



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TESE DE DOUTORADO

Paulo Fernando do Amaral Costa

DESIGN RACIONAL E MODELAGEM MECANÍSTICA DE COMPLEXOS
SUPRAMOLECULARES BIOINSPIRADOS: POTENCIALIDADES MULTIFUNCIONAIS VIA
CATÁLISE NUCLEOFÍLICA, BÁSICA-GERAL E FOTOQUÍMICA

Florianópolis

2020

Paulo Fernando do Amaral Costa

DESIGN RACIONAL E MODELAGEM MECANÍSTICA DE COMPLEXOS
SUPRAMOLECULARES BIOINSPIRADOS: POTENCIALIDADES MULTIFUNCIONAIS VIA
CATÁLISE NUCLEOFÍLICA, BÁSICA-GERAL E FOTOQUÍMICA

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadores: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera (in memoriam); e Prof^a. Dr^a. Adriana Passarella Gerola.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Haidi Dálida Lentz Fiedler Nome.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

COSTA, PAULO FERNANDO DO AMARAL

Design racional e modelagem mecanística de complexos supramoleculares bioinspirados: Potencialidades multifuncionais via catálise nucleofílica, básica-geral e fotoquímica / PAULO FERNANDO DO AMARAL COSTA ; orientadora, Adriana Passarella Gerola, coorientadora, Haidi Dálida Lentz Fiedler Nome, 2020.

214 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Química. 2. Complexos supramoleculares. 3. Enzimas artificiais. 4. Catálise. 5. Clorofilas. I. Gerola, Adriana Passarella. II. Fiedler Nome, Haidi Dálida Lentz. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Paulo Fernando do Amaral Costa

Título: Design racional e modelagem mecânica de complexos supramoleculares bioinspirados:
Potencialidades multifuncionais via catálise nucleofílica, básica-geral e fotoquímica

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Michelle Medeiros, Dr.^a,

UNISUL

Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.,

UFSC

Prof.^a Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan, Dr.^a,

UFSC

Prof. Adolfo Horn Júnior, Dr.,

UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de doutor em Química com ênfase em Química Orgânica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

Prof.^a Adriana Passarella Gerola, Dr.^a

Orientadora

Florianópolis, 2020

Ao autor da vida, criador de todas as coisas, que fez os céus, a Terra e tudo o que neles há. Dono de toda sabedoria, riqueza, conhecimento e majestade. A Deus dedico este trabalho, a minha vida, tudo o que tenho e tudo o que sou.

Aos meus pais, Waldemar Amaral Costa e Helena A. Souza Costa.

À minha família e amigos.

Em homenagem ao Prof. Faruk Nome

The Stars

As estrelas, astros que encantam os seres humanos desde os primórdios, brilhantes, são geradoras de luz que permeia o espaço até os confins do universo. São orientação para os navegantes e aventureiros, e acalento para os corações na escuridão da noite.

São vívidas e intensas, admiráveis e grandiosas. Atraem planetas e sistemas inteiros para si, pois são gigantes, fazendo com que o espaço-tempo ceda à sua imponente e imensidão.

Quando estão prestes a partir, em uma supernova elas brilham intensamente, e se vão. Contudo, extraordinariamente como elas sempre foram, tanta luz emitida não se vai depressa, e todo o seu esplendor ainda é visto por séculos e mais séculos.

O Prof. Faruk Nome era, de fato, como uma estrela, grandioso, imponente, gigante, caloroso e absolutamente brilhante! Ele se foi, mas como em uma supernova, sua luz permanece.

O autor

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, amizade, por ser meu fundamento, tudo para mim e por estar comigo em todos os momentos.

Aos meus pais, Waldemar do Amaral Costa e Helena A. Souza Costa. À minha família, Ana Paula A. Costa Mazzei, Felipe A. Amaral Costa, Italo R. Mazzei, Ítor M. Costa Mazzei, Ana P. Andreotti Costa, Isaque A. Andreotti Costa, Maria Edilce Souza e Suzi Dailler Miqueleti, pelo amor, educação e por serem a minha base em todo tempo.

Ao Prof. Faruk Nome, pela orientação, pelos ensinamentos, por ter sido um pai bondoso e fonte de grande inspiração. Sinto-me privilegiado por ter podido conviver, aprender e crescer sobre os ombros de um gigante tão extraordinário.

Às professoras Dr^a Adriana Passarella Gerola e Dr^a. Haidi D. Fiedler Nome, pela orientação, ensinamentos e por serem uma referência e inspiração de pessoa, profissional e cientista.

Aos membros da banca Prof. Dr^a. Michelle Medeiros, Prof. Dr^a. Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan, Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo e Prof. Dr. Adolfo Horn Júnior, pela avaliação deste trabalho e disponibilidade.

Ao Prof. Anthony Kirby, da University of Cambridge, pela colaboração expressiva e significativa neste trabalho.

Ao Charles Martins dedicação e competência na revisão gramatical deste trabalho.

Aos meus pastores, Pastor Júnior e Pastora Arony Paiva, e Pastor Pedro e Pastora Bárbara do Espírito Santo

Aos amigos e colegas de laboratório, por todos os ensinamentos, auxílios, amizade e companheirismo, em especial Maria Terezinha França, Rafael de Abreu, Patrícia Sangaletti, Laíze Zaramello, Yasmin S. Gomes, Eduardo H. Wanderlind e Eduardo Vieira.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Departamento de Química, à Central de Análises e ao Programa de Pós-graduação em Química, pela infra-estrutura. Aos servidores técnico-administrativos da UFSC, em especial a Grace Hoeller e Jadir Carminatti, que já se aposentaram, e a Andrezza por toda atenção, auxílio e competência.

Ao INCT-Catálise, ao CNPq pela bolsa de Doutorado concedida, CAPES e FAPESC, LCME-UFSC pela infraestrutura, apoio técnico, administrativo e financeiro.

“Não sei como o mundo me vê, mas eu me sinto como um garoto brincando na praia, contente em achar aqui e ali, uma pedra mais lisa ou uma concha mais bonita, mas tendo sempre diante de mim, ainda por descobrir, "O grande oceano de verdades".”

Isaac Newton

“O que quer que você faça, faça bem feito. Faça tão bem feito que, quando as pessoas te virem fazendo, elas queiram voltar e ver você fazer de novo e queiram trazer outros para mostrar o quão bem você faz aquilo que faz.”

Walt Disney

RESUMO

Este trabalho detalha a formação, design racional, caracterização, mecanismo e atividade catalítica de complexos supramoleculares polímero/surfactante como enzimas artificiais em reações de interesse biológico, bem como seu uso como sistemas estabilizadores de clorofilas *b* para fotocatalise via oxigênio singleto. Tais complexos são baseados na associação supramolecular entre o polímero poliácido acrílico funcionalizado com grupos imidazóis (Polímero PAIM) e a classe de surfactantes catiônicos C_n TAB e zwitteriônico SB3-16, assim, mimetizando grupos aspartato e histidina e efeitos hidrofóbicos contidos no sítio ativo de enzimas. A formação e propriedades dos complexos supramoleculares PAIM/ C_n TAB foram caracterizadas através de medidas de condutividade, fluorescência, potencial zeta, espalhamento de luz relativo UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento dinâmico de luz, além do desenvolvimento de método de determinação de concentrações críticas de surfactantes zwitteriônicos. Os complexos PAIM/ C_n TAB apresentaram efeitos catalíticos excepcionais para reações de desfosforilação de um diéster de fosfato ativado (BDNPP), sendo altamente dependentes do (a) pH, (b) concentração do surfactante e (c) tamanho da cadeia hidrofóbica do surfactante. Os estudos realizados neste trabalho possibilitam o desenvolvimento e consolidação da ciência de base como modelo compreensível de fenômenos que controlam a catálise enzimática, mostrando que os efeitos hidrofóbicos são centrais nessa categoria catalítica. Ainda, os resultados identificaram a clorofila *b*, pigmento natural, como um dos mais poderosos geradores de oxigênio singleto na natureza. Tal pigmento foi caracterizado e incorporado em sistemas micelares e nas enzimas artificiais baseadas em complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico, e, em especial, destaca-se que a sua fotoestabilidade está fortemente relacionada ao microambiente e localização, além da sua excepcional atividade fotocatalítica. Além disso, tais estudos apresentam potencialidades multifuncionais, as quais incluem aplicações práticas em terapia genética, terapia fotodinâmica, biotecnologia, e detoxificação química.

Palavras-chaves: complexos polímero/surfactante, enzimas artificiais, catálise

ABSTRACT

This study details the formation, rational design, characterization, mechanism and catalytic performance of supramolecular polymer / surfactant complexes as artificial enzymes in reactions of biological interest, as well as their use as chlorophyll B stabilizing systems for photocatalysis via singlet oxygen. Such complexes are based on the supramolecular association between the poly (acrylic acid) polymer functionalized with imidazole groups (PAIM polymer) and the cationic surfactants class C_nTAB and zwitterionic SB3-16, thus mimicking aspartate and histidine residues, and hydrophobic effects contained in the active enzyme site. The formation and properties of the supramolecular PAIM / C_nTAB complexes were characterized by conductivity, fluorescence, zeta potential, relative light scattering UV-Vis, transmission electron microscopy, and dynamic light scattering, in addition to the development of a determination method of critical concentrations of zwitterionic surfactants. The PAIM / C_nTAB complexes showed exceptional catalytic effects for dephosphorylation reactions of an activated phosphate diester (BDNPP), being highly dependent on (a) pH, (b) surfactant concentration and (c) size of the surfactant hydrophobic chain. The studies carried out here enable the development and consolidation of basic science as an understandable model of phenomena that control enzymatic catalysis, showing that hydrophobic effects are central to this catalytic modality. The results also identified Chlorophyll B, a natural pigment, as one of the most powerful singlet oxygen generators in nature. Such a pigment was characterized and incorporated in micellar systems and artificial enzymes based on supramolecular polymer / zwitterionic surfactant complexes, and, in particular, it is noteworthy that its photostability is strongly related to the microenvironment and location, as well as its exceptional photocatalytic activity. In addition, such studies present multifunctional potentials, which include practical applications in gene therapy, photodynamic therapy, biotechnology, and chemical detoxification.

Keywords: polymer/surfactant complexes, artificial enzymes, catalysis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. A catálise e as enzimas como fonte de inspiração.....	25
1.2. Enzimas artificiais: design sob uma estratégia biomimética.....	29
1.3. Fundamentos de catálise enzimática	32
<i>1.3.1. Princípios gerais, modelos e aspectos energéticos</i>	<i>32</i>
<i>1.3.2. Enzimas: uma abordagem molecular.....</i>	<i>35</i>
<i>1.3.3. Aminoácidos e Resíduos de aminoácidos catalíticos</i>	<i>37</i>
<i>1.3.4. Exemplos de mecanismos de catálise enzimática</i>	<i>42</i>
1.4. Reações de transferência de grupo fosforila	47
1.5. Mecanismos de reações de transferência de grupo fosforila	50
1.6. Catálise intramolecular e intermolecular	53
1.7. Química Supramolecular e Catálise Supramolecular	58
1.8. Fotocatálise: Fundamentos e aplicações	65
2. OBJETIVO.....	72
2.1. ESTRATÉGIAS.....	72
3. MATERIAIS E MÉTODOS	73
3.2. INSTRUMENTAÇÃO	74
3.3. METODOLOGIA.....	76
<i>3.3.1. Complexos supramoleculares no design de enzimas artificiais</i>	<i>78</i>
<i>3.3.2. Caracterização dos complexos supramoleculares</i>	<i>80</i>
<i>3.3.3. Cinéticas de reações orgânicas de desfosforilação</i>	<i>83</i>
<i>3.3.4. Complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico</i>	<i>85</i>
<i>3.3.5. Clorofilas b em meio homogêneo e sistemas nanoestruturados modelo .</i>	<i>91</i>
<i>3.3.6. Clorofilas b em complexos supramoleculares polímero/surfactante: Caracterização e aplicação em fotocatálise.....</i>	<i>96</i>

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	98
4.1. PARTE I: Complexos supramoleculares polímero/surfactante catiônico: caracterização, catálise e mecanismo de reações de desfosforilação	98
4.1.1. <i>Caracterização dos complexos polímero/surfactante catiônico</i>	98
4.1.2. <i>Catálise e mecanismo de reações de desfosforilação</i>	117
4.1.3. <i>CONCLUSÕES PARCIAIS.....</i>	130
4.2. PARTE II: Micelas zwitteriônicas e complexos polímero/surfactante zwitteriônico: Novo método de determinação de CMC, caracterização e catálise de reações de desfosforilação.....	133
4.2.1. <i>PBFI: Uma sonda fluorescente supramolecular para determinação da CMC de surfactantes zwitteriônicos</i>	133
4.2.2. <i>Complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico: Caracterização e aplicação em catálise de reações de desfosforilação</i>	149
4.2.3. <i>CONCLUSÕES PARCIAIS</i>	155
4.3. PARTE III: Caracterização de clorofilas <i>b</i> em sistemas modelo; caracterização e fotocatálise em complexos supramoleculares polímero/surfactante.....	158
4.3.1. <i>Propriedades espectroscópicas e rendimentos quânticos de fluorescência</i>	158
4.3.3. <i>Localização relativa em micelas não iônicas: estudos de supressão de fluorescência</i>	166
4.3.4. <i>Fotoestabilidade em micelas não iônicas</i>	170
4.3.5. <i>Mg-Chl <i>b</i> e Pheo <i>b</i> como geradores de oxigênio singlete.....</i>	173
4.3.6. <i>Clorofila <i>b</i> em complexos supramoleculares polímero/surfactante: Potentes enzimas artificiais fotocatalisadoras.....</i>	176
4.3.8. <i>CONCLUSÕES PARCIAIS.....</i>	191
5. CONCLUSÕES FINAIS	193
6. REFERÊNCIAS	195
APÊNDICES.....	210

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da catálise como solução para problemas do mundo moderno.....	25
Figura 2. Publicações científicas na área de catálise nos últimos anos. Pesquisa realizada no website “Portal de Periódico da Capes” buscando por palavras-chaves dos artigos (Palavras-chaves no inglês: Catalytic, Catalysis, Catalysts, Catalytically, Nanoreactors, Artificial Enzymes, Enzymes e Nanocatalysis). Acesso: 10/01/2020. Fonte: O Autor.	26
Figura 3. Catálise enzimática: categoria catalítica de alta eficiência. Fonte: O Autor.	27
Figura 4. Enzimas artificiais multifuncionais desenvolvidas sob uma estratégia biomimética e suas potenciais aplicações. Fonte: O autor.	30
Figura 5. Diagrama de energia livre da catálise enzimática e da reação não catalisada. Fonte: Ref. ⁴²	34
Figura 6. Representação dos Mecanismos de catálise ácida-básica geral e catálise nucleofílica na etapa determinante da reação em ambientes aquosos. Fonte: O autor. .	36
Figura 7. Mecanismo de catálise enzimática da superfamília das fosfolipases D. Fonte: Ref. ⁴⁶	42
Figura 8. Sítio ativo (a) e o mecanismo de catálise enzimática (b) das serina proteases. Fonte: Ref. ⁶⁷	44
Figura 9. Mecanismo de catálise enzimática da Acetilcolinesterase. Fonte: Ref. ¹¹¹	45
Figura 10. Mecanismo de catálise enzimática da Ribonuclease. Fonte: Ref. ⁴²	46
Figura 11. Tipos de ésteres de fosfatos derivados do ácido fosfóricos e seus equilíbrios ácido-base. Fonte: O autor.	48
Figura 12. (A) Caminhos reacionais e (B) Diagrama de More O’Ferrall-Jencks de substituição nucleofílica no átomo de fósforo em reações de transferência de grupo fosforila. Fonte: adaptado da Ref. ^{54,127}	51
Figura 13. Catálise Intramolecular de um diéster de fosfato BMIPP por dois grupos imidazóis. Modelo de catálise enzimática. Fonte: Ref. ⁴⁶	55
Figura 14. Detecção de intermediário-chave no mecanismo de catálise intramolecular do BMIPP. Ref. ⁴⁶	56
Figura 15. Catálise intermolecular da clivagem de ésteres de fosfato por imidazóis. Fonte: Ref. ¹⁰⁹	57
Figura 16. Alguns exemplos de receptores utilizados na química supramolecular. Fonte: Ref. ^{53,53}	59

