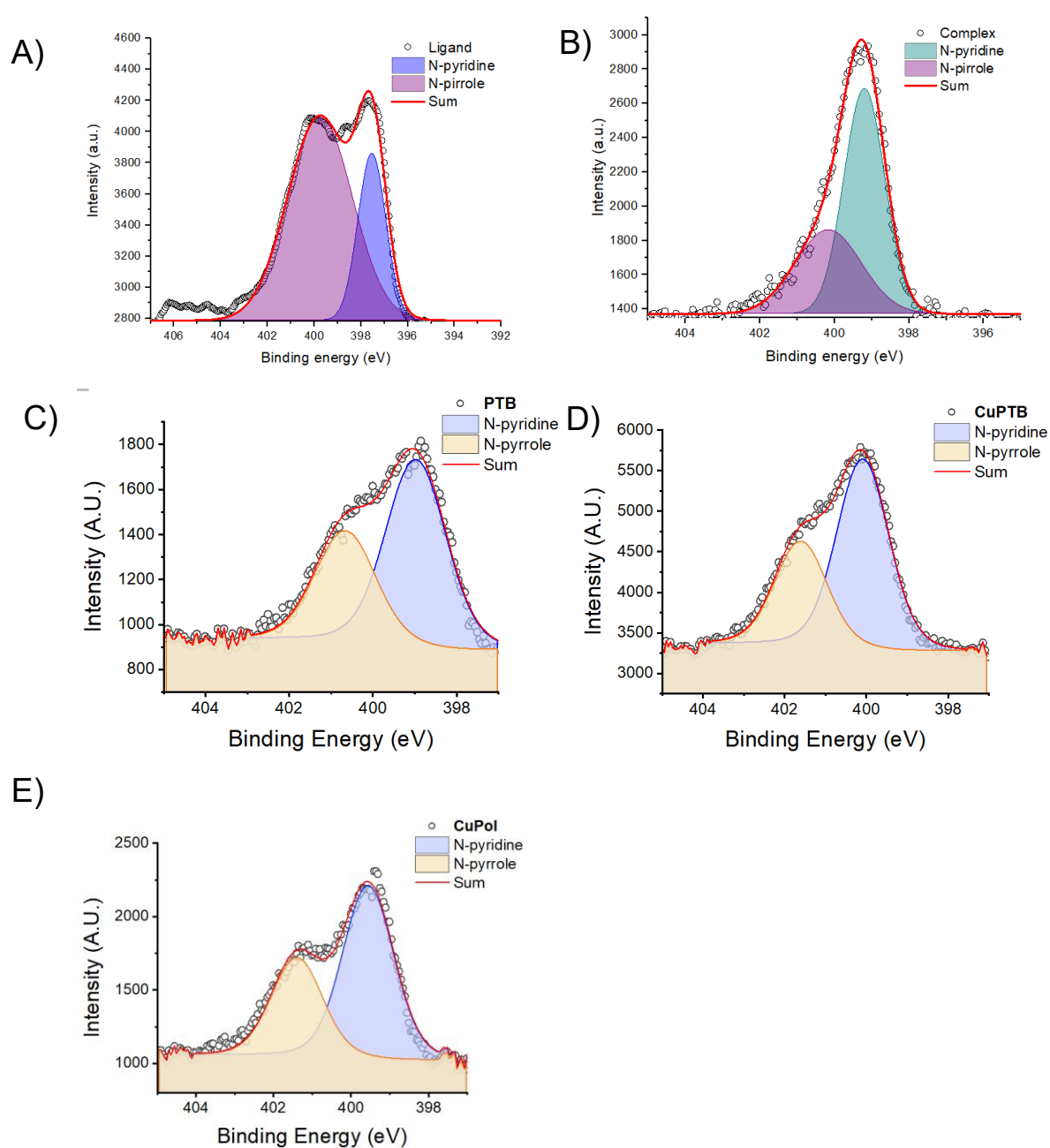
4.1.9 XPS

A técnica de XPS foi empregada para investigar os estados de oxidação do centro metálico e, principalmente, as alterações na densidade eletrônica dos átomos doadores do ligante após a complexação com o cobre. A análise foi realizada em amostras sólidas dos ligantes livres AL e PTB, e dos respectivos complexos CuAL, CuPTB e CuPol, permitindo a comparação direta dos efeitos da coordenação sobre as energias de ligação dos elétrons mais internos dos átomos de nitrogênio, carbono e oxigênio presentes nas estruturas

4.1.9.1 N1s

Os espectros obtidos para o orbital 1s do nitrogênio estão apresentados na Figura 4.18, onde é possível observar deslocamentos nas energias de ligação.

Figura 4.18 - Espectros de XPS na região N1s para os ligantes livres e seus respectivos complexos de cobre. A) AL; B) CuAL; C) PTB; D) CuPTB e E) CuPol.



A análise dessa região demonstrou mudanças significativas nas energias de ligação dos átomos de nitrogênio após a complexação, confirmando sua participação na coordenação ao centro metálico. Para o ligante AL livre, os picos correspondentes aos nitrogênios dos anéis piridina e pirrol foram observados em 397,6 eV e 399,7 eV, respectivamente. Após a complexação, formando o CuAL, observou-se um deslocamento desses picos para valores mais elevados de energia de ligação: 399,2 eV para o N-piridina e 400,1 eV para o N-pirrol. Este deslocamento para maiores energias é indicativo de uma diminuição na densidade eletrônica ao redor dos átomos de nitrogênio, consistente com a doação de densidade eletrônica dos sítios doadores para o centro metálico vazio do Cu(II), fortalecendo a ligação coordenada.

Um resultado semelhante foi observado para o complexo CuPTB quando comparado ao ligante PTB livre. No ligante PTB, as energias de ligação para os nitrogênios piridina e pirrol foram de 399 eV e 401 eV, respectivamente. No complexo CuPTB, estes valores deslocaram-se para 400 eV (N-piridina) e 401,8 eV (N-pirrol), novamente indicando a coordenação destes átomos ao centro metálico e a consequente redução da densidade eletrônica sobre os mesmos. Um aspecto interessante observado nos dados refere-se à comparação entre os complexos.