Figura 17. Catálise supramolecular tipo “Host-Guest” por ciclodextrina funcionalizada com grupos imidazóis em reações de desfosforilação de diésteres de fosfato. Fonte: Ref. ¹⁰⁸	61
Figura 18. Catálise supramolecular tipo receptor-substrato por Pilar-5-areno funcionalizado com grupos imidazóis em reações de desfosforilação de diésteres de fosfato. Fonte: Ref. ⁷²	61
Figura 19. Equilíbrios ácido-base e espécies iônicas do polímero PAIM. Fonte: Adaptado da Ref. ⁸⁰	62
Figura 20. Estrutura molecular e representação ilustrativa do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (C ₁₆ TAB).....	63
Figura 21. Complexos supramoleculares polímero/surfactante como catalisadores em reações de desfosforilação de um triéster de fosfato. Fonte: Ref. ⁸⁰	64
Figura 22. Estrutura molecular da clorofila b (Mg-Chl b) e feofitina b (Pheo b).	66
Figura 23. Digrama de Jablonski - representação esquemática do processo de absorção e caminhos para desativação do estado excitado.....	67
Figura 24. Diagrama de fotossensibilização para produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio.....	69
Figura 25. Clorofilas como geradores de oxigênio singlete e aplicações das reações de foto-oxidação via oxigênio singlete.....	70
Figura 26. Ilustração e estruturas moleculares do polímero PAIM e suas respectivas espécies ácido-base; e os surfactantes catiônicos da classe C _n TAB utilizados neste trabalho (C ₁₆ TAB, C ₁₄ TAB, C ₁₂ TAB e C ₁₀ TAB).....	79
Figura 27. Estrutura molecular da sonda fluorescente Pireno.....	81
Figura 28. Estrutura molecular do substrato Bis-(2,4,-dinitro-fenil) fosfato.....	83
Figura 29. Ilustração e estruturas moleculares do polímero PAIM e suas respectivas espécies ácido-base; e o surfactante zwitteriônico SB3-16.	86
Figura 30. Estruturas moleculares dos surfactantes zwitteriônicos investigados.....	87
Figura 31. Estrutura molecular da sonda fluorescente PBFI ⁴	88
Figura 32. Estruturas moleculares de surfactantes não-iônicos empregados como sistemas modelo.....	92
Figura 33. Estrutura molecular do padrão de rendimento quântico de fluorescência: Feoforbídeo a (Pheid a).	93
Figura 34. Estruturas moleculares dos substratos para reações de foto-oxidação: Vitamina C e trans-estilbeno.	96

- Figura 35.** Condutividade das soluções de PAIM em diferentes pH e concentrações de C_n TAB. Dados de C_n TAB em água como padrão para comparação. (A) PAIM/ C_{14} TAB (B) PAIM/ C_{12} TAB e (C) PAIM/ C_{10} TAB. Medidas realizadas em $T=25,0$ °C e $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} . Fonte: O autor. 99
- Figura 36.** Espectros de emissão de Fluorescência do Pireno, exemplo das bandas I, III e Excímero (Ex). 101
- Figura 37.** Razão entre a intensidade de fluorescência do excímero (I_{Ex}) e monômero (I_M) da sonda Pireno (Py) nos complexos PAIM/ C_n TAB em diferentes pH e concentrações de C_n TAB. Dados de C_n TAB em água como padrão para comparação. (A) PAIM/ C_{14} TAB (B) PAIM/ C_{12} TAB e (C) PAIM/ C_{10} TAB. Medidas realizadas em $T=25,0$ °C; $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e $[Py]=5,0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} . Fonte: O autor. 102
- Figura 38.** Sobreposição das medidas de condutividade e fluorescência para os complexos PAIM/ C_{14} TAB em função da concentração de surfactante C_{14} TAB (exemplo). Medidas realizadas em $25,0$ °C; $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e $[Py]=5,0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} . Fonte: O autor. 104
- Figura 39.** Razão entre a intensidade de fluorescência da banda I (I_I) e banda III (I_{III}) da sonda Pireno (Py) nos complexos PAIM/ C_{12} TAB em diferentes pH e concentrações de C_n TAB. Dados de C_n TAB em água como padrão para comparação. (A) PAIM/ C_{14} TAB (B) PAIM/ C_{12} TAB e (C) PAIM/ C_{10} TAB. Medidas realizadas em $25,0$ °C, $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} $[Py] = 5,0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} . Fonte: O autor. 106
- Figura 40.** Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos PAIM/ C_n TAB em diferentes concentrações de C_n TAB. Medidas realizadas em pH 9,0, $T=25,0$ °C, $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} . Dados do C_{16} TAB obtidos da Ref.⁸⁰. Fonte: O autor. 108
- Figura 41.** Porcentagem relativa dos agregados de PAIM em função do tamanho (diâmetros hidrodinâmicos). As medidas foram realizadas em $25,0$ °C, pH 9,0, e $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} . Fonte: O autor. 109
- Figura 42.** Espalhamento de luz relativo dos complexos supramoleculares PAIM / C_n TAB em diferentes pH e em função da concentração de C_n TAB. Medidas realizadas em $25,0$ °C, $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e $\lambda=400$ nm. C_n TAB: (A) C_{14} TAB, (B) C_{12} TAB, and (C) C_{10} TAB. 110
- Figura 43.** Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos PAIM/ C_{14} TAB em diferentes pH e concentrações de C_{14} TAB. Medidas realizadas em $T=25,0$ °C e $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} . Dados de PAIM/ C_{14} TAB como exemplo. Fonte: O autor. 111

- Figura 44.** Cinética de estabilidade dos complexos PAIM/C₁₂TAB monitorada por diâmetro hidrodinâmico. Medidas realizadas em T=25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹. [C₁₂TAB]=1x10⁻⁴ mol L⁻¹; [C₁₂TAB]=3,85x10⁻³ mol L⁻¹; e [C₁₂TAB]=7,4x10⁻³ mol L⁻¹. Fonte: O autor. 112
- Figura 45.** Micrografia dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₆TAB em pH 9,0 por microscopia eletrônica de transmissão. [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹ e [C₁₆TAB]=7,2x10⁻⁴ mol L⁻¹. Fonte: O autor..... 113
- Figura 46.** Potencial zeta dos complexos PAIM/C_nTAB em função da concentração de C_nTAB. (A) PAIM / C₁₄TAB; (B) PAIM / C₁₂TAB; e (C) PAIM / C₁₀TAB. Medidas realizadas em T=25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹. Fonte: O autor. 114
- Figura 47.** Espectros das cinéticas das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB monitoradas por espectrofotometria de absorção UV-Vis (exemplo)..... 117
- Figura 48.** Um exemplo de cinética e ajuste para as reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB..... 118
- Figura 49.** Constantes de velocidade observadas das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM/C_nTA⁺ em função da concentração de C_nTAB. Reações realizadas em pH=9,0; T=25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹. Fonte: O autor. 119
- Figura 50.** Perfis de pH das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por PAIM/C_nTAB nas concentrações ótimas de C_nTAB. Reações realizadas T=25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹. [C₁₆TAB]= 7,2x10⁻⁴ mol L⁻¹; [C₁₄TAB]= 2,2x10⁻³ mol L⁻¹; [C₁₂TAB]= 1,1x10⁻² mol L⁻¹; [C₁₀TAB]= 5,6x10⁻² mol L⁻¹. Dados em água retirados da Ref.¹⁷². Fonte: O autor. 121
- Figura 51.** Caminhos reacionais e cinéticos para reação de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB. Fonte: O autor. 124
- Figura 52** – Perfil de pH das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por PAIM/C₁₆TAB nas concentrações ótimas de C₁₆TAB (k_{obs} em escala logarítmica). Reações realizadas em 25,0 °C; [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹ e [C₁₆TAB]= 7,2x10⁻⁴ mol L⁻¹. Dados em água retirados da Ref.¹⁷² Fonte: O autor. 126
- Figura 53.** Possíveis mecanismos da reação de desfosforilação do BDNPP catalisada por grupos carboxilatos (e/ou imidazólios) do complexo PAIM^{+/-}/C_nTA⁺ em pH 5. Caminho A: Catálise básica-geral; Caminho B: Catálise Nucleofílica. Fonte: O autor. 127

Figura 54. Possíveis mecanismos da reação de desfosforilação do BDNPP catalisada por grupos imidazóis do complexo PAIM/ C_nTA^+ em $pH > 8$. Caminho A: Catálise Básica-geral; Caminho B: Catálise Nucleofílica. Fonte: O autor.	127
Figura 55. Complexos supramoleculares PAIM/ C_nTAB como catalisadores na reação de desfosforilação do bis-2,4-dinitro-fenil fosfato (BDNPP). Fonte: O autor.....	129
Figura 56. Medidas de condutividade para determinação da concentração crítica do surfactante zwitteriônico SB3-14 em tampão Bis-Tris $pH 7,0$ e $25,0\ ^\circ C$	133
Figura 57 – Fração das espécies protolíticas do PBFI em diferentes pH . $pK_{a1}=5,18$ e $pK_{a2}=5,77$	137
Figura 58 - Espectros de emissão de fluorescência da sonda PBFI em diferentes concentrações de SB3-14. $[PBFI]=1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $pH=7,00$ (Tampão Bis-Tris) e $25^\circ C$	138
Figura 59 – Emissão normalizada da sonda PBFI em diferentes concentrações de SB3-14 e ajuste para determinação do K_b e CMC. $[PBFI]=1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $pH=7,0$ (Tampão Bis-Tris) em $25^\circ C$. Emissão no $\lambda_{m\acute{a}x} = 512 \text{ nm}$	138
Figura 60. Intensidade de emissão de fluorescência do PBFI em 512 nm em função da concentração dos surfactantes SB3-n (SB3-16, SB3-14 e SB3-12). $[PBFI]=1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $pH=7,0$ (Tampão Bis-Tris) em $25^\circ C$	141
Figura 61. Intensidade de emissão de fluorescência do PBFI em função da concentração dos surfactantes ImS3-14 e SB3-14. $[PBFI]=1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $pH=7,0$ (Tampão Bis-Tris) em $25^\circ C$	141
Figura 62. Histogramas das medidas de espalhamento dinâmico de luz na determinação dos diâmetros hidrodinâmicos das micelas de SB3-n: (A) SB3-12, (B) SB3-14, (C) SB3-16. Medidas realizadas em $pH=7,0$ (Tampão Bis-Tris) à $25,0^\circ C$. (A) $[SB3-12]= 0,05 \text{ mol L}^{-1}$; (B) $[SB3-14]= 0,01 \text{ mol L}^{-1}$; e (C) $[SB3-16]= 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	144
Figura 63. Espectros de emissão de fluorescência da sonda $PBFI^4$ na presença de PAIM em função da concentração do surfactante SB3-16. $[PBFI]=1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $[PAIM]=2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $pH=7,0$ (Tampão Bis-Tris) e $25^\circ C$	149
Figura 64. Intensidade de emissão do $PBFI^4$, em 512 nm , em função da concentração do surfactante zwitteriônico SB3-16. $[PBFI]=1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $[PAIM]=2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $pH=9,0$ (Tampão Tris) e $25^\circ C$	150
Figura 65. Sobreposição dos dados de intensidade de fluorescência do $PBFI^4$ em função da concentração de SB3-16, na presença e ausência do polímero PAIM. $[PBFI]=1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $[PAIM]=2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $pH=9,0$ (Tampão Tris) e $25^\circ C$	151

- Figura 66.** Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos supramoleculares PAIM/SB3-16 em função da concentração de SB3-16. $[PAIM]=2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=9,0$ (Tampão Tris) e $25,0^\circ\text{C}$ 152
- Figura 67.** Resultados de k_{obs} obtidos das reações de desfosforilação na presença de complexos PAIM/SB3-16 em função da concentração de SB3-16. $[BDNPP]=2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Reações realizadas em $25,0^\circ\text{C}$; $[PAIM]=2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} 9,0$ (Tampão Tris). 153
- Figura 68.** Espectros de absorção eletrônica da Mg-Chl b e Pheo b em etanol e em soluções aquosas de micelas P-123. $[Mg\text{-Chl b}] = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[Pheo b] = 5,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{P-123} = 1\%$, $m/v = 1,79 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 159
- Figura 69.** Ilustração de ligação de Mg-Chl b com micelas copoliméricas. Resultados da emissão de fluorescência de Mg-Chl b por titulação de F-127: (A) sobreposição de espectros e (B) ajuste da curva da intensidade de emissão em função da adição de surfactante. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico dos sistemas micelares (C) Tween 20, (D) Tween 80 e (E) F-127. $T = 25,0^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 461 \text{ nm}$ 164
- Figura 70.** Espectros de fluorescência de Mg-Chl b formulados em (A) F-127 e (B) Tween 20, em função da mesma concentração de íons iodeto. $[\text{Chl}] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25,0^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Para a Mg-Chl b $\lambda_{\text{exc}} = 461 \text{ nm}$ e para a Pheo b $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$. A seta indica a diminuição da intensidade à medida que o iodeto é adicionado. 167
- Figura 71.** Gráficos de Stern-Volmer de supressão de fluorescência para: (A) Mg-Chl b (B) Pheo b nos sistemas investigados de micelas não iônicas (1% m / v). $[\text{Chl}] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25,0^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ 168
- Figura 72.** Representação ilustrativa da localização de clorofilas b em sistemas modelo de micelas não-iônicas. 170
- Figura 73.** Sobreposição espectral de absorção do fotobranqueamento de Mg-Chl b em: (A) F-127 e (B) Tween 20. A cinética é ilustrada nas respectivas inserções. (C) Espectro do LASER a 658 nm sobreposto aos espectros de absorção de Mg-Chl b e Pheo b. (D) Relação entre a constante cinética de fotodegradação e as constantes de Stern-Volmer e as constantes de ligação para Mg-Chl b em sistemas micelares não iônicos. $[Mg\text{-Chl b}] = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25,0^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ 172
- Figura 74.** Variações de absorvância de UA e Mg-Chl b sob iluminação com clorofila (LASER, 658 nm) em etanol, a 25°C . As setas mostram o comportamento da absorvância

- durante a irradiação. Inserção: cinética da degradação da UA a 294 nm e fotodegradação de Mg-Chl b a 650 nm. 174
- Figura 75.** Sobreposição dos espectros de fluorescência obtidos da Mg-Chl b na presença de PAIM⁻, bem como a curva de ligação em 658nm em função da concentração do surfactante catiônico C₁₆TAB. [Mg-Chl b]=5,0x10⁻⁷ mol L⁻¹, [PAIM]=2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) e 25,0°C. 177
- Figura 76.** Sobreposição dos espectros de fluorescência obtidos da Mg-Chl b na presença de PAIM⁻, bem como a curva de ligação em 658nm em função da concentração do surfactante catiônico C₁₆TAB. [Mg-Chl b]=5,0x10⁻⁷ mol L⁻¹, [PAIM]=2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) e 25,0°C. 178
- Figura 77.** Sobreposição espectral cinética de absorção Mg-Chl b em (A) PAIM⁻/SB3-16, (C) SB3-16 e (E) PAIM⁻. Cinéticas de estabilidade no escuro da Mg-Chl b em (B) PAIM⁻/SB3-16, (D) PAIM⁻ e (F) SB3-16. [Mg-Chl b]=5,0x10⁻⁶ mol L⁻¹, [SB3-16]=1,0x10⁻⁴, [PAIM]=2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) em 25,0°C. 181
- Figura 78.** Sobreposição espectral cinética de absorção Mg-Chl b em (A) PAIM⁻/C₁₆TA⁺, (C) C₁₆TAB. Cinéticas de estabilidade no escuro da Mg-Chl b em (B) PAIM⁻/SB3-16, (D) PAIM⁻. [Mg-Chl b]=5,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ [C₁₆TAB]= 1,2x10⁻³, [PAIM]=2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) em 25,0°C. 182
- Figura 79.** Cinéticas das reações de fotobranqueamento da Mg-Chl b em complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16, PAIM⁻ e SB3-16. [Mg-Chl b]=5,0x10⁻⁶ mol L⁻¹, [SB3-16]= 1,0x10⁻⁴, [PAIM]=2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) em 25,0°C. 184
- Figura 80.** Constantes de ligação da Mg-Chl b em complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16 e micelas não-iônicas em função da constante de velocidade observada de fotobranqueamento. 185
- Figura 81.** (A) Espectros de absorção eletrônica das cinéticas da reação de foto-oxidação da Vitamina C através da Mg-Chl b em PAIM⁻/SB3-16. (B) Curva cinética de decaimento em 267 nm. [Mg-Chl b]=5,0x10⁻⁶ mol L⁻¹, [SB3-16]= 1,0x10⁻⁴, [PAIM]=2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) em 25,0°C. 187
- Figura 82.** Cinética de fotocatalise do trans-estilbeno por Mg-Chl b em complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16. [Mg-Chl b]=5,0x10⁻⁶ mol L⁻¹, [SB3-16]= 1,0x10⁻⁴, [PAIM]=2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) em 25,0°C. 189