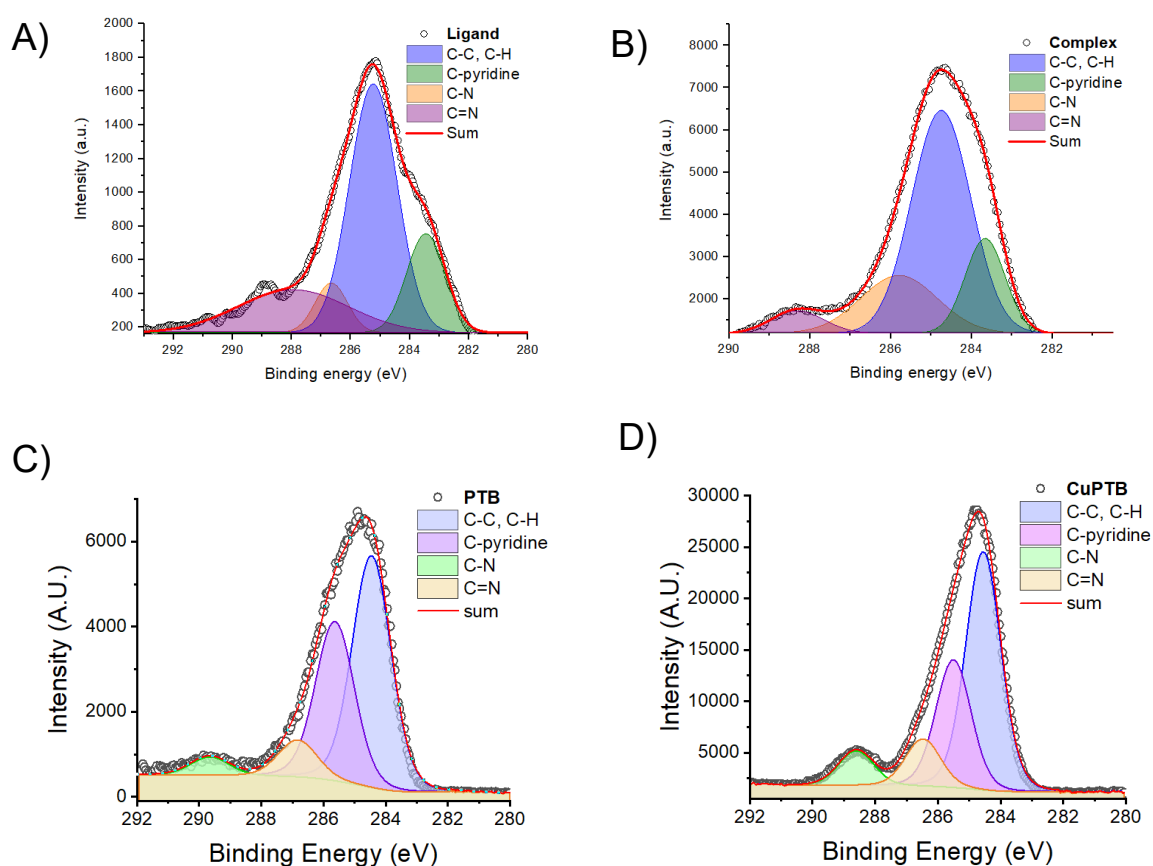
O CuAL apresentou valores de energia de ligação ligeiramente menores (399,2 eV para N-piridina e 400,1 eV para N-pirrol) em comparação ao CuPTB (400 eV e 401,8 eV) e ao CuPol (399 eV e 401,5 eV). Esta diferença sugere que, no CuAL, a coordenação ao centro metálico é um pouco menos forte que nos demais. Isso implicaria em uma menor transferência de densidade eletrônica do ligante para o metal, resultando em energias de ligação menos deslocadas para valores mais altos. Esse dado é particularmente relevante quando correlacionado com os testes catalíticos, nos quais o CuAL destaca-se como o complexo mais ativo, sugerindo que uma interação metal-ligante mais moderada pode ser mais favorável para a atividade catalítica do que ligações extremamente fortes ou muito fracas, possivelmente por facilitar a labilidade necessária para a coordenação de substratos ou participação em ciclos redox.

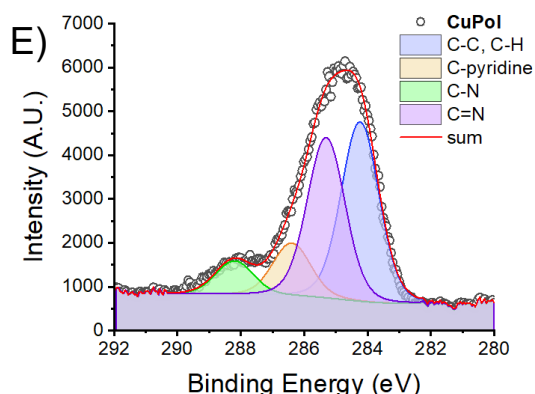
4.1.9.2 C1s

Diferentemente do observado para os nitrogênios, cujas energias de ligação aumentaram após a coordenação indicando doação de densidade eletrônica para o metal, os carbonos apresentaram um comportamento oposto, com deslocamentos para valores menores de energia de ligação nos complexos em comparação aos ligantes livres, conforme observado na Figura 4.19.

Para o ligante AL livre, os picos característicos foram observados em 283,4 eV para carbonos de anéis piridínicos, 286,6 eV para carbonos ligados a nitrogênio e 288,0 eV para carbonos de ligações C=N. Após a complexação, formando o CuAL, estes valores deslocaram-se para 283,6 eV, 285,8 eV e 288,3 eV, respectivamente.

Figura 4.19 – Espectros de XPS na região C1s para os ligantes livres e seus respectivos complexos de cobre. A) AL; B) CuAL; C) PTB; D) CuPTB e E) CuPol.





Observa-se que, com exceção do C=N que sofreu um pequeno aumento, os demais carbonos apresentaram redução nas energias de ligação, indicando um aumento na densidade eletrônica ao redor destes átomos.

Novamente, um resultado semelhante foi observado para o sistema PTB. No ligante PTB livre, as energias de ligação foram de 285,7 eV (C-piridina), 286,8 eV (C-N) e 289,6 eV (C=N). No complexo CuPTB, estes valores diminuíram para 285,5 eV, 286,5 eV e 288,6 eV, respectivamente. Outra vez observa-se uma redução generalizada nas energias de ligação dos carbonos após a coordenação ao cobre.

Este comportamento pode ser explicado por um fenômeno de retrodoação eletrônica do centro metálico para o ligante. Após a coordenação, o átomo de Cu(II), que possui elétrons em orbitais d preenchidos, pode doar densidade eletrônica para orbitais π^* antiligantes presentes nos sistemas insaturados do ligante, particularmente nos anéis aromáticos e grupos C=N. Esse fenômeno, conhecido como retrodoação π , aumenta a densidade eletrônica sobre a estrutura do ligante, tornando os átomos de carbono mais blindados em relação ao núcleo. Como consequência, os elétrons 1s dos carbonos tornam-se mais disponíveis e, portanto, requerem menor energia para serem ejetados, o que explica os deslocamentos para valores menores de energia de ligação observados experimentalmente.

Comparando os diferentes complexos, observa-se que o CuAL apresentou os menores valores de energia de ligação para os carbonos C-piridina (283,6 eV) e C-N (285,8 eV) entre os três complexos analisados, enquanto o C=N (288,3 eV) foi intermediário entre o CuPol e o CuPTB. Esta tendência sugere que a retrodoação eletrônica é mais pronunciada no CuAL, especialmente sobre os carbonos dos anéis e aqueles ligados a nitrogênio, o que pode estar relacionado à maior atividade catalítica deste complexo. A capacidade do centro metálico de doar densidade eletrônica para o ligante pode influenciar propriedades como a basicidade dos sítios

doadores, a labilidade da coordenação e a facilidade de participação em ciclos redox, fatores todos relevantes para a atividade catalítica dos complexos.

4.1.9.3 O1s

A região O1s dos espectros de XPS foi analisada para os complexos CuAL e CuPol, buscando-se identificar possíveis alterações nos átomos de oxigênio presentes nas estruturas ou em contra-íons. Para o complexo CuPTB, a análise desta região não se mostrou relevante uma vez que sua estrutura não contém átomos de oxigênio coordenados ao centro metálico, consistente com a natureza do ligante PTB.

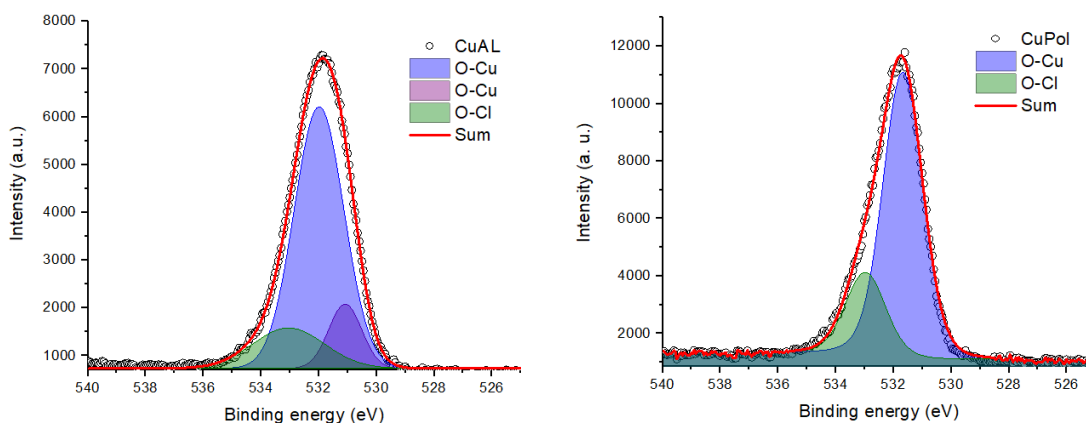
Diferentemente do observado para as regiões N1s e C1s, cujos deslocamentos forneceram informações claras sobre os efeitos da coordenação, os dados obtidos para o oxigênio mostraram-se menos informativos, com valores de energia de ligação muito próximos entre si e dentro de uma faixa esperada para espécies oxigenadas coordenadas ou não-coordenadas.

Para o complexo CuAL, foram identificados dois picos na região O1s: um em 532 eV e outro em 533 eV. O pico em 532 eV pode ser atribuído a átomos de oxigênio diretamente coordenados ao centro metálico, enquanto que o pico em 533 eV é característico de oxigênios em ambientes químicos distintos, como aqueles presentes em contra-íons não-coordenados ou em interações secundárias, como ligações de hidrogênio.

Para o complexo CuPol, observaram-se picos em 531,7 eV e 533 eV, com valores bastante próximos aos do CuAL. O pico em 531,7 eV, ligeiramente inferior ao do CuAL, pode ser relacionado à diferença estrutural entre ambos, ou mesmo a margem de erro de leitura. O pico em 533 eV, idêntico ao observado para o CuAL, sugere a presença de espécies oxigenadas semelhantes em ambos os complexos, provavelmente relacionadas ao contra-íon perclorato que está presente em ambos os complexos.

No geral, os dados de O1s servem principalmente como confirmação da presença das espécies esperadas, sem contribuir significativamente para a elucidação das diferenças estruturais entre os complexos estudados. Os espectros desses complexos podem ser observados na Figura 4.20 abaixo.

Figura 4.20 – Espectros de XPS de O1s para o CuPol e o CuAL.



4.2 Estudos Mecanísticos

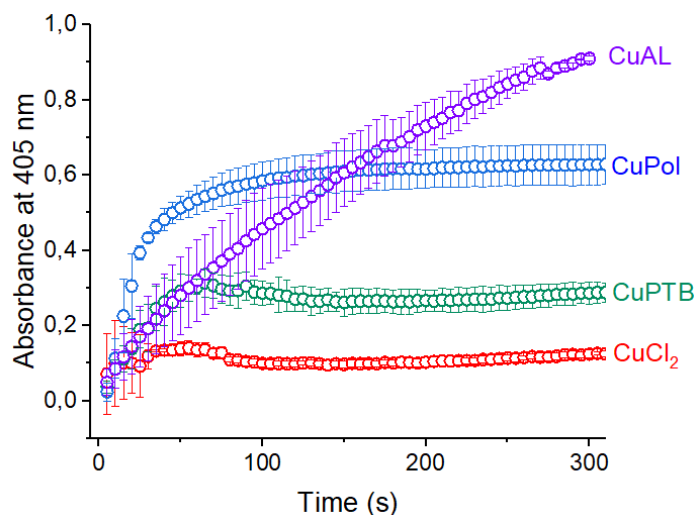
4.2.1 Correlação estrutura-atividade nos complexos avaliados

4.2.1.1 Teste de atividade catalítica

A atividade catalítica dos complexos de cobre analisados, CuAL, CuPol e CuPTB, foi inicialmente verificada por meio da reação de degradação do 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo. A escolha desse substrato baseia-se na sua similaridade estrutural com a celobiose, que o torna um modelo adequado para avaliar a capacidade dos complexos de clivagem de ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. A reação foi monitorada espectrofotometricamente a 405 nm, acompanhando a formação do íon p-nitrofenolato em solução tampão de pH 10,5, que faz com que esse íon tenha cor amarela intensa, gerado após a quebra da ligação.

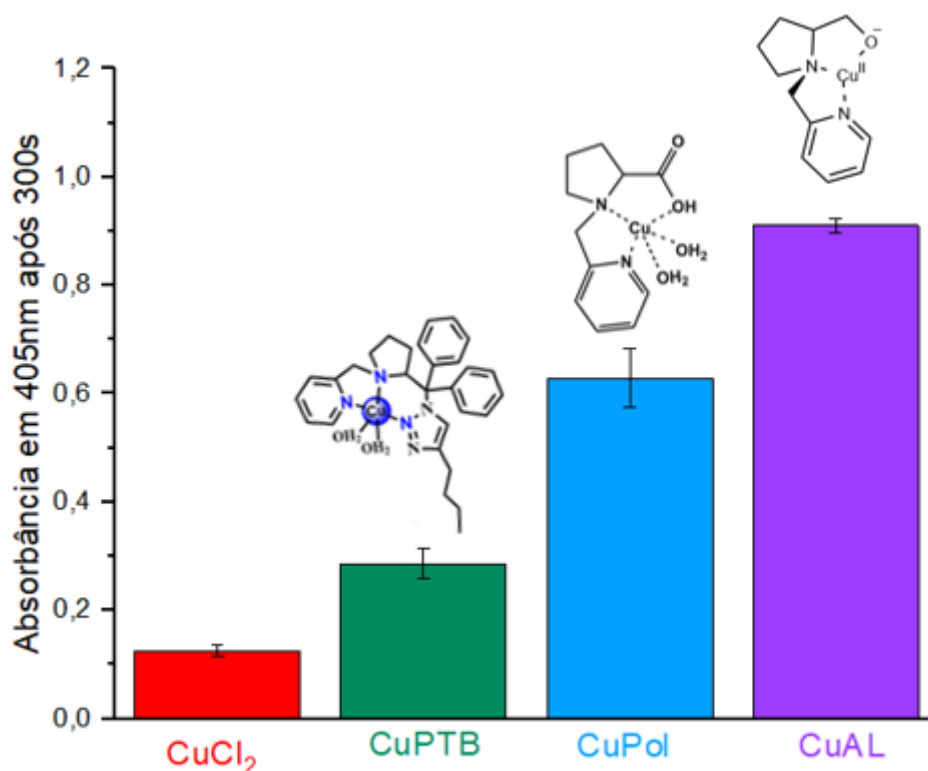
Os perfis cinéticos da reação para os complexos, bem como para o sal de cobre utilizado como controle (CuCl_2), estão apresentados na Figura 4.21.

Figura 4.21 – Hidrólise do 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo catalisada pelos complexos de cobre e pelo controle CuCl_2 , na presença de H_2O_2 .



É possível observar que o CuAL está em condições de não saturação pelo substrato, diferente dos outros complexos, que estão em condições de saturação. Também é possível inferir que o CuAL possui uma cinética de reação mais lenta que os demais catalisadores testados, uma vez que ele só supera os valores de absorbância dos demais após certo tempo de reação. Antes de 50s, a concentração de íon p-nitrofenolato em solução é inferior aos demais, e só se torna superior à do CuPol após 150 segundos. Para uma melhor visualização comparativa, a absorbância final após 300 segundos de reação para cada complexo foi comparada na Figura 4.22.

Figura 4.22– Absorbância final para os diferentes sistemas catalíticos avaliados.



Os resultados obtidos nesta análise demonstraram que todos os complexos testados apresentaram algum grau de atividade catalítica quando comparados ao controle (CuCl₂), que exibiu absorbância próxima de 0,1. Esse baixo valor para o sal de cobre livre indica que o Cu²⁺, por si só, na ausência de um ligante adequado, possui capacidade limitada para promover a clivagem da ligação glicosídica nas condições empregadas, de pH alcalino e presença de H₂O₂.

Ainda assim, os complexos coordenados apresentaram desempenhos distintos do CuCl₂ e entre si, evidenciando a importância da estrutura do ligante na modulação da atividade catalítica do centro metálico.

O complexo CuPTB apresentou a menor atividade entre os complexos testados, com absorbância abaixo de 0,3. Este valor é apenas marginalmente superior ao do controle CuCl₂, indicando baixa eficiência catalítica. A fraca performance do CuPTB sugere que a configuração do ligante PTB pode estar gerando um complexo estericamente impedido que é desfavorecido para a catálise. Dentre todas as possibilidades, essa hipótese foi a que pareceu mais plausível, e o que inspirou o *design* e a síntese dos demais catalisadores deste estudo.