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais resíduos de aminoácidos catalíticos, grupos funcionais laterais, formas iônicas e função catalítica. Fonte: Ref. ⁴²	38
Tabela 2. Constantes de velocidade da reação de desfosforilação do BDNPP em água, PAIM e nos complexos PAIM/C _n TAB. Fonte: O autor.....	125
Tabela 3 – Concentrações micelares críticas . [PBFI]=1,0x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , pH=7,0 (Tampão Bis-Tris) em 25°C.	142
Tabela 4. Rendimentos quânticos de fluorescência da sonda PBFI em micelas dos surfactantes zwitteriônicos investigados (valores obtidos nas concentrações dos patamares de fluorescência máxima). [PBFI]=1,0x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , pH=7,00 (Tampão Bis-Tris) em 25°C.	146
Tabela 5. Propriedades espectrofotométricas e fotofísicas de Mg-Chl b e Pheo b nos sistemas investigados. Comprimentos de onda máximos de absorção (λ), comprimentos de onda máximos de emissão (λ_{emis}), coeficientes de absorção molar (ϵ) e rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).....	161
Tabela 6. Constantes de ligação, CMC aparente, diâmetro micelar (D_H) e potencial zeta (ζ) para Mg-Chl b e Pheo b em sistemas surfactantes aquosos. [Chl] = 5,0 × 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , T = 25,0 ° C, pH = 7,25 e [NaCl] = 0,10 mol L ⁻¹ . Para a Mg-Chl λ_{Exc} = 461 nm e para a Pheo b λ_{Exc} = 435 nm. Todos os ajustes foram realizados usando a Eq. (1) com N = 1.	165
Tabela 7. Constantes de Stern-Volmer para Mg-Chl b e Pheo b em sistemas micelares. [Chl] = 5,0 × 10 ⁻⁷ molL ⁻¹ , T = 25,0 ° C, pH = 7,25 e [NaCl] = 0,10 molL ⁻¹ . Para a Mg-Chl b λ_{exc} = 461 nm e para a Pheo b λ_{exc} = 435 nm.	169
Tabela 8. Rendimentos quânticos de fluorescência da Mg-Chl B nos complexos supramoleculares PAIM/SB3-16, PAIM/C ₁₆ TAB. Os valores foram obtidos nas concentrações dos patamares de fluorescência máxima. [Mg-Chl b]=5,0x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , [PAIM]=2,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , pH=9,0 (Tampão Tris) e 25,0°C.	179

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
(em ordem alfabética)

ATP	Adenosina trifosfato
BDNPP	Bis(2,4-dinitro-fenil) fosfato
Bis-Tris	Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (Tampão)
BMIPP	Bis(2-(1-metil-1 <i>H</i> -imidazol-3-ínio-2-il)fenil) fosfato
CAC	Concentração agregacional crítica
CHES	Ácido <i>N</i> -Ciclohexil-2-aminoetanosulfônico (Tampão)
CMC	Concentração micelar crítica
C_nTAB	Brometo de <i>N</i> -Alquil- <i>N,N,N</i> -trimetil-amônio
C₁₆TAB	Brometo de <i>N</i> -Hexadecil- <i>N,N,N</i> -trimetil-amônio
C₁₄TAB	Brometo de <i>N</i> -Tetradecil- <i>N,N,N</i> -trimetil-amônio
C₁₂TAB	Brometo de <i>N</i> -Dodecil- <i>N,N,N</i> -trimetil-amônio
C₁₀TAB	Brometo de <i>N</i> -Decil- <i>N,N,N</i> -trimetil-amônio
DEDNPP	Dietil-2,4-dinitrofenil fosfato
D_H	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Enzima
EA	Enzima artificial
ESI	Ionização de elétronspray
ESI-MS	Espectrometria de massas por ionização de elétronspray
GA	Ácido geral
GAC	Catálise ácida geral
GB	Base geral
GBC	Catálise básica geral
INCT-Catálise	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Catálise em sistemas moleculares e nanoestruturados
<i>k</i>_{cat}	Constante de velocidade da reação catalisada
KIE	Efeito isotópico cinético
<i>k</i>_{H₂O}	Constante de velocidade da reação usando H ₂ O como solvente
<i>k</i>_{D₂O}	Constante de velocidade da reação usando D ₂ O como solvente
<i>k</i>_{uncat}	Constante de velocidade da reação não catalisada
<i>k</i>_{obs}	Constante de velocidade observada
<i>k</i>_{OH}	Constante de velocidade de segunda ordem para reação com hidróxido

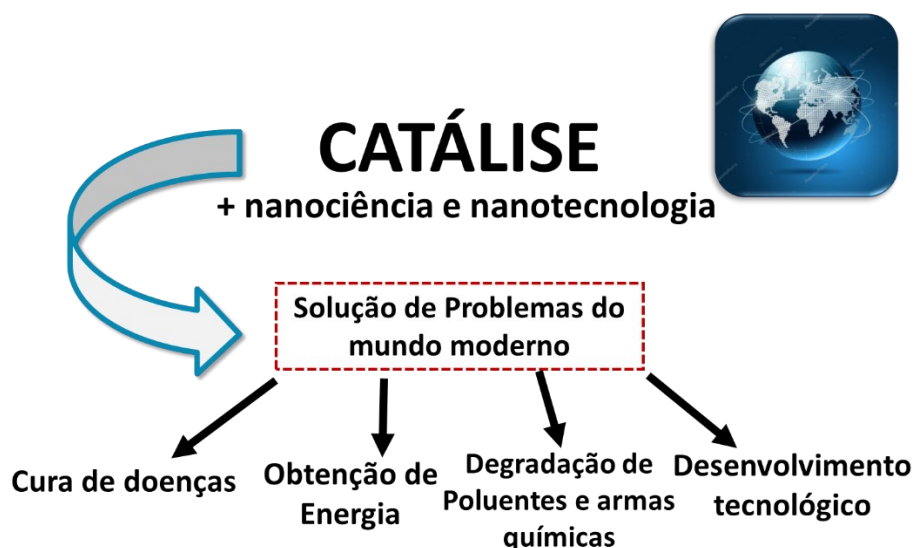
$k_{S_2, \text{PAIM}^-/\text{C}_n\text{TA}^+}$	Constante de velocidade de segunda ordem para reação com complexos supramoleculares $\text{PAIM}^-/\text{C}_n\text{TA}^+$
$k_{S_2, (\text{PAIM}^{+/-})/\text{C}_n\text{TA}^+}$	Constante de velocidade de segunda ordem para reação com complexos supramoleculares $(\text{PAIM}^{+/-})/\text{C}_n\text{TA}^+$
k_{w, PAIM^-}	Constante de velocidade de segunda ordem para reação com PAIM^-
$k_{w, \text{PAIM}^{+/-}}$	Constante de velocidade de segunda ordem para reação com $\text{PAIM}^{+/-}$
k_0	Constante de velocidade de primeira ordem para reação espontânea
LaCFI	Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais
Mg-Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
MS	Espectrometria de massas
m/z	Razão massa carga
NUC	Catálise nucleofílica
LG	Grupo abandonador
PAA	Poliácido-acrílico
PAIM	Poli(ácido acrílico) funcionalizado com 1-(3-aminopropil)-imidazol
PBFI	do inglês: Potassium Binding Isofuran
Pheo <i>b</i>	Feofitina <i>b</i>
Pheid <i>a</i>	Feoforbídeo <i>a</i>
pK_a	Logaritmo da constante de dissociação de uma espécie ácida (<i>KA</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse A	Ribonuclease A
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Py	Pireno
S	Substrato
SA	Sítio ativo
SN₁	Substituição nucleofílica unimolecular
SN₂	Substituição nucleofílica bimolecular
SN₂(P)	Substituição nucleofílica bimolecular no átomo de fósforo
UV-Vis	Região do espectro eletromagnético compreendida desde o ultravioleta até o visível
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitros

1. INTRODUÇÃO

1.1. A catálise e as enzimas como fonte de inspiração

A catálise é uma área da química que associada à nanociência e à nanotecnologia vem atraindo grande interesse tanto do mundo científico¹⁻⁶ quanto de setores que buscam resolver e sanar os problemas da sociedade moderna (Figura 1).⁷⁻¹² No setor industrial, por exemplo, é estimado que cerca de 90% dos produtos químicos são obtidos através de processos catalíticos.¹² Isso tudo se deve ao fato de que a catálise é uma poderosa ferramenta com posição central na ciência, pois possibilita com que reações químicas que eventualmente eram inviáveis em termos temporais tornem-se altamente viáveis.^{9,13,14} De modo geral, a catálise possibilita caminhos reacionais alternativos de maior velocidade através de um catalizador que é regenerado ao término da reação.

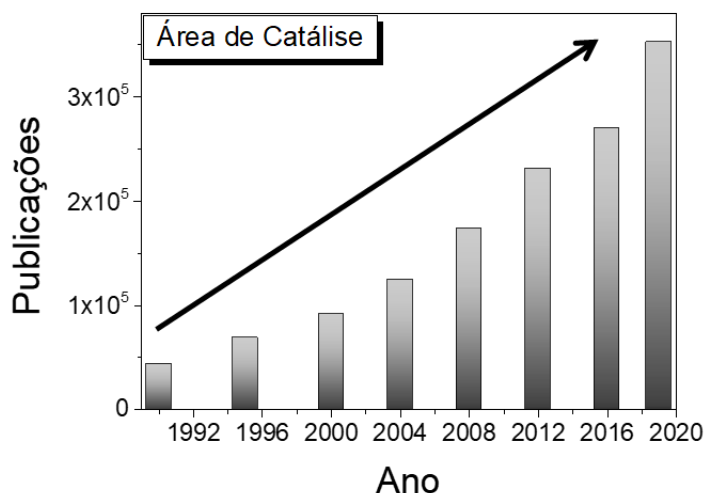
Figura 1. Representação esquemática da catálise como solução para problemas do mundo moderno.



O mundo científico tem ainda investido fortemente seus esforços na área de catálise. Tal grande interesse se justifica pelas muitas perguntas não totalmente respondidas e ao grande impacto que tal área pode causar na sociedade moderna, tal afirmação pode ser confirmada pelo aumento expressivo e progressivo de publicações

científicas na área (Figura 2). Além disso, são quarenta grandes cientistas que foram laureados pelo Prêmio Nobel de Química por seus trabalhos e significativos avanços na área de catálise, isso é, considerando as premiações entre os anos de 1902 (ano de criação do Premio Nobel) e 2019 (última premiação antes finalização dessa Tese de Doutorado). Assim, as inúmeras premiações pelo Prêmio Nobel de Química conferidas à essa área, outorgam sua alta significância dentre as mais importantes e prestigiadas áreas da ciência. Dentre os grandes cientistas premiados pelo prêmio Nobel de Química, na área de catálise, destaca-se: Emil Fischer, Linus Pauling, e mais recentemente Jean-Marie Lehn e Frances Arnold.

Figura 2. Publicações científicas na área de catálise nos últimos anos. Pesquisa realizada no website “Portal de Periódico da Capes” buscando por palavras-chaves dos artigos (Palavras-chaves no inglês: *Catalytic, Catalysis, Catalysts, Catalytically, Nanoreactors, Artificial Enzymes, Enzymes e Nanocatalysis*). Acesso: 10/01/2020. Fonte: O Autor.

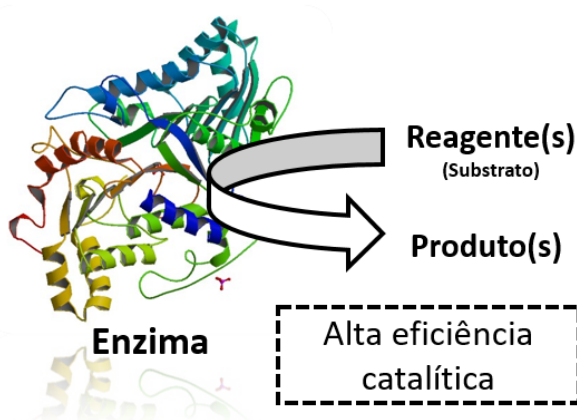


As reações químicas ocorrem por toda parte e em todo planeta, desde o crescimento e desenvolvimento de plantas, animais e seres humanos, também no ar, água, solo e subsolo, na interação da luz com a matéria, até mesmo nas mais avançadas tecnologias desenvolvidas pelo homem, em que, de fato, a catálise está presente em grande parte dessas reações.^{7-9,12,15,16} Por isso, a catálise é uma área da ciência que possui uma ampla gama de aplicações, sendo algumas dessas: síntese e desenvolvimento de fármacos e compostos orgânicos,^{17,18} obtenção de combustíveis (energia) como etanol e biodiesel,¹⁹⁻²¹ terapia genética,²²⁻²⁴ nanociência,^{1,4,5} nanomedicina,²⁵⁻²⁷ terapia

fotodinâmica (fotocatálise via oxigênio singleto)²⁸⁻³¹, indústrias^{11,12} (alimentos, produtos de limpeza, bebidas, cosméticos, polímeros e etc.), química assimétrica,^{32,33} química fina,^{34,35} detoxificação química,³⁶⁻³⁸ entre outras aplicações. Entretanto, a área de catálise ainda está em crescente desenvolvimento, especialmente no que se refere ao design de catalisadores mais eficientes, seletivos e que contribuam efetivamente para o desenvolvimento sustentável, aspecto estratégico da Química Verde.^{4,10,39,40} Nesse sentido, as enzimas são fonte de grande inspiração em catálise, uma vez que contemplam todas essas qualificações almejadas.

As enzimas são catalisadores naturais extraordinários que possibilitam acelerar eficientemente reações em sistemas biológicos em ordens superiores a 10^6 vezes (Figura 3).⁴¹⁻⁴³ Tal poderoso efeito catalítico possibilita com que reações extremamente lentas, que demorariam até milhões de anos, ocorram em escala de horas, minutos ou até mesmo segundos. Assim, permitem que reações vitais de organismos vivos se processem em ambientes aquosos e em condições brandas, como: temperaturas, pressões, força iônica e pH fisiológicos.^{44,45} A impressionante capacidade de acelerar reações químicas torna esses exímios catalisadores como essenciais ao surgimento, desenvolvimento e manutenção da vida no planeta Terra.

Figura 3. Catálise enzimática: categoria catalítica de alta eficiência. Fonte: O Autor.