Em contraste, o complexo CuPol apresentou atividade catalítica considerável, com absorbância final em torno de 0,7. Embora inferior à do CuAL, esse resultado é expressivamente superior ao do controle e ao do CuPTB, o demonstra que a estrutura

mais simples e estericamente desimpedida do ligante é capaz de gerar um catalisador funcional, bastante similar ao CuAL.

O complexo CuAL destacou-se significativamente em relação aos demais, alcançando uma absorbância próxima de 1,0 ao final dos 300 segundos de reação, um valor que sugere alta eficiência catalítica. A rápida formação do íon p-nitrofenolato indica também que o ambiente químico proporcionado pelo braço hidroximetila do ligante AL possivelmente favorece a interação com o agente oxidante ou mesmo o substrato, facilitando a clivagem da ligação $\beta(1\rightarrow4)$.

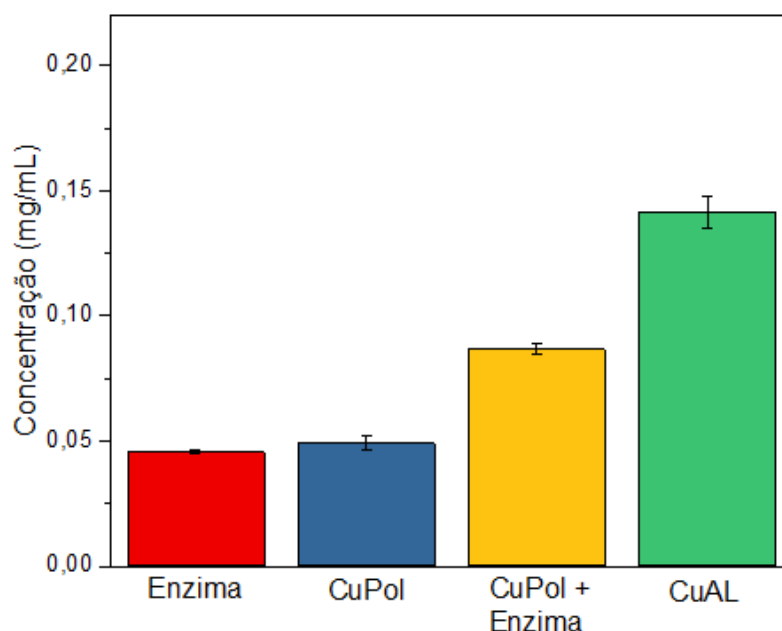
A adição do H_2O_2 ao meio reacional se dá pela suposição de que a catálise deve ocorrer via espécies reativas de oxigênio (ERO), possivelmente radicais hidroxila ($\bullet OH$), gerados a partir de uma reação envolvendo o centro de Cu(II) dos catalisadores. Supõe-se que o ligante AL esteja estabilizando estados de oxidação intermediários ou facilitando a aproximação do substrato ao sítio ativo do complexo, de forma diferente do grupo carboxila do ligante Pol.

4.2.1.2 Atividade celulolítica total

A capacidade dos complexos de cobre em degradar um substrato mais complexo foi avaliada utilizando papel filtro como fonte de celulose. A quantificação baseou-se na redução do DNS pelos açúcares redutores liberados durante a hidrólise da celulose, conforme explicado detalhadamente na seção de metodologia.

Os experimentos foram conduzidos na ausência de peróxido de hidrogênio, diferentemente dos ensaios anteriores com o substrato PNp, no objetivo de investigar a capacidade intrínseca dos complexos em promover a hidrólise direta das ligações glicosídicas da celulose. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 4.23, mostraram diferenças significativas entre os sistemas testados.

Figura 4.23 – Resultados obtidos para o teste de DNS em diferentes sistemas.



Foi feito, à título de comparação, um teste com extrato enzimático do fungo *L. theobromae* nas condições alcalinas do ensaio, que apresentou uma liberação de açúcares redutores inferior a 0,05 mg/mL. Este resultado era esperado, uma vez que a maioria das celulasas fúngicas ou bacterianas convencionais possui pH ótimo de atuação na faixa entre pH 4,5 e 6,0. O pH alcalino do tampão, de 10,5, provavelmente inativa a enzima, confirmando que a baixa atividade observada neste controle é devida à hidrólise química espontânea ou a algum artefato do método, e não à ação enzimática propriamente dita.

O complexo CuPol sozinho apresentou atividade ligeiramente superior ao controle, com uma liberação de 0,05 mg/mL de equivalentes de glicose. Este valor, embora baixo, sugere que o complexo CuPol possui uma capacidade intrínseca limitada de interagir com a celulose insolúvel e promover a clivagem de ligações glicosídicas, mesmo na ausência de um agente oxidante externo. O mecanismo pode envolver uma hidrólise nucleofílica facilitada pelo centro metálico ou uma interação fraca que desestabiliza a estrutura da celulose, expondo suas fibras. Como observado no teste anterior, o Cu^{2+} por si só já demonstra uma baixa, porém perceptível, atividade catalítica.

Um resultado particularmente interessante foi observado na condição que combinou o CuPol com a enzima. Neste sistema, a liberação de açúcares redutores atingiu cerca de 0,10 mg/mL, um valor que é superior à soma das atividades individuais do CuPol e da enzima sozinha. Esse aumento sugere um possível efeito sinérgico entre o complexo metálico e a enzima celulolítica. Uma hipótese para

explicar este fenômeno é que o complexo CuPol, mesmo em pH alcalino, possa atuar como um agente desorganizador da estrutura cristalina da celulose, tornando as fibras mais acessíveis à ação hidrolítica da enzima. Alternativamente, o complexo poderia estar protegendo a enzima da desnaturação alcalina ou atuando em conjunto com resquícios de atividade enzimática para promover a hidrólise. Este resultado abre perspectivas interessantes para o uso de complexos metálicos como auxiliares em processos de degradação enzimática, mesmo em condições não-ótimas para as enzimas, o que pode ser explorado em trabalhos posteriores.

O resultado mais interessante desse teste foi de longe o do complexo CuAL, que promoveu a liberação de aproximadamente 0,15 mg/mL de equivalentes de glicose. Este valor é superior aos demais sistemas testados neste pH, incluindo a combinação do CuPol com a enzima. A maior atividade do CuAL na ausência de peróxido de hidrogênio é notável por diversos motivos.

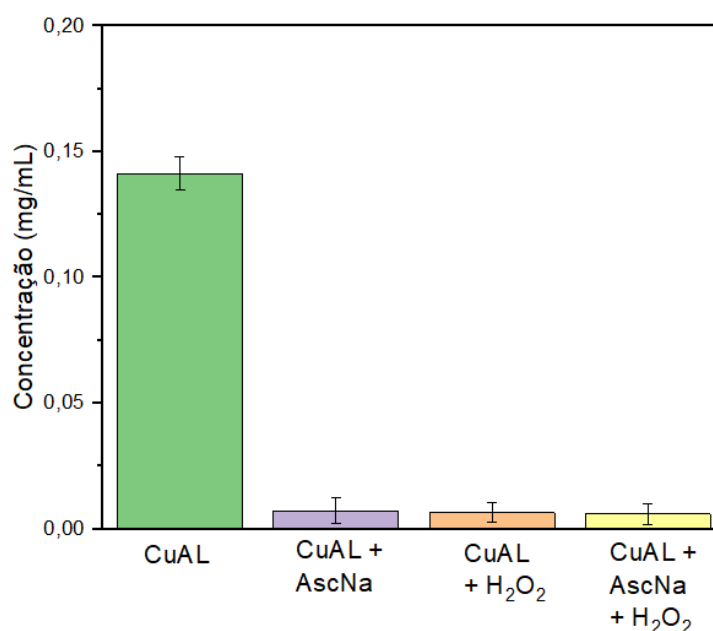
Primeiramente, pois diferentemente do ensaio com PNp, nesse teste o complexo atuou sozinho. Isso sugere que o CuAL pode operar por dois ou mais mecanismos distintos, ou que sua estrutura eletrônica e geométrica é particularmente favorável para a hidrólise direta da celulose. Uma hipótese sobre esse comportamento é que ele poderia ser explicado por uma capacidade de coordenar e ativar moléculas de água por parte do complexo CuAL, gerando espécies nucleofílicas ou promovendo uma catálise ácida de Lewis sobre o oxigênio glicosídico. Torna-se então necessário um estudo mais aprofundado do mecanismo de funcionamento deste complexo na ausência de agentes oxidantes.

A capacidade de liberar uma quantidade significativa de açúcares a partir de um substrato sólido e recalcitrante como o papel filtro demonstra que o CuAL também possui aplicabilidade prática promissora para a degradação de materiais lignocelulósicos mais complexos, um passo importante visando aplicações biotecnológicas.

Diante da expressiva atividade exibida pelo complexo CuAL na hidrólise do papel filtro na ausência de qualquer agente externo, buscou-se investigar o efeito da adição de peróxido de hidrogênio, de ascorbato de sódio e da combinação de ambos sobre o desempenho catalítico do complexo. Em todas as condições testadas, no entanto, a concentração de açúcares redutores liberados a partir do papel filtro foi nula, não sendo detectada qualquer absorbância significativa pelo método DNS. Este resultado contrasta fortemente com a atividade de aproximadamente 0,15 mg/mL

obtida para o CuAL sozinho nas mesmas condições, indicando que a adição desses agentes não apenas deixou de potencializar a reação, como também inibiu completamente a atividade catalítica do complexo, conforme mostrado na Figura 4.24.

Figura 4.24 – Comparação dos resultados obtidos para o CuAL isolado e com a adição de diferentes agentes oxidantes.



A ausência total de atividade na presença de peróxido de hidrogênio e de ascorbato de sódio sugere que as condições reacionais e a natureza do substrato podem influenciar significativamente a eficiência catalítica do complexo, indicando que o mecanismo de ação do CuAL sobre substratos solúveis pode envolver predominantemente vias oxidativas, enquanto para a celulose insolúvel outras formas de interação parecem ser mais relevantes.

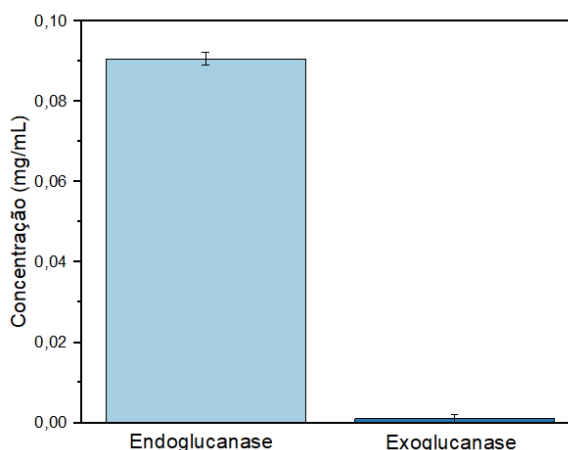
4.2.1.3 Atividade de endoglucanase

A atividade específica para endoglucanase foi avaliada utilizando CMC como substrato, conforme especificado na seção de metodologia. Os resultados obtidos para o complexo CuAL revelaram uma liberação de açúcares redutores equivalente a 0,09 mg/mL, indicando que o complexo foi capaz de promover a hidrólise do substrato e apresentar atividade detectável sobre a carboximetilcelulose.

A detecção de atividade neste ensaio demonstrou que o complexo CuAL consegue manter sua capacidade catalítica sobre um substrato solúvel derivado da celulose, com atividade similar àquela obtida para o papel filtro nos ensaios anteriores. Essa diferença pode estar relacionada à natureza do substrato utilizado, já que a carboximetilcelulose é um polímero modificado com grupos carboximetila, cuja interação com o centro metálico pode ser diferente da interação com a celulose não modificada do papel filtro, possivelmente afetando a eficiência da catálise.

Em contraste com os resultados obtidos para a carboximetilcelulose, um teste adicional realizado com celulose cristalina (Avicel®) como substrato, visando avaliar a presença de atividade de exoglucanase, exibiu resultados completamente negativos, não sendo detectada qualquer liberação de açúcares redutores, conforme Figura 4.25.

Figura 4.25 – Teste de atividade de endoglucanase e exoglucanase para o CuAL.



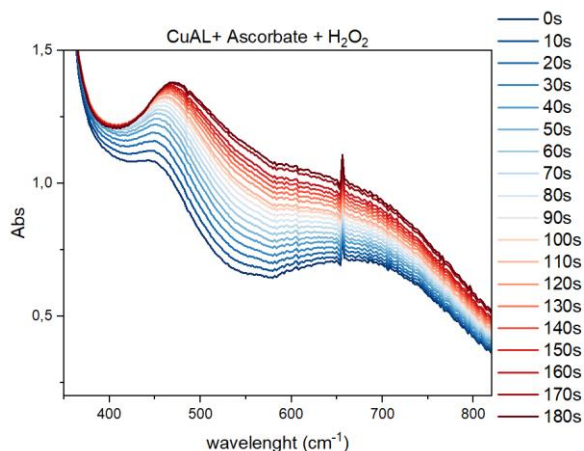
Os resultados obtidos indicam uma possível incapacidade do CuAL em atacar as regiões cristalinas da celulose, atuando preferencialmente sobre substratos amorfos ou mais acessíveis como o CMC e o papel filtro. Este comportamento é análogo ao das enzimas endoglucanases, que iniciam a degradação da celulose em pontos internos das cadeias amorfas.

4.2.2 Formação de Radicais

Para investigar o mecanismo pelo qual o complexo CuAL exerce sua atividade catalítica, especialmente nos ensaios onde a presença de peróxido de hidrogênio se mostrou benéfica para a degradação do substrato modelo PNP, realizou-se um estudo por espectroscopia UV-Vis. A hipótese levantada foi a formação de uma espécie radicalar do tipo cobre-oxil, caracterizada por um centro de cobre em alto estado de oxidação com um ligante oxigenado radicalar, similar a intermediários reativos encontrados em metaloenzimas que atuam na oxidação de ligações C-H.

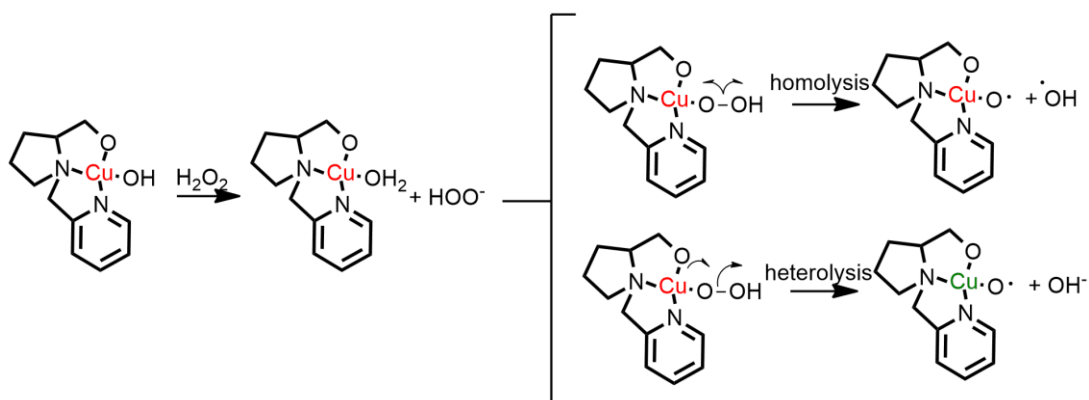
Para testar esta hipótese, o complexo CuAL foi incubado com ascorbato de sódio e peróxido de hidrogênio, e o espectro de absorção foi monitorado em busca de alterações significativas. Os resultados revelaram o surgimento de uma nova banda de absorção na região entre 560 e 610 nm, ausente no espectro do complexo isolado, demonstrada na Figura 4.26. A determinação precisa do máximo desta banda é dificultada pela sobreposição com outras transições presentes na mesma região espectral, o que torna sua atribuição um desafio.

Figura 4.26 – Banda identificada no espectro de UV-Vis.