Além disso, sua notável complexidade nanoestrutural e alto efeito catalítico torna as enzimas substancialmente intrigantes e seu funcionamento e mecanismos de catálise ainda não completamente elucidados. Sendo assim, a compreensão mecanística

dessas enzimas revelam os segredos desenvolvidos pela natureza de uma catálise de alta eficiência. Por isso, diversos pesquisadores têm se dedicado extensivamente na elucidação dos mecanismos enzimáticos visando a modelagem bioquímica e o desenvolvimento de catalisadores bioinspirados, fortalecendo a ciência de base e possibilitando diversas aplicações tecnológicas.⁴⁶⁻⁴⁹

1.2. Enzimas artificiais: design sob uma estratégia biomimética

“Eu prevejo num tempo futuro que a química fisiológica não só fará uso de enzimas naturais, mas virá também a criar enzimas sintéticas” Declaração de Emil Fischer em 1902 (Laureado pelo Prêmio Nobel de 1902).⁵⁰

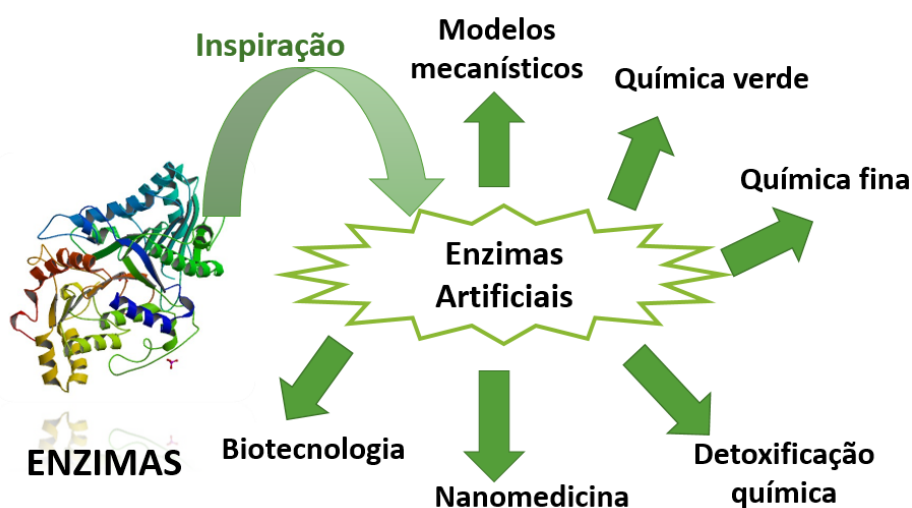
Apesar das enzimas naturais serem catalisadores altamente eficientes e apresentarem diversas qualificações almejadas em catálise, elas também apresentam uma série de desvantagens. Algumas dessas são: baixa estabilidade operacional, desnaturando-se facilmente por fatores como: temperatura, força iônica, solvente, entre outros. Apresentam dificuldades na sua recuperação e reciclagem, sensibilidade da atividade catalítica frente as condições do ambiente, e ainda altos custos na sua obtenção e purificação, dificultando consideravelmente sua aplicação em diversos setores.¹ Por isso, o desenvolvimento de enzimas artificiais vem atraindo grande interesse em catálise tanto na ciência base quanto na ciência aplicada.^{1,49,51,52} Assim, a supracitada previsão de Emil Fischer se concretiza na atualidade,⁵⁰ afinal, a ciência vivencia hoje tempos em que enzimas sintéticas (enzimas artificiais) vêm sendo extensivamente desenvolvidas, entendidas e aplicadas.^{49,51-54}

As enzimas artificiais (EA) são catalisadores sintéticos que, em geral, apresentam eficiência e/ou seletividade comparável a enzimas naturais. Além disso, também apresentam vantagens em relação a elas, como: relativo baixo custo, estabilidade operacional, síntese controlada, versatilidade estrutural, controle e design das propriedades catalíticas, mecânicas, térmicas e óticas, entre outras.¹ Nesse contexto, a nanociência e a nanotecnologia ganham destaque pois fornecem suporte e subsídios para a projeção desses catalisadores baseados em diversos nanomateriais com propriedades controladas e de relativo baixo custo. Os principais materiais empregados no desenvolvimento das EA são: polímeros,^{2,55-64} nanotubos de carbono,^{65,66} peptídeos sintéticos,⁶⁶⁻⁷¹ macrociclos,⁷²⁻⁷⁴ nanofibras,⁷⁵ hidrogéis,⁷⁵ nanopartículas de sílica mesoporosa,^{1,76,77} nanocompósitos de grafeno,¹ óxidos de grafeno,^{1,3,78,79} complexos supramoleculares polímero/surfactante,⁸⁰⁻⁸⁶ entre outros. Nesse campo de pesquisa, os polímeros, peptídeos sintéticos e complexos supramoleculares polímero/surfactante vêm ganhando destaque devido as suas maiores similaridades estruturais, conformacionais e

catalíticas com enzimas, uma vez que tais materiais são altamente apropriados para as condições ótimas pretendidas.

O design racional de enzimas artificiais também possibilita uma maior compreensão de conceitos fundamentais em catálise enzimática bem como aplicações práticas que possibilitam solucionar diversos problemas da sociedade moderna.^{1,49,52,78,87} Na Figura 4, são apresentadas as potenciais aplicações de enzimas artificiais desenvolvidas sob uma estratégia biomimética.

Figura 4. Enzimas artificiais multifuncionais desenvolvidas sob uma estratégia biomimética e suas potenciais aplicações. Fonte: O autor.



Algumas das principais aplicações de enzimas artificiais são: (a) Biotecnologia: exames clínicos, engenharia genética, clonagem, entre outros.^{17,22,88} (b) Nanomedicina: terapia genética, tratamento de câncer, atividade antifúngica, tratamento de doenças neurodegenerativas e causadas por deficiência enzimática, entre outras.^{17,22,25,89,90} (c) Detoxificação química: degradação de pesticidas e armas químicas,^{36,80,91,92} sendo esses assuntos estratégicos de saúde pública e paz mundial (d) Química Fina: aplicação em etapas chaves da síntese de moléculas e intermediários de interesse comercial.^{1,93} (e) Química Verde: desenvolvimento de catalisadores limpos, livres de metais pesados, biocompatíveis, biodegradáveis e sustentáveis.^{1,39} (f) Modelos mecanísticos enzimáticos: fortalecimento da ciência de base visando a maior compreensão dos fenômenos e efeitos que regem a catálise enzimática.^{47,52,72,80,94}

Contudo, por um lado, as enzimas artificiais apresentam várias vantagens, potencialidades e são extremamente promissoras, por outro, as enzimas naturais ainda são muito mais eficientes e seletivas. Assim, uma notável alternativa para otimização do desenvolvimento de enzimas artificiais seria empregar a catálise biomimética como estratégia central no design racional de enzimas artificiais.^{48,49,55,87,95}

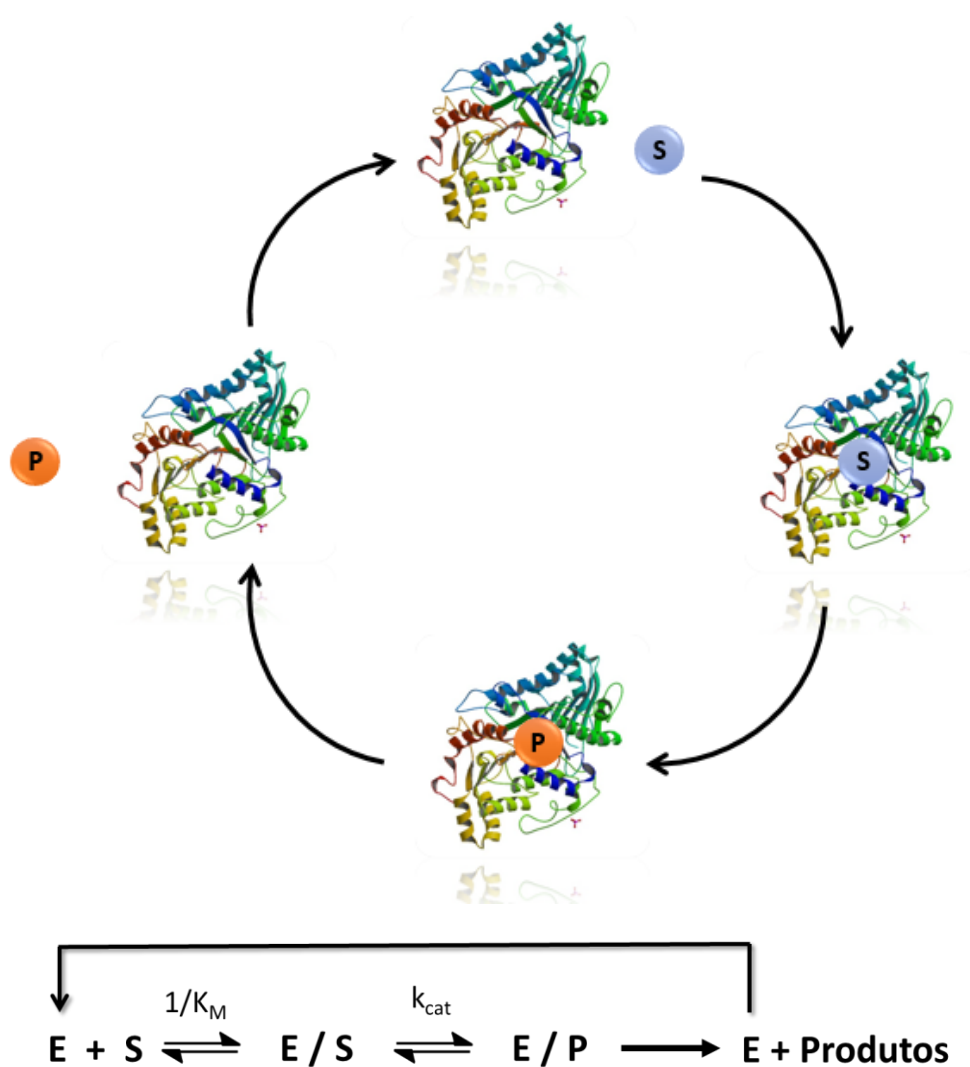
A catálise biomimética é uma abordagem que imita e/ou se inspira em algumas características específicas de catalisadores biológicos. Nessa promissora e proeminente categoria, as enzimas são uma verdadeira lição de catálise, o que as torna alvo de grande inspiração.^{48,49,87} Nesse sentido, algumas características comumente imitadas são: grupos catalíticos, grupos ligantes, efeitos hidrofóbicos e a utilização de nanoestruturas como catalisadores.^{48,49,75,80} Assim, alguns conceitos fundamentais devem ser abordados e detalhados com o objetivo de explorar e extrair todo o potencial que a catálise enzimática possui, especialmente no que se refere à eficiência, seletividade e também a versatilidade catalítica.

1.3. Fundamentos de catálise enzimática

1.3.1. Princípios gerais, modelos e aspectos energéticos

A catálise enzimática ocorre por meio da ligação de um substrato, por interações intermoleculares e/ou covalentes, em uma região ou cavidade específica da enzima que apresenta atividade catalítica. Tal região é comumente denominada como sítio ativo (SA).^{42,96,97} O Esquema 1 ilustra os princípios gerais da ação catalítica.

Esquema 1



A ligação entre enzima (E) e substrato (S) propicia a formação do complexo E/S, que é avaliada em termos termodinâmicos através da constante de ligação do substrato na enzima (K_s) ou pela constante de Michaelis-Menten (K_m), em que K_s fornece informações

sobre a magnitude da interação entre a enzima e o substrato (geralmente preferida pelos químicos), enquanto K_m é uma constante de dissociação (geralmente preferida pelos farmacêuticos e bioquímicos), sendo essas constantes inversamente proporcionais e correlacionadas pela seguinte equação: $K_s=1/K_m$.^{16,42}

Em geral, a formação do complexo E/S possibilita que a catálise enzimática se processe. Consequentemente, tem-se a formação do produto (P) que é liberado e difundido no meio reacional regenerando a enzima. Normalmente tal categoria catalítica é avaliada através da velocidade da reação catalisada (V_{cat}) ou pela constante de velocidade cinética catalisada (k_{cat}), sendo estas equivalentes. O efeito catalítico de enzimas é comumente expresso por meio da razão entre k_{cat} e a constante de velocidade da reação não catalisada (k_{uncat}), ou seja, k_{cat}/k_{uncat} , em que essa razão fornece a importante informação de quantas vezes a velocidade da reação catalisada é maior que a velocidade da reação não catalisada. Além disso, a razão k_{cat}/K_m também permite avaliar o efeito catalítico de enzimas, em que essa razão exprime a especificidade da catálise, sendo que, quanto maior essa razão, maior é a especificidade que a enzima possui em relação ao dado substrato.^{16,42}

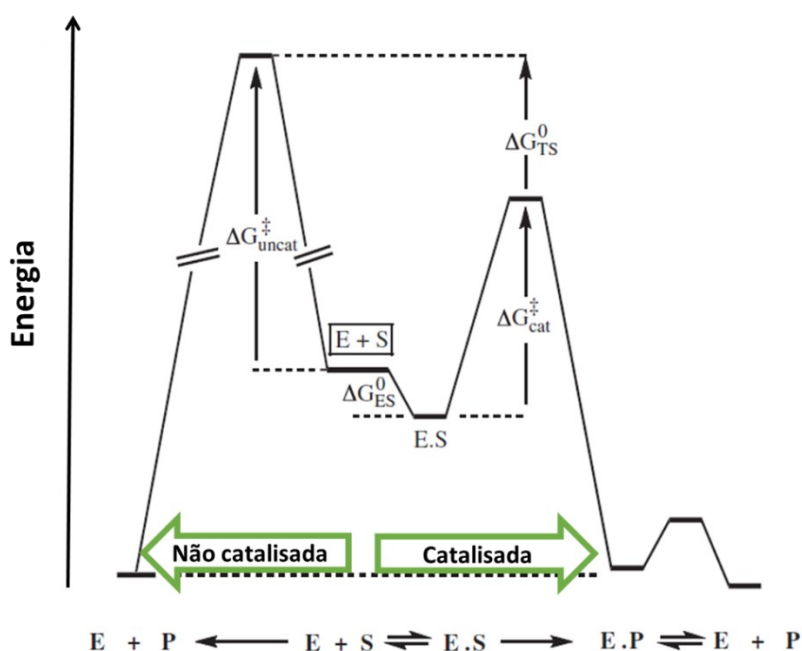
Muitos modelos foram elaborados na tentativa de explicar o funcionamento e alta atividade da catálise enzimática, assim, serão abordados aqui alguns dos mais difundidos.

O primeiro modelo mais difundido foi o “*chave-fechadura*” proposto por Emil Fischer, ganhador do Prêmio Nobel de 1902. Esse modelo se baseava no princípio de que o sítio ativo da enzima era complementar ao substrato, e, por isso, as enzimas eram seletivas e eficientes.^{16,50} Tal modelo foi amplamente aceito até a proposição de Linus Pauling, ganhador do Prêmio Nobel de 1954. Em seu modelo, Pauling descreve que o sítio ativo é complementar ao estado de transição da reação catalisada.⁹⁸ Apesar de existirem modelos posteriores aos de Pauling, ainda hoje, muitos estudiosos consideram e se baseiam em suas considerações. Um exemplo disso é o modelo da “Hipótese Covalente”, que se apresenta também como extensão paradigma de Pauling.⁹⁶ Esse modelo explica catálises enzimáticas com incrementos na velocidade da reação superiores a 10^{11} vezes, o qual considera a formação de ligações covalentes no sítio ativo antes da catálise enzimática. Além desses modelos, a “teoria espaço-temporal” de Frederic Menger auxilia efetivamente na compreensão da eficiência catalítica.⁹⁹ Sendo que essa

teoria propõe que a proximidade do substrato aos grupos catalíticos e o tempo que os grupos permanecem próximos são a essência da catálise enzimática.⁹⁹

Nesse sentido, tem-se a inerente relevância de compreensão dos princípios de catálise enzimática em termos energéticos, uma vez que todas as teorias mais recentes consideram e também se fundamentam nesses aspectos^{42,44,96,98,100}, as quais consideram o estado de transição, energia livre, entalpia, entropia e ligação do substrato na enzima (proporcional ao tempo de proximidade dos grupos). Por isso, na Figura 5 são apresentados aspectos energéticos da catálise enzimática comparando com os da reação não catalisada.