A formação dessa banda apenas na presença de ascorbato de sódio e peróxido de hidrogênio sugere fortemente a geração de uma espécie reativa intermediária. O ascorbato atuaria reduzindo o centro de Cu(II) a Cu(I), facilitando sua reação com o peróxido de hidrogênio e levando à clivagem da ligação O-O e à formação de uma espécie radicalar do tipo cobre-oxil, o que poderia ocorrer de forma homolítica ou heterolítica, conforme esquematizado na Figura 4.27.

Figura 4.27 – Esquema de formação do cobre-oxil.



Com base nessa estrutura proposta, buscou-se realizar estudos adicionais para tentar confirmar a natureza dessa espécie formada e elucidar os detalhes do mecanismo nesse contexto. Dessa forma, realizaram-se experimentos de EPR utilizando DMPO como agente de captura de spin. As simulações dos espectros obtidos indicaram a presença de diferentes espécies paramagnéticas. Primeiramente, foi identificado o radical hidroxila, característico de sistemas do tipo Fenton em que ocorre a clivagem homolítica do peróxido de hidrogênio.

Além deste, as simulações revelaram a presença de outros dois radicais capturados pelo DMPO cujos parâmetros hiperfinos são consistentes com a formação de radicais de carbono, o que não corrobora com a hipótese de formação do cobre-oxil. Um destes radicais pode ser o ascorbil⁶⁵ e outro pode estar situado no ligante, evidenciando um estresse oxidativo sofrido pelo complexo CuAL. O estresse oxidativo sofrido pelo CuAL pode degradar o complexo, visto que foi demonstrado que os radicais previamente a catalise são essenciais para a estabilidade do complexo⁴². Esses resultados podem ser observados nos espectros das Figuras 4.28 e 4.29 abaixo.

Figura 4.28 – Espectro de EPR obtido para o CuAL + H_2O_2 + AscNa + DMPO.

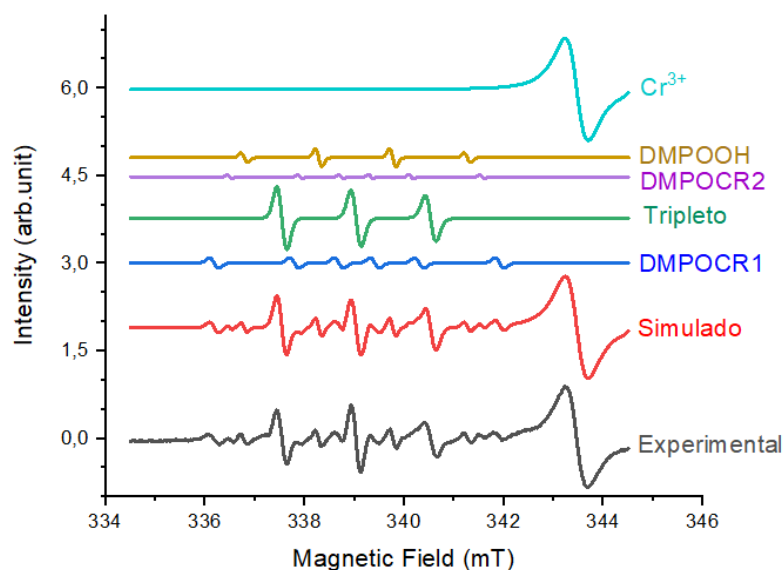
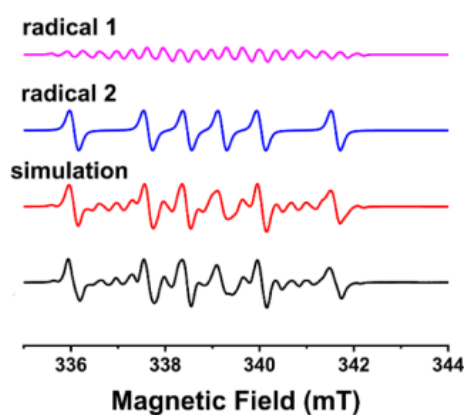


Figura 4.29 – Espectro de EPR obtido para o CuPol + DMPO.



Os dados obtidos não forneceram evidências experimentais robustas para a proposta de que o mecanismo de ação do CuAL envolve a formação de um intermediário radicalar cobre-oxil, que seria gerado a partir da reação do centro reduzido com peróxido de hidrogênio.

É importante salientar que o mecanismo proposto seria relevante principalmente para substratos solúveis e em condições específicas, uma vez que nos ensaios com papel filtro a adição de peróxido e ascorbato levou a uma completa inibição da atividade. Esse resultado contraintuitivo sugere que o complexo CuAL pode operar por mecanismos distintos dependendo da natureza do substrato e das condições reacionais.

Enquanto para substratos modelo solúveis a via oxidativa via oxidativa é eficiente, para a celulose cristalina insolúvel um mecanismo hidrolítico direto parece

ser predominante, conforme testes com CuPol, e a formação da espécie radicalar pode levar a reações paralelas não-produtivas ou à desativação do catalisador no caso do CuAL. Para verificar essa hipótese, testes extras de DNS utilizando celobiose como substrato seriam necessários, já que esta também é solúvel.

5. Conclusões

Foi possível realizar a síntese e caracterização de um novo ligante tridentado derivado da L-prolina. A partir deste, foi obtido o complexo mimético CuAL, inspirado no sítio ativo das LPMOs. Para fins comparativos, os complexos CuPol e CuPTB, previamente desenvolvidos pelo grupo, também foram avaliados.

As técnicas espectroscópicas confirmaram a estrutura do ligante AL. O complexo CuAL foi caracterizado por um conjunto abrangente de métodos, incluindo UV-Vis, IV, análise elementar, XPS, voltametria cíclica e EPR. Os dados obtidos corroboram fortemente com a estrutura proposta, confirmando a coordenação do centro metálico aos heteroátomos do ligante.

O complexo CuAL foi um catalisador eficiente para a clivagem de ligações glicosídicas nos diferentes substratos testados. No ensaio com substrato modelo, o CuAL apresentou desempenho superior ao CuPol e ao CuPTB.

Na atividade celulolítica total com papel filtro, o CuAL liberou quantidade expressiva de açúcares redutores na ausência de peróxido, superando o CuPol e o extrato enzimático. Também foi observado um efeito sinérgico entre o CuPol e a enzima. Ensaio com carboximetilcelulose confirmaram atividade de endoglucanase para o CuPol, enquanto a ausência de atividade com celulose cristalina indicou sua preferência por substratos amorfos.

Estudos mecanísticos revelaram que o CuAL pode operar por vias distintas: uma oxidativa, com formação de espécies radicalares do hidroxil, evidenciada por UV-Vis e EPR, e outra hidrolítica direta, predominante na ausência de oxidantes.

A inibição completa da atividade na presença de peróxido e ascorbato nos ensaios com papel filtro reforça que apesar da superioridade do CuAL em termos hidrolíticos, a sua estabilidade em reações de oxidação é limitada, visto que há a degradação do ligante.

A síntese de compostos biomiméticos que sejam tão eficientes quanto as enzimas produzidas pela natureza é extremamente difícil, dada sua extrema complexidade estrutural e as diversas interações presentes nos sítios ativos enzimáticos.

No entanto, os estudos envolvendo estes compostos podem trazer muitas informações úteis para o desenvolvimento de catalisadores mais eficientes para a despolimerização de biomassa.

6. Perspectivas Futuras

Este trabalho apresenta diversas possibilidades para sua continuidade, sendo duas delas as mais atrativas. A primeira seria o aprofundamento dos estudos espectroscópicos para entender melhor o mecanismo de reação dos miméticos, o que pode ajudar também a compreender o funcionamento das próprias enzimas.

A segunda seria a ampliação dos testes de atividade com substratos diferentes, como a celobiose, que por ser solúvel permitiria investigar a clivagem de ligações glicosídicas em um sistema mais simples e controlado. Ensaaios com outros oligossacarídeos e com biomassas reais também seriam interessantes para avaliar o potencial prático desses complexos em aplicações de conversão de biomassa.

REFERÊNCIAS

- ¹ LEE, J.; KIM, S.; YOU, S.; PARK, Y.-K. "Bioenergy generation from thermochemical conversion of lignocellulosic biomass-based integrated renewable energy systems". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **v. 178**, p. 113240, 2023.
- ² SAZALI, N. "A comprehensive review of carbon molecular sieve membranes for hydrogen production and purification." *Int J Adv Manuf Technol*. **vol. 107**, 2465–2483, 2020.
- ³ HAN, J.; BYUN, J.; KWON, O.; LEE, J. "Climate variability and food waste treatment: Analysis for bioenergy sustainability." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **v. 160**, p. 112336, 2022.
- ⁴ KUMAR, A.; SINGH, A.; SHARMA, V. K.; GOEL, A.; KUMAR, A. "The upsurge of lytic polysaccharide monooxygenases in biomass deconstruction: characteristic functions and sustainable applications". *The FEBS Journal*, **v. 291**, p. 5081–5101, 2024.
- ⁵ SRIVASTAVA, N.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, M.; LAL, B.; SINGH, R.; AHMAD, I.; GUPTA, V. K. "A review on the scope and challenges of *Saccharum spontaneum* waste in the context of lignocellulosic biomass for sustainable bioenergy applications". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **v. 199**, p. 114477, 2024.
- ⁶ YADAV, A.; SHARMA, V.; TSAI, M.-L.; CHEN, C.-W.; SUN, P.-P.; NARGOTRA, P.; WANG, J.-X.; DONG, C.-D. "Development of lignocellulosic biorefineries for the sustainable production of biofuels: Towards circular bioeconomy". *Bioresource Technology*, **v. 381**, p. 129145, 2023.
- ⁷ AGGER, J. W.; ISAKSEN, T.; VÁRNAI, A.; VIDAL-MELGOSA, S.; WILLATS, W. G. T.; LUDWIG, R.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H.; WESTERENG, B. "Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **v. 111**, n. 17, p. 6287–6292, 2014.
- ⁸ GUERRIERO, G.; HAUSMAN, J.-F.; STRAUSS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, K. S. "Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization". *Engineering in Life Sciences*, **v. 16**, n. 1, p. 1–16, 2016.
- ⁹ GIOVANNONI, M.; GRAMEGNA, G.; BENEDETTI, M.; MATTEI, B. "Industrial Use of Cell Wall Degrading Enzymes: The Fine Line Between Production Strategy and Economic Feasibility". *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **v. 8**, p. 356, 2020.
- ¹⁰ KOJIMA, Y.; SUNAGAWA, N.; TAGAWA, S.; HATANO, T.; AOKI, M.; KUREI, T.; HORIKAWA, Y.; WADA, M.; FUNADA, R.; IGARASHI, K.; YOSHIDA, M. "A cellulose-binding domain specific for native crystalline cellulose in lytic polysaccharide monooxygenase from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*". *Carbohydrate Polymers*, **v. 347**, p. 122651, 2025.
- ¹¹ DHARMARAJA, J. *et al.* "Lignocellulosic biomass conversion via greener pretreatment methods towards biorefinery applications." *Bioresource technology*, **v. 369**, p. 128328, 2023.
- ¹² ALBA FIERRO, C. A.; ESCOBEDO BRETADO, M. Á.; NÚÑEZ RAMÍREZ, D. M. *et al.* "Are biological pretreatments of lignocellulosic residues a real option for biofuels production?" *BioResources*, **v. 19**, n. 2, 2024.
- ¹³ STEEN, E.J., KANG, Y., BOKINSKY, G., HU, Z., SCHIRMER, A., MCCLURE, A., DEL CARDAYRE, S.B., KEASLING, J. D. "Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass." *Nature*. **V. 463**, p.559-562. 2010.

- ¹⁴ ZHAO, L.; SUN, Z. S.; ZHANG, C. C. *et al.* "Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: challenges and perspectives." *Bioresource Technology*, **v. 343**, p. 126123, 2022.
- ¹⁵ SULIS, D.B.; LAVOINE, N.; SEDEROFF, H. *et al.* "Advances in lignocellulosic feedstocks for bioenergy and bioproducts." *Nat Commun* **vol. 16**, p. 1244. 2025.
- ¹⁶ DEVI, A. *et al.* "Ethanol from lignocellulosic biomass: An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes." *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **v. 9**, n. 5, p. 105798, 2021.
- ¹⁷ HAAK, J.; GOLTEN, O.; SØRLIE, M.; EIJSINK, V. G. H.; CUTSAIL III, G. E. "pH-mediated manipulation of the histidine brace in LPMOs and generation of a tri-anionic variant, investigated by EPR, ENDOR, ESEEM and HYSCORE spectroscopy". *Chemical Science*, **v. 16**, p. 233–248, 2025.
- ¹⁸ HARRIS, P.V.; WELNER, D.; MCFARLAND, K.C. *et al.* "Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family." *Biochemistry*. **v. 49** p.3305–16. 2010.
- ¹⁹ VAAJE-KOLSTAD, G. *et al.* "An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides." *Science*, **v. 330**, n. 6001, p. 219-222. 2010.
- ²⁰ WALTON, P.H.; DAVIES, G.J. "On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases." *Current opinion in chemical biology*. 2016; **v. 31** p. 195–207.
- ²¹ CASTILLO, I.; TORRES-FLORES, A. P.; ABAD-AGUILAR, D. F.; BERLANGA-VÁZQUEZ, A.; ORIO, M.; MARTÍNEZ-OTERO, D. "Cellulose Depolymerization with LPMO-inspired Cu Complexes". *ChemCatChem*, **v. 13**, p. 4700–4704, 2021.
- ²² EIJSINK, V. G. H. *et al.* "On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)." *Biotechnology for biofuels*, **v. 12**, n. 1, p. 58, 2019.
- ²³ HAGEMANN, M. M.; WIEDUWILT, E. K.; RYDE, U.; HEDEGÅRD, E. D. "Investigating the Substrate Oxidation Mechanism in Lytic Polysaccharide Monooxygenase: H₂O₂- versus O₂-Activation". *Inorganic Chemistry*, **v. 63**, p. 21929–21940, 2024.
- ²⁴ BISSARO, B.; ROHR, A.K.; MULLER, G. *et al.* "Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂." *Nature chemical biology*. **v. 13** p.1123-8. 2017.
- ²⁵ Span, E. A.; Marletta, M.A. "The framework of polysaccharide monooxygenase structure and chemistry." *Current opinion in structural biology*. **V. 35**, p. 93. 2015.
- ²⁶ STØPAMO, F. G.; SULAEVA, I.; BUDISCHOWSKY, D. *et al.* "Oxidation of cellulose fibers using LPMOs with varying allomorphic substrate preferences, oxidative regioselectivities, and domain structures". *Carbohydrate Polymers*, **vol. 330**. 2024.
- ²⁷ GOSWAMI, S.; GARCIA-BOSCH, I. "Recent Advances in Bioinspired Cu-Directed C–H Hydroxylation Reactions". *Accounts of Chemical Research*, **v. 58**, p. 2886–2897, 2025.
- ²⁸ CONCIA, A. L. *et al.* "Copper complexes as bioinspired models for lytic polysaccharide monooxygenases." *Inorganic Chemistry*, **v. 56**, n. 3, p. 1023-1026, 2017.
- ²⁹ KIM, B.; BRUEGGEMEYER, M. T.; TRANSUE, W. J.; *et al.* "Fenton-like Chemistry by a Copper(I) Complex and H₂O₂ Relevant to Enzyme Peroxygenase C–H Hydroxylation". *Journal of the American Chemical Society*, **v. 145**, n. 21, p. 11735–11744, 2023.