Figura 5. Diagrama de energia livre da catálise enzimática e da reação não catalisada. Fonte: Ref.⁴²



No diagrama da Figura 5, é possível observar dois caminhos partindo de um sistema contendo a Enzima (E) + Substrato (S): (i) A reação não catalisada pela enzima, no qual o substrato é convertido em produto passando por um estado de transição de alta energia ($\Delta G^{\ddagger}_{\text{uncat}}$); e (ii) a reação catalisada pela enzima, formando inicialmente um complexo E/S de mais baixa energia do que o substrato anteriormente em solução, conferindo um $\Delta G^{\circ}_{E/S}$ (relacionado com K_s). O complexo E/S fornece condições para a catálise enzimática, passando por um estado de transição de mais baixa energia ($\Delta G^{\ddagger}_{\text{cat}}$). Isso possibilita que a reação se processe muito mais rapidamente, formando o mesmo

produto que na reação não catalisada. Finalmente, passa por um último estado de transição de liberação do produto permitindo sua difusão no meio reacional.⁴²

Apesar das reações catalisadas e não catalisadas formarem os mesmos produtos, as reações claramente passam por caminhos distintos e, conseqüentemente, os mecanismos de reação são também distintos.^{42,100} Além disso, para entender o que faz das enzimas tão especiais, faz-se necessário conhecer mais a respeito da natureza molecular das enzimas.

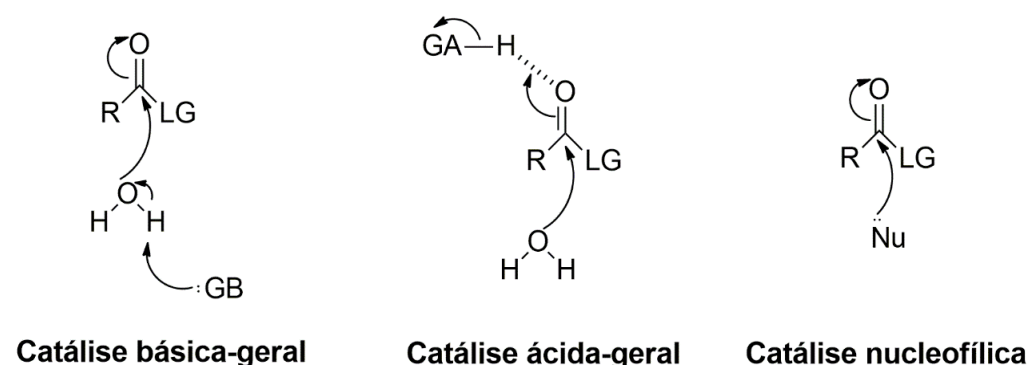
1.3.2. Enzimas: uma abordagem molecular

As enzimas são proteínas em sua grande maioria, sendo essas formadas por longas cadeias de aminoácidos ligados por ligações peptídicas (ligações amidas). A sequência primária é dada pela combinação dos 20 L- α -aminoácidos naturais principais, sendo que, na síntese proteica, cada aminoácido é inserido na cadeia peptídica através de uma complexa máquina molecular de biossíntese, o ribossomo, que funciona como resposta à mensagem recebida do código genético por meio do RNA mensageiro. Depois que os aminoácidos são ligados através da ligação peptídica, passam a ser denominados resíduos de aminoácidos no peptídeo ou proteína.^{16,42}

A sequência de resíduos de aminoácidos determina a estrutura secundária, alfa-hélice ou folha- β , que, conseqüentemente, também determina a estrutura terciária tridimensional, o enovelamento proteico. Além disso, a sequência dos resíduos e sua conformação também determina as funções da proteína, as quais são: estruturais, de transporte, sinalização, catálise entre outras.^{16,42} Nesse sentido, quando a proteína apresenta função catalítica passa então a ser denominada enzima. A função catalítica ocorre devido à formação de regiões com resíduos de aminoácidos catalíticos, associado a outros fatores como: ligantes, cofatores, coenzimas, moduladores alostéricos e/ou efeitos hidrofóbicos.^{16,42} Assim, mecanismos de reações e efeitos que contribuem para a catálise enzimática são complexos devido à associação de vários efeitos e, ainda, como anteriormente citado, não foram completamente elucidados. Por isso, muitos grupos de pesquisa vêm estudando extensivamente modelos e mecanismos de reações em catálise enzimática, os quais devem ser utilizados como base visando o desenvolvimento de conhecimentos ainda mais avançados na área.^{42,44,46,96,99,100}

Foi bem reportado na literatura que muitas enzimas atuam com os mesmos mecanismos gerais,⁴² os quais envolvem a ação de resíduos de aminoácidos catalíticos amparados por cofatores inorgânicos formando complexos catalíticos com íons de Mg, Zn, Cu, Co, Fe, Mn entre outros.^{42,100-104} Esses complexos comumente coordenam substratos e/ou hidróxidos altamente nucleofílicos, propiciando seu alto efeito catalítico. Outras atuam em conjunto com coenzimas como NAD, NADH, FAD, FADH, ATP, GTP entre outros, como no caso das oxirredutases, quinases, entre outras.^{16,42,100,105,106} Contudo, algumas enzimas atuam com mecanismos puramente orgânicos e que envolvem somente os resíduos aminoácidos catalíticos (na próxima seção trataremos em detalhe resíduos de aminoácidos catalíticos).⁴² Essas enzimas possuem três mecanismos reacionais principais, os quais são: Catálise ácida-geral, catálise básica-geral e catálise nucleofílica,⁴² a representação desses mecanismos na etapa determinante da reação em ambientes aquosos são apresentados na Figura 6.

Figura 6. Representação dos Mecanismos de catálise ácida-básica geral e catálise nucleofílica na etapa determinante da reação em ambientes aquosos. Fonte: O autor.



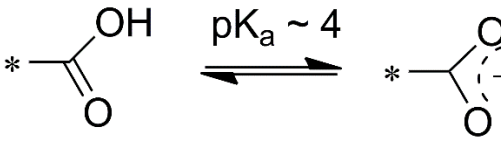
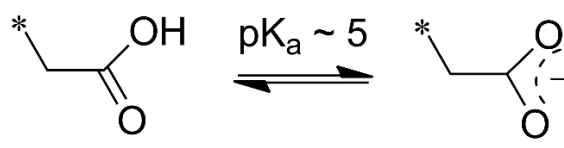
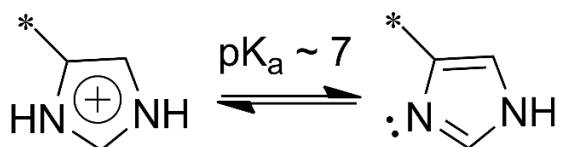
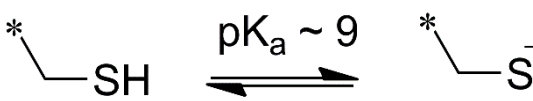
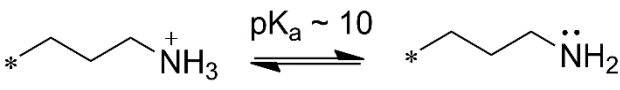
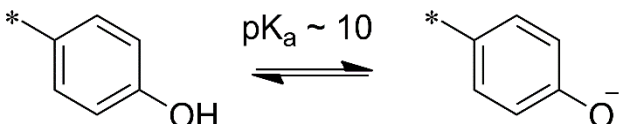
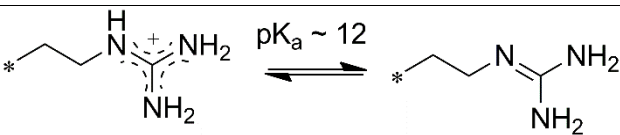

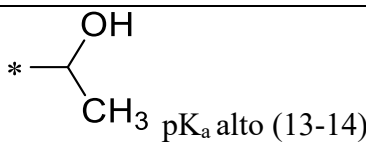
Em ambientes aquosos, assim como sistemas biológicos, (i) a catálise básica-geral (GBC) ocorre por meio da transferência de próton de uma molécula de água para uma base-geral (GB), ao passo que tal molécula de água aumenta sua densidade eletrônica, tornando-se mais nucleofílica, e, conseqüentemente, atacando o substrato.⁴² (ii) Na catálise ácida-geral (GAC), um grupo ácido-geral (GA) transfere um próton para o substrato reduzindo a densidade eletrônica do centro eletrofílico do substrato (no exemplo: o carbono carbonílico), assim, tornando-se mais suscetível ao ataque nucleofílico da água. (iii) Já na catálise nucleofílica (NUC), na etapa determinante da reação um nucleófilo ataca diretamente o substrato, e, em uma etapa posterior, o intermediário é atacado por uma molécula de água regenerando o nucleófilo. Em todos

os mecanismos, em etapas subsequentes, se tem a liberação do grupo abandonador (LG) e formação do produto hidrolisado. Ainda, muitas enzimas atuam com mecanismos bifuncionais cooperativos associando GAC + NUC ou GAC + GBC, ou podem atuar com 2 ou mais mecanismos simultâneos de forma independente em diferentes proporções reacionais.

1.3.3. Aminoácidos e Resíduos de aminoácidos catalíticos

Os aminoácidos (aa) se diferem entre si somente por sua cadeia lateral (CL), sendo justamente essa CL que confere as propriedades específicas de cada aminoácido. Contudo, alguns aa apresentam similaridades em suas propriedades químicas e eletrostáticas, sendo classificados como: apolares/hidrofóbicos (glicina, alanina, prolina, valina, leucina e isoleucina), polares não carregados (serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina), aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), polares carregados positivamente (lisina, arginina e histidina) e polares carregados negativamente (aspartato e glutamato).¹⁶ Em proteínas, os resíduos de aminoácidos apolares e aromáticos proporcionam a formação de cavidades hidrofóbicas, enquanto grupos polares e polares carregados favorecem a solubilidade da proteína em ambientes aquosos, o balanço entre as forças hidrofóbicas e hidrofílicas propicia o enovelamento proteico. Além disso, alguns resíduos de aminoácidos se destacam dos demais por apresentarem propriedades catalíticas em proteínas, estando envolvidos nos mecanismos de catálise enzimática reportados na literatura.^{42,100,107} Na Tabela 1, são apresentados os principais resíduos de aminoácidos catalíticos, grupos funcionais laterais, suas formas iônicas e função catalítica.⁴²

Tabela 1. Principais resíduos de aminoácidos catalíticos, grupos funcionais laterais, formas iônicas e função catalítica. Fonte: Ref.⁴²

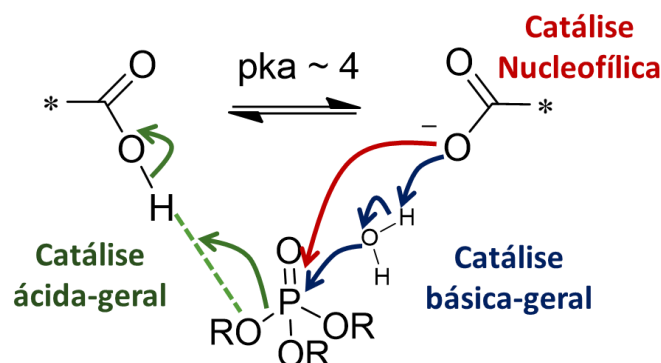
R. Amino ácido	Grupo funcional da cadeia lateral	Função catalítica do grupo
Ácido aspártico (Asp, D)		O grupo carboxilato atua como catalizador básico-geral ou nucleofílico, pois em pH7 se encontra na sua forma desprotonada. Ainda, pode atuar como catalizador ácido-geral em condições especiais.
Ácido glutâmico (Glu, E)		O ânion carboxilato atua como catalizador básico-geral ou como nucleófilo.
Histidina (His, H)		O imidazol está protonado em aproximadamente 50% em pH7, e pode atuar neste pH como catalizador ácido-geral, básico-geral e como nucleófilo.
Cisteína (Cys, C)		O grupo tiolato é um poderoso nucleófilo, e mais de 1% pode estar presente em ambientes controlados no sítio ativo, no qual seu pKa é reduzido.
Lisina (Lys, L)		NH ₂ é um bom nucleófilo, especialmente para C=O, e seu pKa pode ser reduzido em condições controladas do sítio-ativo.
Tirosina (Tyr, Y)		Um oxianion é um bom nucleófilo, especialmente para fósforos.
Arginina (Arg, R)		O grupo guanidínio geralmente está protonado. Assim, um forte estabilizador e ligante para grupos negativamente carregados como CO ₂ ⁻ e PO ₂ ⁻ .
Serina (Ser, S)		O grupo OH geralmente não é ionizável em ambientes biológicos, mas pode atuar como nucleófilo através de uma transferência de próton para uma base-geral.
Treonina (Thr, T)		

Os resíduos de aminoácidos catalíticos apresentados na Tabela 1 possuem uma característica em comum: todos apresentam equilíbrios ácido-base (inclusive a arginina, serina, treonina com seus altos pK_a que as possibilita atuar de modo diferenciado). Assim, muitos desses resíduos de aa podem ser encontrados na forma protonada (ácida) e na forma desprotonada (básica) dependendo do pH do meio e/ou pH microlocal. No sítio ativo, a forma protonada pode atuar como catalisador ácido-geral, enquanto a forma desprotonada pode atuar como um catalisador básico-geral ou como um catalisador nucleofílico.^{16,42}

Formas desprotonadas com maior pK_a (mais básicos/nucleofílicos) e maior polarizabilidade (maior maciez) tendem atuar preferencialmente como catalisadores nucleofílicos, como no caso da tirosina, lisina e especialmente da cisteína. Já a arginina possui pK_a próximo de 12, logo, em ambientes biológicos este resíduo está quase sempre protonado e carregado positivamente, o que o faz um excelente estabilizador e ligante de substratos negativamente carregados ou com considerável momento de dipolo, como por exemplo ésteres fosfato, ésteres carboxílicos e amidas. A serina e treonina são resíduos com pK_a ainda maiores entre 13 – 14, portanto não são ionizáveis em ambientes biológicos. Porém, em condições especiais e controladas no sítio ativo, esses resíduos transferem um próton para um grupo catalisador básico-geral e atuam como nucleófilos.⁴²

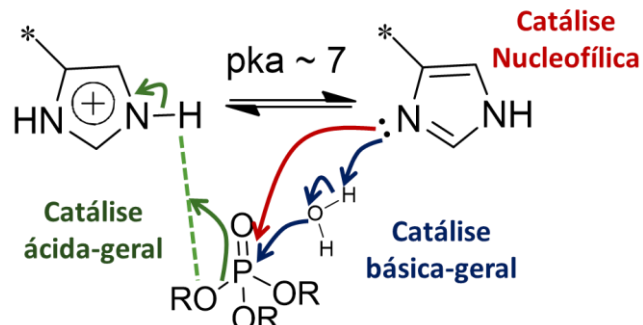
As formas desprotonadas com menor pK_a , como no caso do aspartato e glutamato que possuem grupos carboxilatos, atuam como catalisadores básicos-gerais ou como nucleófilos. Enquanto isso, suas formas protonadas de grupos ácidos carboxílicos podem atuar como catalisadores ácidos gerais em condições especiais controladas no sítio ativo ou em sistemas biológicos de baixo pH. Assim, é importante destacar que o grupo ácido carboxílico/carboxilato dos resíduos de aminoácidos do ácido aspártico e glutâmico são grupos catalíticos muito versáteis, atuando como catalisadores ácido-básico geral e nucleofílico, Esquema 2, nos mecanismos de catálise de diversas enzimas.⁴²

Esquema 2



No entanto, o resíduo de aminoácido de histidina é de longe o grupo catalítico mais versátil em enzimas. Isso se deve ao fato de que o grupo imidazol presente neste resíduo apresenta um pK_a muito próximo de 7, ou seja, no pH fisiológico do plasma sanguíneo, praticamente 50% está na forma protonada (imidazólio) e 50% na sua forma desprotonada (imidazol), podendo atuar simultaneamente e cooperativamente como catalisador ácido-geral, básico-geral e nucleofílico (Esquema 3).⁴²

Esquema 3



Portanto, apesar de vários resíduos de aminoácidos atuarem em catálise enzimática, o ácido aspártico e histidina se destacam como excelentes fontes de inspiração no desenvolvimento de enzimas artificiais sob uma estratégia biomimética.^{42,43,47,75,80,108} Tal destaque se deve principalmente à alta eficiência e expressiva versatilidade catalítica dos grupos imidazólio/imidazol e ácido carboxílico/carboxilato, o que os permite atuar como exímios catalisadores no mecanismo de hidrólise de diversos substratos biologicamente importantes, como: DNA, RNA, fosfolipídios, proteínas, neurotransmissores, entre outros, clivando proficientemente ésteres de fosfato, ésteres carboxílicos, amidas, entre outros grupamentos.^{42,43,46,72,80,99,109} Na próxima seção, serão

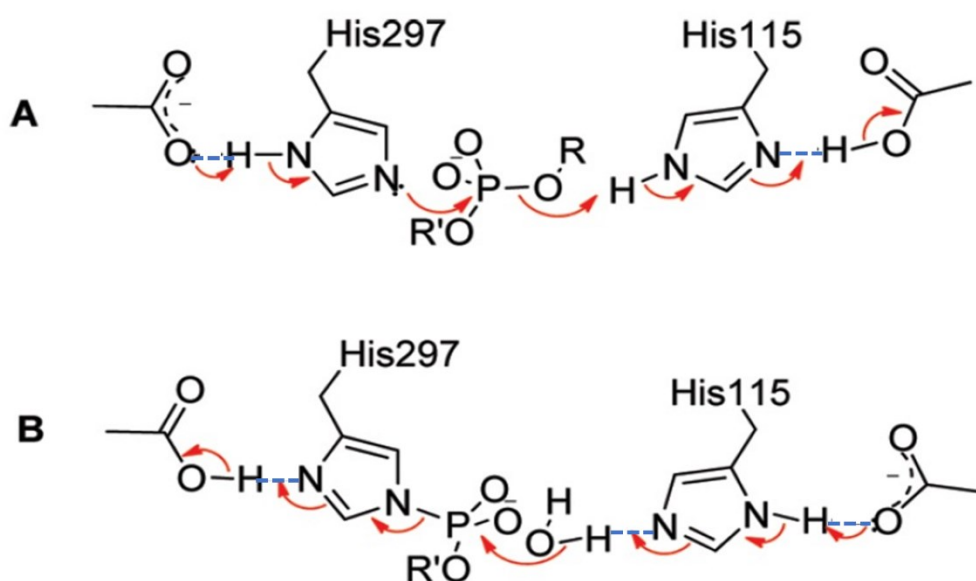
apresentados alguns exemplos de mecanismos de catálise enzimática envolvendo os grupos imidazóis e carboxilatos visando o desenvolvimento de enzimas artificiais.

1.3.4. Exemplos de mecanismos de catálise enzimática

Fosfolipases D

A superfamília das fosfolipases D são enzimas proficientes na clivagem de diésteres de fosfato, sendo uma das poucas classes de enzimas capazes de clivar a estável ligação P-OR do DNA sem o envolvimento de metais em seu mecanismo de atuação. Essas enzimas são caracterizadas pela sequência de resíduos motivo HisXLys(X)₄Asp(X)₆GlySerXAsn, que ocorre duas vezes em uma conjugação proteica tipicamente dimérica. Essa conjugação fornece dois resíduos de histidina precisamente posicionados para catálise enzimática bifuncional, sendo amparados por dois resíduos de aspartato também perfeitamente posicionados.^{17,42,46,107} O mecanismo geral de catálise enzimática da superfamília das fosfolipases D é apresentado na Figura 7.

Figura 7. Mecanismo de catálise enzimática da superfamília das fosfolipases D. Fonte: Ref.⁴⁶



As fosfolipases D atuam por um mecanismo com duas etapas concertadas. A etapa (A) é uma reação de fosforilação do imidazol e desfosforilação do grupo O-R, que ocorre por meio do ataque nucleofílico do imidazol (resíduo His297) no átomo de P do diéster de fosfato (amparado por um grupo carboxilato), em que esse imidazol atua como catalisador nucleofílico em uma reação $SN_2(P)$. Concomitantemente, o grupo

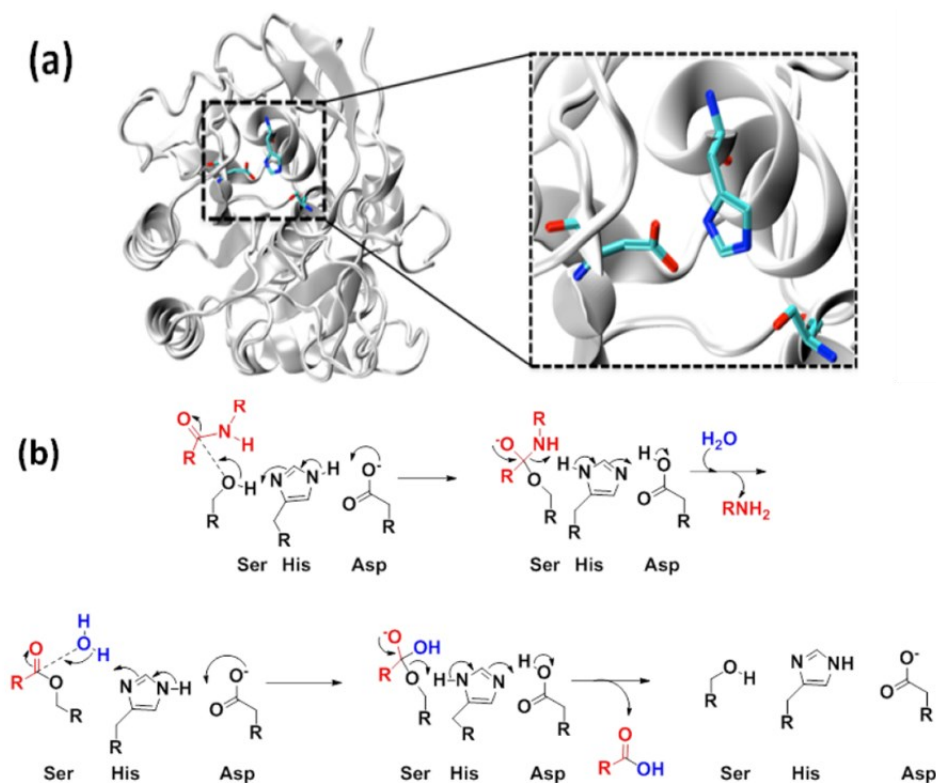
abandonador O-R recebe um próton do imidazol (resíduo His115) amparado por um grupo ácido carboxílico, o qual atua como catalisador ácido geral na liberação do grupo abandonador e formação do intermediário fosforil-imidazol com o resíduo His297. Sumarizando, a etapa (A) conta com o mecanismo de catálise bifuncional por dois grupos imidazol do tipo NUC + GAC amparada por grupos ácido carboxílico e carboxilato.^{42,46,107}

A etapa (B) é uma reação de hidrólise do intermediário fosforilimidazol, em que o grupo carboxilato ampara o imidazol do resíduo de His115 para atuar como catalisador básico geral, que por sua vez ativa a molécula de água para o ataque nucleofílico no átomo de P do intermediário fosforil-imidazol. Assim, o grupo imidazol é desfosforilado e regenerado pela assistência da transferência de próton do grupo ácido carboxílico para o imidazol. Sumarizando, a etapa (B) conta com o mecanismo de GBC por um grupo imidazol amparado por grupos ácido carboxílico e carboxilato.^{42,46,107}

Serina proteases

As serina proteases atuam notavelmente na clivagem de ligações amidas/peptídicas de diversas proteínas. Essas enzimas possuem uma sequência específica de resíduos de aminoácidos que propicia a formação de uma cavidade hidrofóbica contendo a tríade catalítica das serina proteases. Tal tríade é constituída pelos resíduos de aspartato (Asp), histidina (His) e serina (Ser), que são precisamente bem posicionados no sítio ativo.^{42,67} O sítio ativo (a) e o mecanismo de catálise em 4 etapas (b) da α -Quimotripsina são apresentados na Figura 8.

Figura 8. Sítio ativo (a) e o mecanismo de catálise enzimática (b) das serina proteases. Fonte: Ref.⁶⁷



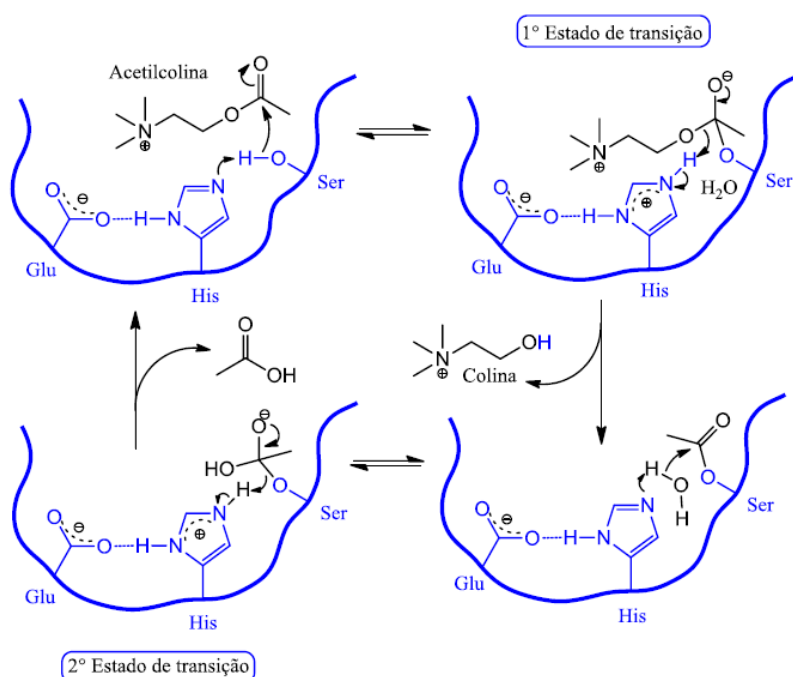
Na primeira etapa da reação, as serina proteases atuam pelo mecanismo de catálise básica-geral. Nesta reação, o imidazol da His, amparado pelo carboxilato do Asp, atua como um catalisador básico-geral. Esse grupo abstrai o próton do grupo OH tornando-o altamente nucleofílico, o que propicia o ataque no carbono carbonílico do substrato.

Na segunda etapa, as serina proteases atuam pelo mecanismo de catálise ácida geral na eliminação do grupo abandonador NH-R do intermediário-(i), no qual, amparado pelo ácido carboxílico, o imidazol transfere um próton auxiliando na saída do grupo e formação do intermediário-(ii). Na terceira etapa, essas enzimas atuam pelo mecanismo de catálise básica-geral na hidrólise do intermediário-(ii). Mecanismo similar à primeira etapa, porém, com a molécula de água como nucleófilo. Na quarta etapa, atuam por um mecanismo similar ao da segunda etapa, porém, aqui a proteína é completamente clivada e a enzima completamente regenerada para catalisar novas reações.^{42,67}

Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase é uma enzima pertencente à classe das esterases. Essa enzima é especializada na clivagem do neurotransmissor acetilcolina, e, por isso, é essencial ao funcionamento do sistema nervoso central. Seu sítio ativo contém uma tríade catalítica quase idêntica à das serina proteases, no qual os grupos catalíticos principais dessa cavidade são compostos por resíduos de glutamato (Glu), histidina (His) e Serina (Ser).^{42,110} Na Figura 9, é apresentado o mecanismo de catálise enzimática da acetilcolinesterase em 4 etapas.

Figura 9. Mecanismo de catálise enzimática da Acetilcolinesterase. Fonte: Ref.¹¹¹



As etapas de clivagem do éster carboxílico acetilcolina pela acetilcolinesterase são muito similares às previamente discutidas para as serina proteases na clivagem de ligações amidas, com os mesmos mecanismos gerais. Isso evidencia que, apesar de se tratarem de diferentes reações orgânicas em sistemas biológicos, muitas enzimas possuem os mesmos mecanismos básicos e com os mesmos grupos laterais atuando na catálise dessas reações. Muitas vezes, a diferença entre uma classe de enzimas e outra está somente nos outros grupos que compõem o sítio ativo, propiciando a ligação específica do substrato na enzima. Além disso, sabe-se que muitas enzimas atuam na catálise de

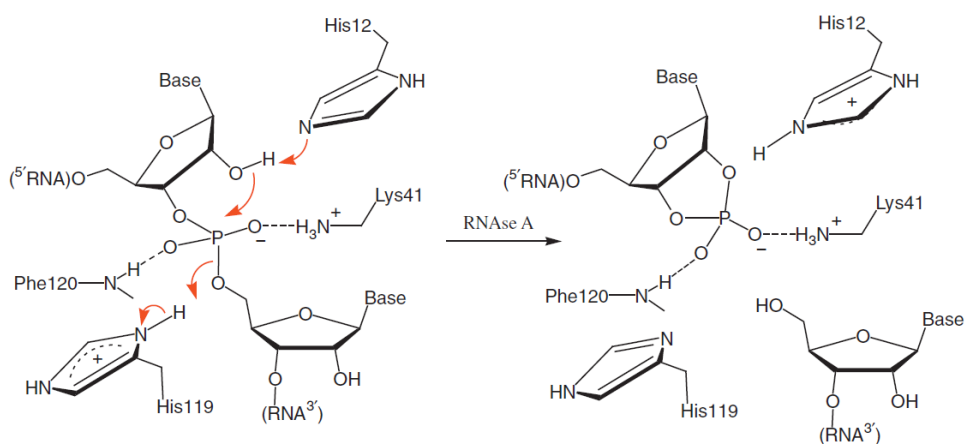
diferentes tipos de reações orgânicas, empregando o mesmo sítio catalítico, e, assim, apresentando alta versatilidade catalítica.⁴²

Adicionalmente, o mecanismo de catálise enzimática da acetilcolinesterase ilustrado na Figura 9 não reporta nesta representação uma importante característica das esterases, assim como em hidrolases, ésteres carboxílicos e ésteres de fosfato normalmente são ligados e estabilizados em enzimas através de resíduos de aminoácidos catiônicos, como lisina e arginina. Essa é uma importante característica a ser considerada no design de enzimas artificiais sob uma estratégia biomimética com objetivo de manter o substrato e grupos catalítico mais próximos e em tempo hábil para que a reação se processe.⁴²

Ribonuclease A

A Ribonuclease (RNase-A) foi, de fato, a enzima mais estudada no século XX e seu mecanismo de catálise foi um dos mais bem compreendidos. Essa notável enzima é especializada na clivagem da importante macromolécula ácido ribonucleico (RNA).^{42,108} O mecanismo de catálise apresentado na Figura 10 evidencia o envolvimento de dois grupos imidazóis catalíticos e um grupo OH do próprio substrato.