- ³⁰ MUTHURAMALINGAM, S. *et al.* "Regioselective oxidative carbon-oxygen bond cleavage catalysed by copper (II) complexes: A relevant model study for lytic polysaccharides monooxygenases activity." *Journal of Catalysis*, **v. 372**, p. 352-361, 2019.
- ³¹ FUKATSU, A. *et al.* "Modelling a 'histidine brace' motif in mononuclear copper monooxygenases." *Chemical Communications*, **v. 56**, n. 38, p. 5123-5126, 2020.
- ³² SAIKIA, J. *et al.* "Minimalist de novo design of an artificial enzyme." *ACS omega*, **v. 7**, n. 23, p. 19131-19140, 2022.
- ³³ LEBLAY, R.; DELGADILLO-RUIZ, R.; DECROOS, C.; HUREAU, C.; RÉGLIER, M.; CASTILLO, I.; FAURE, B.; SIMAAN, A. J. "LPMO-like Activity of Bioinspired Copper Complexes: From Model Substrate to Extended Polysaccharides". *ChemCatChem*, **v. 15**. 2023.
- ³⁴ GILBERT, U. *et al.* "Influence of imidazole functionalization on the properties of small molecule models of the LPMO active site." *Dalton Transactions*, **v. 54**, n. 15, p. 6174-6187, 2025.
- ³⁵ HASSOON, A. A. *et al.* "Peptide-based chemical models for lytic polysaccharide monooxygenases." *Dalton Transactions*, **v. 51**, n. 45, p. 17241-17254, 2022.
- ³⁶ NEIRA, A. C. *et al.* "Oxidative cleavage of cellobiose by lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO)-inspired copper complexes." *ACS omega*, **v. 4**, n. 6, p. 10729-10740, 2019.
- ³⁷ LIU, Y.; MA, W.; FANG, X. "The role of the residue at position 2 in the catalytic activity of AA9 lytic polysaccharide monooxygenases." *International Journal of Molecular Sciences*, **v. 24**, n. 9, p. 8300, 2023.
- ³⁸ HALL, K. R.; JOSEPH, C.; AYUSO-FERNÁNDEZ, I. *et al.* A conserved second sphere residue tunes copper site reactivity in lytic polysaccharide monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, **v. 145**, n. 34, p. 18888-18903. 2023.
- ³⁹ BISSARO B, VÁRNAI A, RØHR ÅK, EIJSINK VGH. "Oxidoreductases and Reactive Oxygen Species in Conversion of Lignocellulosic Biomass." *Microbiol Mol Biol Rev* **v. 82**, Is. 4. 2018.
- ⁴⁰ CAO, N.; BALCELLS, D.; OLSBYE, U.; CASTRO, A. C.; NOVA, A. "Copper(II)-Oxyl Formation in a Biomimetic Complex Activated by Hydrogen Peroxide: The Key Role of trans-Bis(hydroxo)". *Inorganic Chemistry*, **v. 63**, n. 23, p. 23082–23094, 2024.
- ⁴¹ FERREIRA, M. P. Síntese, Caracterização e Estudo Catalítico de Complexos Miméticos das Enzimas Nitrito Redutase e Anidrase Carbônica. São Carlos, Programa de pós graduação em Química – UFSCar, 2022. Tese de doutorado, 173 p.
- ⁴² MARQUES NETTO, C. G. C., PANDEY, R., CASTRO, C. B., MORENO, L., FERREIRA M. P., RODRIGUES, L. G., GUIMARAES JUNIOR, W. G., HONORATO, J., CONCIANI, G. R., DYER, R. B., JANNUZZI, S. A. V., MOURA, A. F. de, SOUZA, D. H. F. de & NASCIMENTO, O. R. "Ligand Radicals Tune LPMO Activity in Model Complex". *Inorganic chemistry*, 2026. Manuscrito aceito para publicação.
- ⁴³ STRADWICK, L. *et al.* Development and application of assay for determining β glucosidase activity in human saliva. *Flavour*, **v. 6**, p. 1–8, 2017.
- ⁴⁴ GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, **v. 59**, n. 2, p. 257–268, 1987.
- ⁴⁵ MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **v. 31**, n. 3, p. 426–428, 1959.

- ⁴⁶ HENDERSON, W.; MCINDOE, J. S. *Mass Spectrometry of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds: Tools – Techniques – Tips*. John Wiley & Sons, 2005.
- ⁴⁷ PAVIA, D. L. *et al.* *Introdução à espectroscopia*. Tradução da 5ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2016.
- ⁴⁸ NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part B: Applications in Coordination, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*. 6. ed. Hoboken: Wiley, 2009.
- ⁴⁹ DEACON, G. B.; PHILLIPS, R. J. "Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination." *Coordination Chemistry Reviews* 1980, **vol. 33**, p. 227-250.
- ⁵⁰ COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd ed.; Academic Press: San Diego, 1990.
- ⁵¹ LEVER, A. B. P. *Inorganic Electronic Spectroscopy*, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, 1984.
- ⁵² HATHAWAY, B. J.; BILLING, D. E. "The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion." *Coordination Chemistry Reviews* 1970, **vol. 5**, 143-207.
- ⁵³ PRENESTI, E. *et al.* "Spectrum–structure correlation for visible absorption spectra of copper (II) complexes showing axial co-ordination in aqueous solution." *Polyhedron*, **v. 25**, n. 15, p. 2815-2823, 2006.
- ⁵⁴ MCMURRY, J. *Organic Chemistry*, 9th ed.; Cengage Learning: Boston, 2016.
- ⁵⁵ BASOLO, F.; PEARSON, R. G. *Mechanisms of Inorganic Reactions*, 2nd ed.; Wiley: New York, 1967.
- ⁵⁶ SATO, M.; MATSUKI, S.; IKEDA, M.; NAKAYA, J. I. "Effect of deprotonation of the coordinated water molecule on properties of copper(II) complex with glycylglycine and H₂O." *Inorganica Chimica Acta*, Amsterdam, **v. 125**, n. 1, p. 49-54, 1986.
- ⁵⁷ BERA, M.; KESHARI, K.; BHARDWAJ, A.; GUPTA, G.; MONDAL, B.; PARIA, S. "Electrocatalytic water oxidation activity of molecular copper complexes: effect of redox-active ligands." *Inorganic Chemistry*, Washington, DC, **v. 61**, n. 7, p. 3152-3165, 2022.
- ⁵⁸ MANNAA, A.H., ZAKY, R.R., GOMAA, E.A. *et al.* "Estimation of the cyclic voltammetry parameters for pyridine-2,6-dicarbohydrazide and its interaction with CuCl₂ in various solutions." *Monatsh Chem* 153, 577–587. 2022.
- ⁵⁹ PARY, P. *et al.* "Electrochemical reduction of copper complexes with glycine, alanine and valine." *Journal of the Electrochemical Society*, Pennington, **v. 168**, n. 1, 012501, 2021.
- ⁶⁰ FRANCO, R. *Introdução à ressonância paramagnética eletrônica*. Campos dos Goytacazes, RJ: Ed. do Autor, 2025.
- ⁶¹ PAGLIERO, M. C. *et al.* "Investigating Cu (II) Complexes for MRI: A Comprehensive Approach Using EPR, Relaxometry, and Computational Modeling." *Inorganic Chemistry*, 2026.
- ⁶² LAGOSTINA, V. *et al.* "Magnetic and relaxation properties of vanadium(IV) complexes: an integrated ¹H relaxometric, EPR and computational study." *Inorganic Chemistry Frontiers*, **v. 10**, n. 7, p. 1999-2013, 2023.
- ⁶³ ROY, S., MISRA, A., PAUL, S. "Correlating EPR Parameters With Structural Anisotropy in Cu (II) Complexes." *Journal of Computational Chemistry*, **v. 47**, n. 6, p. e70339, 2026.
- ⁶⁴ PUNIS, R., ZOLEO, A. "Implementation of EPR spectroscopy for the study of different synthetic copper green-bluish pigments obtained from antique recipes." *Dyes and Pigments*, p. 113587, 2026.

⁶⁵ CASTRO, C. B.; CONCIANI, C.; DA SILVA, E. M.; HONORATO, J.; GUIMARÃES JÚNIOR, W. G.; DE MOURA, A. F.; ELLENA, J.; CORRÊA, A. G.; NASCIMENTO, O. R.; MARQUES NETTO, C. G. C. "Ascorbyl Radicals as Reducing Agents in Copper-Catalyzed Redox Reactions" *Inorganic Chemistry*. **vol. 64**, is. 46, p. 22563-22580, 2025.