Figura 10. Mecanismo de catálise enzimática da Ribonuclease. Fonte: Ref.⁴²



RNase-A possui um mecanismo de catálise concertado, ocorrendo em uma única etapa. Esse mecanismo se processa por meio de uma catálise básica-geral através do grupo imidazol do resíduo His12, o qual abstrai um próton do grupamento OH do RNA. Assim, tal grupo se torna altamente nucleofílico atacando o átomo de fósforo, ao

passo que o grupo de saída recebe um próton do imidazol, resíduo His119, atuando como catalisador ácido-geral.⁴²

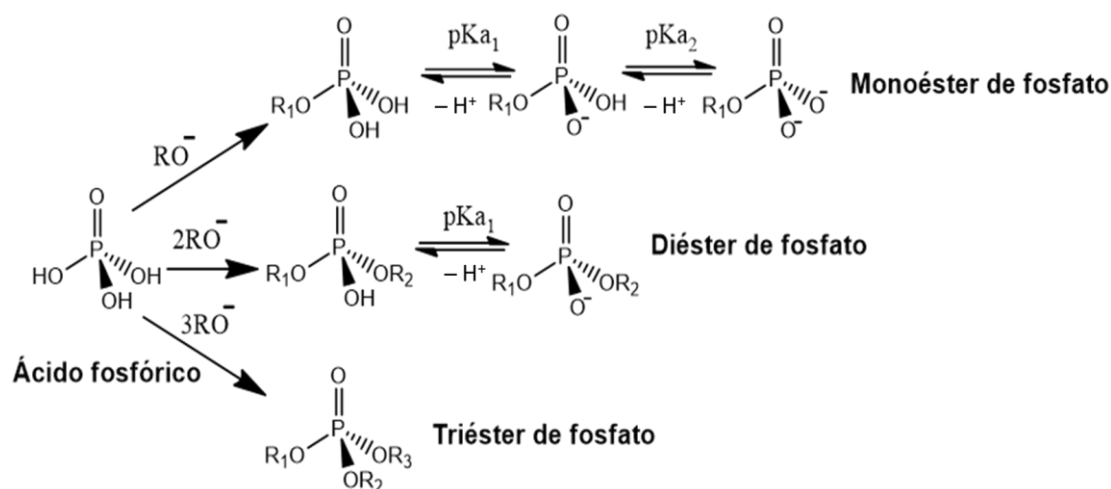
Além disso, esse mecanismo é amparado pela ligação e estabilização de um resíduo de aminoácido catiônico, resíduo Lis41, e também o hidrogênio da ligação peptídica do resíduo Phe120. Assim, além dos grupos catalíticos eficientes e versáteis como imidazol e carboxilato, é reforçado aqui que grupamentos catiônicos devem ser fortemente considerados no desenvolvimento de enzimas artificiais bioinspiradas para a clivagem de amidas, ésteres carboxílicos e em especial de ésteres de fosfato.⁴²

1.4. Reações de transferência de grupo fosforila

As reações de transferência de grupo fosforila, ou simplesmente de transferência de fosfato, são baseadas fundamentalmente em reações de fosforilação e desfosforilação. Tais reações são essenciais aos sistemas biológicos, pois controlam vários processos biológicos vitais aos organismos vivos, como o armazenamento e transmissão de informação genética (DNA e RNA),^{42,45,100,112} processos de sinalização e regulação da atividade celular,¹¹² assim como no fornecimento de energia através de biomoléculas altamente energéticas como os anidridos fosfóricos (Ex: ATP).^{113,114} As reações envolvendo ATP são centrais no fornecimento de energia para inúmeros processos biológicos, tal como na biossíntese, movimentos musculares, transmissão de impulsos nervosos, entre outros.¹¹⁴

Nesse contexto, a química dos ésteres de fosfato ganha um impressionante destaque, uma vez que refere-se a classe de moléculas mais representativa envolvida nas reações biológicas de transferência de grupo fosforila.¹¹⁵ Os ésteres de fosfato apresentam grupos alcóxido ou arilóxido substituindo os grupos hidróxido do ácido fosfórico (H₃PO₄), podendo ser classificados em mono-, di- ou triésteres dependendo do número de substituições (Figura 11). Os mono- e diésteres de fosfato são amplamente produzidos em sistemas biológicos e devido seus hidrogênios ionizáveis apresentam reatividades diferenciais. Tal ionização ainda propicia funções essenciais nos sistemas biológicos, pois impedem a passagem de metabólitos fundamentais no meio celular através membrana citoplasmática.¹¹² Já os triésteres não apresentam hidrogênios ionizáveis e não são naturais, sendo amplamente empregados como pesticidas, inseticidas e armas de guerra.^{37,115,116}

Figura 11. Tipos de ésteres de fosfatos derivados do ácido fosfórico e seus equilíbrios ácido-base. Fonte: O autor.



A importância biológica dos ésteres de fosfato está intrinsecamente relacionada à alta estabilidade da ligação P-O, que pode levar até bilhões de anos para ser quebrada. Por exemplo, estimou-se que $t_{1/2}$ para a hidrólise espontânea de um diéster de fosfato ultrapassa 13 milhões de anos e esse valor pode chegar à ordem de bilhões de anos para o DNA,¹⁴ superior à idade da terra. Os monoésteres competem com diésteres nas constantes de velocidade de hidrólise mais lentas já registradas da classe.¹¹⁷ Além da alta estabilidade da ligação P-O, monoésteres e diésteres de fosfato apresentam cargas negativas em pH fisiológico, sendo que essas cargas impedem a aproximação de nucleófilos e, conseqüentemente, aumentam muito sua estabilidade.¹¹² De fato, esses são definidos como os principais motivos pelos quais a natureza escolheu ésteres de fosfato para o armazenamento do código genético, para composição das membranas celulares e armazenamento de energia química.^{112,113,118}

Em geral, os triésteres de fosfato apresentam maior reatividade do que mono e diésteres de fosfato, no entanto, suas reações de hidrólise são ainda apreciavelmente lentas.¹¹⁷ Por exemplo, o pesticida Paraoxon etílico (triéster de fosfato) possui $t_{1/2}$ de 30 mil anos e sua hidrólise completa pode levar milhares de anos.^{78,116} Assim, a alta estabilidade da ligação P-O foi também um dos grandes motivos para desenvolvimento de pesticidas, inseticidas e armas químicas baseados em triésteres de fosfato. Isso se deve ao fato de que estes são compostos altamente resistentes a água, solo e ao ar, podendo atingir seu alvo sem alteração química⁷⁸

Além disso, triésteres de fosfato, ou organofosforados como também conhecidos, apresentam considerável toxicidade aos seres vivos.¹¹⁹ Por um lado, sua toxicidade é eficiente para manter as plantações agrícolas livres de eventuais pragas e insetos. Por outro, pode causar danos aos seres humanos que manuseiam indevidamente os pesticidas e também aos que consomem alimentos contaminados.^{36,38,91,116,119} De fato, há muitos casos reportados de intoxicação aguda por organofosforados em zonas agrícolas pelo uso indevido de pesticidas, e também em guerras e atentados terroristas pelo uso de armas químicas, que, por muitas vezes, levaram os indivíduos intoxicados a morte.^{38,78,110}

As causas dos efeitos dos organofosforados em humanos se deve principalmente à inibição específica de algumas enzimas, em especial à acetilcolinesterase, a qual é responsável pela clivagem da acetilcolina.^{38,110,119} A inibição dessa enzima causa acúmulo de acetilcolina no cérebro, que, por sua vez, promove o colapso do sistema nervoso central.¹¹⁹ Por isso, uma das estratégias empregadas atualmente no tratamento de intoxicação aguda por organofosforados é a utilização de antídotos que possam reativar a funcionalidade da acetilcolinesterase, revertendo assim os efeitos causados pelos organofosforados.¹¹⁰ Geralmente o desenvolvimento desses antídotos são baseados em moléculas com poderosos nucleófilos e/ou enzimas artificiais, sendo essa uma temática científica de grande relevância em tratamentos médicos emergenciais.³⁸

Outra problemática que permeia a classe dos triésteres de fosfato são os estoques de pesticidas atualmente proibidos, que, por muitas vezes, continuam sendo vendidos em diversos países, assim como no Brasil, sendo utilizados no campo e, por isso, detectados nas verduras e frutas vendidas nesses países. Além disso, ainda existem grandes estoques de armas químicas provenientes das guerras em diversas partes do planeta e muitas estratégias vêm sendo elaboradas para a degradação eficiente e segura dessas armas. Reforça-se aqui que a temática em questão faz parte de assuntos estratégicos governamentais e da ONU no que se refere à saúde pública e paz mundial.^{36,38,78,119}

Assim, como foi possível observar, ésteres de fosfato são moléculas orgânicas que abrangem desde as mais fundamentais biomoléculas até as mais mortíferas armas químicas.^{36,113–115,119} Por isso, indubitavelmente há grande necessidade no desenvolvimento de catalisadores eficientes e na compreensão mecanística de tais reações catalisadas. Para a compreensão das peculiaridades das reações de desfosforilação nos sistemas biológicos e detoxificação química, faz-se necessário estudá-las separadamente

usando moléculas-modelos de ésteres de fosfato com grupos abandonadores ativados como o 2,4-dinitro-fenil.^{47,102,103,109,120,121} E, com isso, compreender mecanisticamente as reações de desfosforilação desses modelos em água (hidrólise) e diferentes nucleófilos, bem como estudar as diferentes formas de catálise inter- e intramolecular com grupos ácidos e básicos, em sistemas moleculares simples, até mais complexos, como enzimas artificiais baseadas em macrociclos, polímeros e polímero/surfactante.^{43,46,55,72,80,81,122–125}

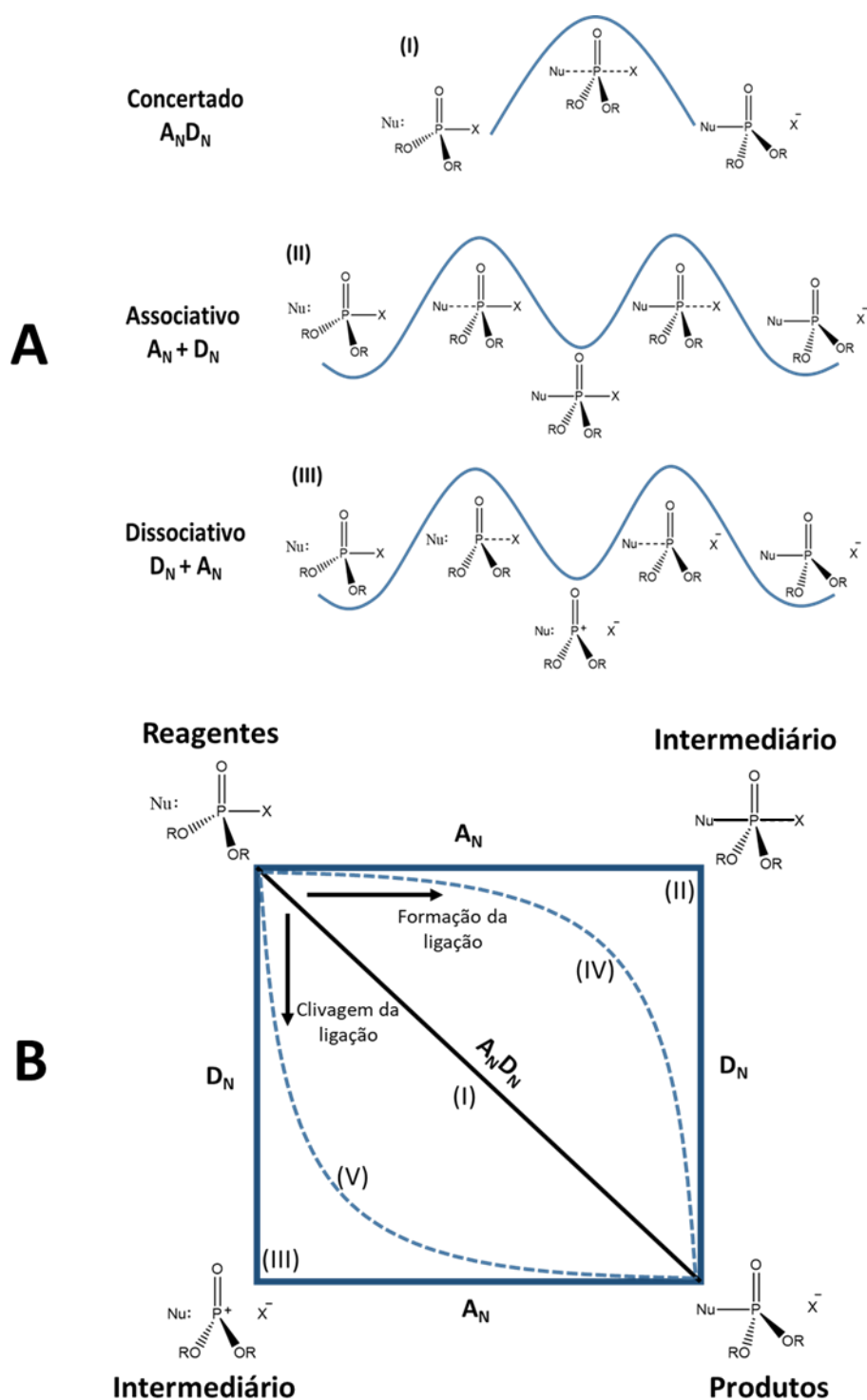
1.5. Mecanismos de reações de transferência de grupo fosforila

Reações de transferência de grupo fosforila normalmente ocorrem através de dois mecanismos principais de substituição nucleofílica, os quais envolvem: (i) clivagem da ligação P-O, a qual ocorre quando o nucleófilo ataca o átomo de fósforo; e (ii) clivagem da ligação C-O, na qual o átomo de carbono da ligação P-O-C é o eletrófilo.¹¹⁵ No caso de substratos ativados aromáticos, esse mecanismo ocorre via substituição nucleofílica aromática (S_{NAr}). Para diferenciar esses mecanismos, no caso da reação de hidrólise por exemplo, utiliza-se H_2O^{18} para marcação isotópica dos produtos.^{42,126}

Em condições especiais, um dos mecanismos se torna caminho reacional preferencial em relação ao outro. O mecanismo de clivagem da ligação C-O é o caminho principal em pH baixo, geralmente $pH < 0$, em que o grupo abandonador é o ácido fosfórico ou éster fosfórico neutro. Por outro lado, em pH maiores, geralmente $pH > 1$, o caminho reacional principal é o mecanismo de clivagem da ligação P-O.¹²⁶

Em linhas gerais, reações de substituição nucleofílica de ésteres de fosfato com clivagem da ligação P-O podem seguir três caminhos principais: associativo, dissociativo e concertado.¹²⁷ Tais caminhos se diferem pelo momento e tempo da formação da ligação entre o nucleófilo (Nu) e átomo de fósforo, bem como da clivagem da ligação entre o fósforo e o grupo abandonador^{126,128}, representados na Figura 12A. Além disso, o caminho reacional concertado se subdivide ainda em três outros caminhos reacionais: Concertado sincrônico, concertado assincrônico de caráter associativo e concertado assincrônico de caráter dissociativo.¹¹⁹ Todos esses caminhos citados são representados de modo esquemático no diagrama de More O’Ferrall-Jencks da Figura 12B.

Figura 12. (A) Caminhos reacionais e (B) Diagrama de More O’Ferrall-Jencks de substituição nucleofílica no átomo de fósforo em reações de transferência de grupo fosforila. Fonte: adaptado da Ref.^{54,127}



Seguindo o diagrama de More O'Ferrall-Jencks a partir da rota de reagentes para produtos, é possível observar os caminhos de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato citados anteriormente.^{100,119,127} Tais caminhos são descritos mais detalhadamente a seguir:

- (I) Concertado sincrônico: ocorre através da simultânea adição nucleofílica e eliminação do grupo abandonador ($A_N D_N$, nomenclatura da IUPAC)¹²⁹. Nesse caminho não há formação de intermediário e a reação ocorre em uma única etapa.
- (II) Associativo: ocorre em duas etapas, sendo uma etapa de adição nucleofílica passando por um intermediário fosforano pentacoordenado e outra etapa de eliminação do grupo abandonador ($A_N + D_N$, nomenclatura da IUPAC)¹²⁹.
- (III) Dissociativo: ocorre em duas etapas, sendo uma etapa de eliminação do grupo abandonador, passando por um intermediário metafosfato, seguido de uma etapa de adição nucleofílica ($D_N + A_N$, nomenclatura da IUPAC)¹²⁹.
- (IV) Concertado assincrônico com caráter associativo: ocorre em uma única etapa, não se observa intermediário fosforano pentacoordenado, todavia, passa por um estado de transição mais “rígido” similar ao fosforano.¹¹⁹
- (V) Concertado assincrônico com caráter dissociativo: ocorre em uma única etapa, não se observa intermediário metafosfato, todavia, passa por um estado de transição mais “solto” similar ao metafosfato.¹¹⁹

Em geral, ésteres de fosfato apresentam reatividade diferencial propiciada pelo número de substituições por grupos alcoóxidos ou arilóxidos, e suas formas ionizadas ou neutras, por isso, algumas classes dessas moléculas orgânicas geralmente possuem caminhos reacionais preferenciais dentre os conceitualizados anteriormente.^{100,117,119}

Triésteres de fosfato são neutros e normalmente seguem um caminho reacional concertado assincrônico de caráter mais associativo ou até mesmo puramente associativo, em alguns casos com formação de um intermediário fosforano detectável.^{100,115,119}

Diésteres de fosfato monoaniônicos seguem um caminho concertado de caráter associativo mais sincrônico. Ainda, foi reportado que para diésteres aniônicos, com bons grupos abandonadores (pK_a baixo) e bons nucleófilos, tal reação se processa por um caminho associativo com certo caráter concertado, passando por um estado de transição mais rígido e muito similar ao fosforano. Além disso, diésteres neutros além de

apresentarem centro mais eletrofílico no átomo de fósforo e menor repulsão de nucleófilos, ainda podem se beneficiar de uma transferência de próton intramolecular no estado de transição.¹⁰⁰

Monoésteres de fosfato dianiônicos e neutros, em geral, seguem um caminho concertado com caráter dissociativo, em alguns casos muito próximos do puramente dissociativo. O caráter dissociativo de monoésteres é consideravelmente incrementado com melhores grupos abandonadores. Já monoésteres de fosfato monoaniônicos ainda podem se beneficiar da transferência de próton intramolecular.^{100,115}

Adicionalmente, dentre as estratégias empregadas em físico-química orgânica para descrever esses caminhos reacionais e mecanismos estão: efeito isotópico cinético, parâmetros termodinâmicos de ativação, relações lineares de energia livre, cálculos computacionais, marcação isotópica, além de técnicas de detecção de intermediários e produtos, tal como RMN e espectrometria de massas.^{42,46,72,80,109,119,130}

1.6. Catálise intramolecular e intermolecular

Uma reação intermolecular ocorre geralmente entre duas ou até três moléculas distintas enquanto que uma reação intramolecular ocorre entre grupos de uma mesma molécula ou simplesmente por rearranjo molecular. No que se refere aos processos catalíticos de reações desta natureza, a catálise de reações intramoleculares ocorre muito mais rapidamente e eficientemente do que de reações intermoleculares. Tal fenômeno se deve principalmente à proximidade e ao tempo em que os grupos catalíticos ficam junto ao centro reativo, justificado pela teoria espaço-temporal de Frederic Menger,⁹⁹ que se baseia em termos como ângulo, entropia, proximidade, tempo e probabilidade.¹³¹

No caso de reações intramoleculares, os grupos catalíticos são geralmente posicionados com proximidade e conformação acessível para a catálise. Tal proximidade aumenta exponencialmente a probabilidade dos grupos catalíticos e substrato se alinharem precisamente para que a reação se processe. Nessa categoria catalítica, não se tem efeitos difusionais ou translacionais, mas principalmente efeitos rotacionais intramoleculares dos grupamentos (efeitos conformacionais). Ou seja, translacionalmente falando, é como se grupos catalíticos nucleofílicos estivessem “congelados” próximos do centro eletrofílico. Tal “congelamento” propicia uma catálise de alta eficiência comparável à catálise enzimática, por isso, à luz da teoria espaço-temporal, diversos

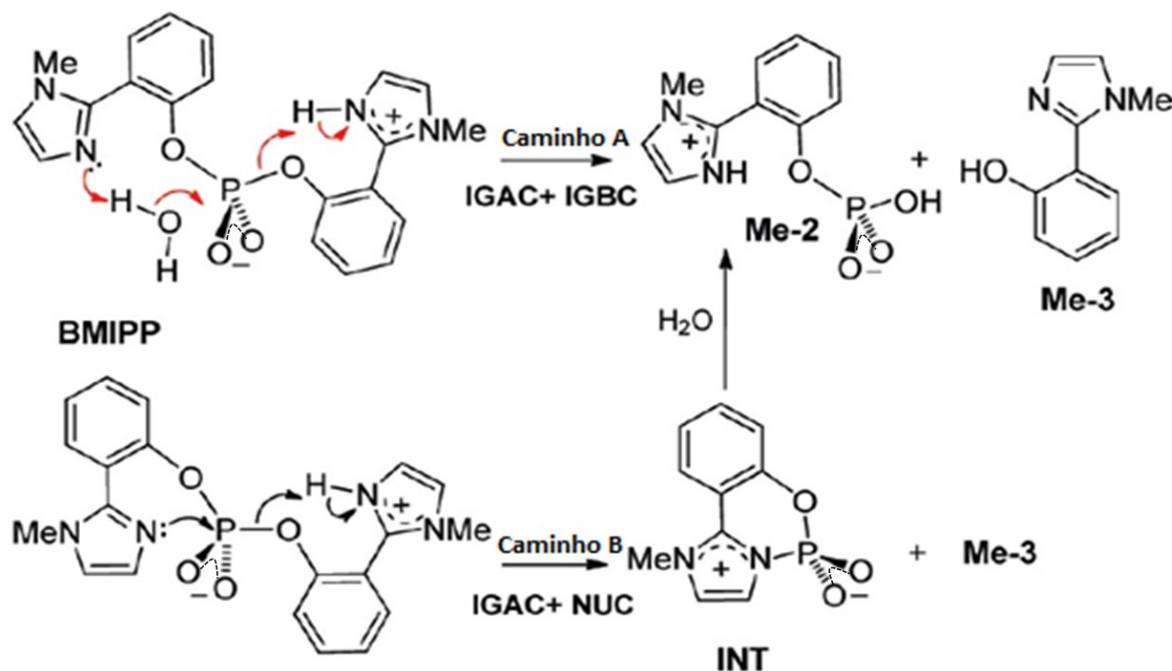
pesquisadores vêm estudando extensivamente a catálise de reações intramoleculares como modelos para catálise enzimática.

Contudo, apesar da catálise enzimática consistir em uma reação intermolecular, o substrato normalmente fica tão fortemente ligado à enzima por interações intermoleculares e tão próximo dos grupos catalíticos que a catálise intramolecular pode ser vista como um bom modelo para descrever a proximidade e tempo de permanência dos grupos juntos ao substrato. Assim, muitas moléculas foram projetadas especificamente para imitar o sítio ativo de várias enzimas, atuando como modelos simples do seu mecanismo reacional, além de auxiliar na captura da essência da catálise enzimática.

Nesse sentido, foi reportado na literatura a reação de desfosforilação do bis(2-(1-metil-1*H*-imidazol-3-íneo-2-il)fenil) fosfato (BMIPP), sendo que essa reação trata-se de uma catálise bifuncional intramolecular de um diéster de fosfato por dois grupos imidazóis. Essa reação foi estudada em detalhe através do acompanhamento cinético por UV-Vis, RMN, espectrometria de massas e cálculos computacionais.⁴⁶

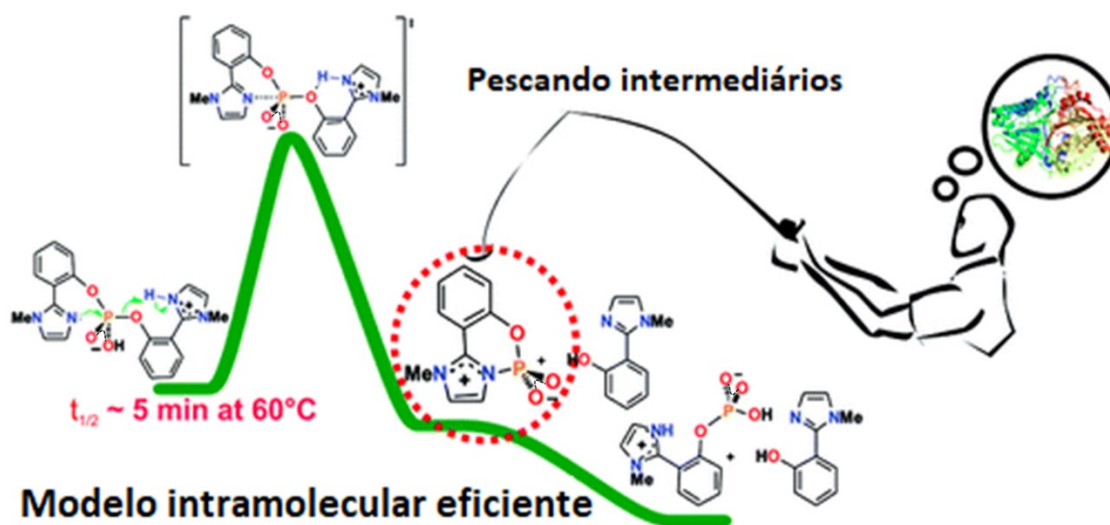
A reação intramolecular do BMIPP demonstra que a proximidade e o tempo de permanência de grupos catalíticos próximos ao centro reativo confere incrementos na velocidade da reação comparável à catálise enzimática, apresentado um aumento de 10^{11} vezes em relação a hidrólise espontânea do diéster sem os grupos imidazóis, bis-(fenil)-fosfato.⁴⁶ Além disso, mostra que nem sempre é fácil diferenciar os mecanismos reacionais, pois tal reação apresenta dois mecanismos cineticamente equivalentes de difícil distinção, neste caso, a distinção entre a catálise básica-geral e a nucleofílica.⁴⁶ Na Figura 13, são demonstrados os mecanismos por dois caminhos reacionais A e B.

Figura 13. Catálise Intramolecular de um diéster de fosfato BMIPP por dois grupos imidazóis. Modelo de catálise enzimática. Fonte: Ref.⁴⁶



O Caminho A segue o mecanismo de catálise bifuncional do tipo: Catálise ácido-geral intramolecular (IGAC) + Catálise básica-geral intramolecular (IGBC). Já o Caminho B: Catálise ácido-geral intramolecular (IGAC) + Catálise nucleofílica intramolecular (IGBC).⁴⁶ Inicialmente, pensou-se que o caminho preferencial da reação seria o Caminho A devido a não distinção por efeito isotópico e não detecção do intermediário por ESI-MS e RMN. Assim, a reação seria um modelo para a enzima Ribonuclease-A.¹³² Contudo, novas evidências empregando cálculos computacionais mostraram que o Caminho B apresenta barreira energética consideravelmente menor que o Caminho A. Além disso, análises por Ultra Espectrometria de Massas LTQ-FT permitiram a captura (ou a “pesca”) do intermediário (INT), apresentado na Figura 14. Portanto, as novas evidências demonstraram consistentemente que o Caminho B é a melhor descrição mecanística para tal reação, não descartando a possibilidade de que parte da reação possa ocorrer via caminho A.⁴⁶

Figura 14. Detecção de intermediário-chave no mecanismo de catálise intramolecular do BMIPP. Ref.⁴⁶



Assim, a reação intramolecular do BMIPP foi reportada como o primeiro modelo simples para mecanismo de catálise enzimática da Super Família das Fosfolipases D. Além disso, sua compreensão mecanística e efeito catalítico evidencia que grupos imidazóis são excelentes catalisadores quando suficientemente próximos e em tempo suficientemente longo junto ao centro reativo.⁴⁶

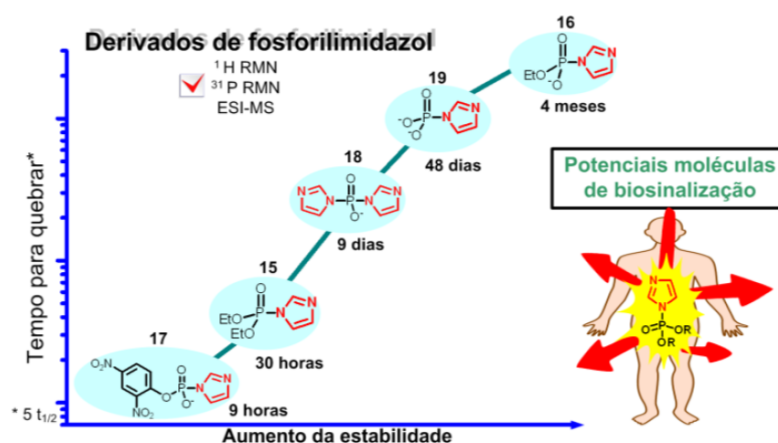
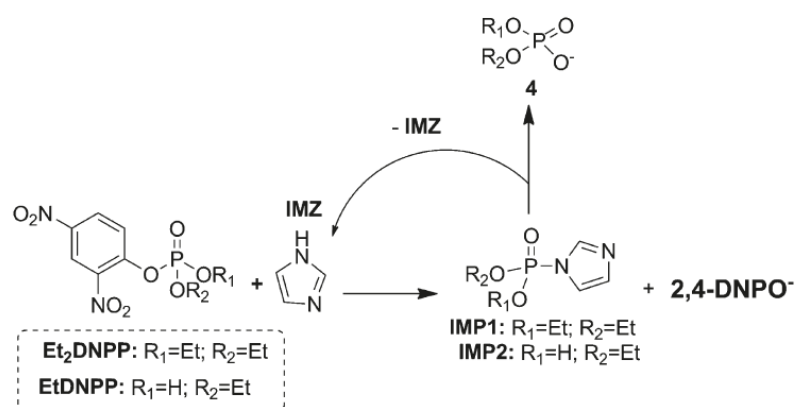
Apesar de reações intramoleculares serem bons modelos para catálise enzimática, sabe-se que tal categoria catalítica se baseia, em geral, em reações do tipo intermoleculares. Nesse sentido, faz-se necessário estudar em detalhe desde reações intermoleculares simples até as mais complexas como enzimas artificiais baseadas em macrociclos e macromoléculas, as quais além de poderem atuar como modelos mecanísticos para catálise enzimática também podem ser empregados como alternativas com propriedades controladas e otimizadas para essa modalidade.

A catálise intermolecular é regida principalmente por efeitos translacionais e rotacionais, além da acidez, basicidade, nucleofilicidade e eletrofilicidade dos grupos envolvidos. No caso de uma reação nucleofílica bimolecular, por exemplo, os grupos catalíticos devem se difundir no meio reacional até uma colisão com o substrato. Isso promove duas possibilidades principais: (i). Se a colisão for efetiva, com ângulo adequado, sobrepondo os orbitais HOMO do nucleófilo e LUMO do centro eletrofílico (substrato), a reação ocorre. (ii). Se a colisão for não-efetiva, a reação simplesmente não

ocorre, sendo necessária uma outra colisão com outro nucleófilo para que a reação possa ou não se processar dependendo do tipo de colisão.^{133,134} Contudo, sabe-se que a probabilidade de que uma colisão não-efetiva ocorra é muito mais alta do que de uma colisão efetiva, uma vez que a área molecular é muito maior do que a região e ângulo referente ao orbital LUMO.¹³³⁻¹³⁵

Como exemplo de uma reação intermolecular simples, foi reportada em detalhe a catálise intermolecular da reação de desfosforilação di e triésteres do 2,4-dinitro-fenil fosfato por imidazóis. Nesse estudo, foi observado intermediários fosforil-imidazóis e a regeneração do imidazol atuando como catalisador (Figura 15).¹⁰⁹

Figura 15. Catálise intermolecular da clivagem de ésteres de fosfato por imidazóis. Fonte: Ref.¹⁰⁹



Os intermediários detectados por RMN ^{31}P apresentaram considerável estabilidade, com tempo para clivagem completa entre 9 horas até 4 meses.¹⁰⁹ Assim, esse estudo trouxe contribuições consistentes na caracterização e detecção de fosforil-imidazóis como análogos de moléculas biosinalizadoras em sistemas biológicos, além da

metodologia de caracterização de possíveis intermediários de sistemas catalíticos baseados no grupo imidazol. Na próxima seção, serão abordados sistemas catalíticos intermoleculares de maior complexidade baseados na química supramolecular e seus conceitos fundamentais.

1.7. Química Supramolecular e Catálise Supramolecular

A química por muito tempo concentrou seus estudos e tentou descrever a natureza em um nível puramente molecular, ou seja, estruturas baseadas unicamente por ligações covalentes.¹³⁶ No entanto, uma perspectiva muito maior e mais ampla se desenvolveu em tempos relativamente recentes. Surgiu, nesse contexto, uma química que vai além da molécula, surgiu, então, a química supramolecular.¹³⁶

De fato, desde o início, a química supramolecular foi inspirada em sistemas biológicos¹³⁷ e os segredos dessa química sempre estiveram escondidos na natureza. Uma vez que a natureza mostra que as propriedades de compostos químicos e sua reatividade estão fortemente relacionadas ao ambiente e sistema em que estão associados.¹⁶ No geral, são sistemas de agregados/complexos supramoleculares, tais como: membranas celulares, enzimas, agregados proteicos, mitocôndrias entre outros, além de mostrar exemplos de reconhecimento molecular, tais como: catálise enzimática, síntese de proteínas, transcrição e tradução de RNA, reconhecimento e sinalização molecular em sistemas biológicos.¹⁶

A química supramolecular teve seus primeiros vislumbres em 1894 quando Emil Fischer propôs que enzima e substrato interagem como chave e fechadura.¹³⁶ Contudo, foi principalmente após o prêmio Nobel de Química em 1987 para Lehn, Cram and Pedersen, por seus trabalhos de reconhecimento molecular em sistemas “receptor-substrato”, que Química Supramolecular se consolidou mais fortemente. E, desde então, vem fazendo grandes avanços.^{50,138,139}

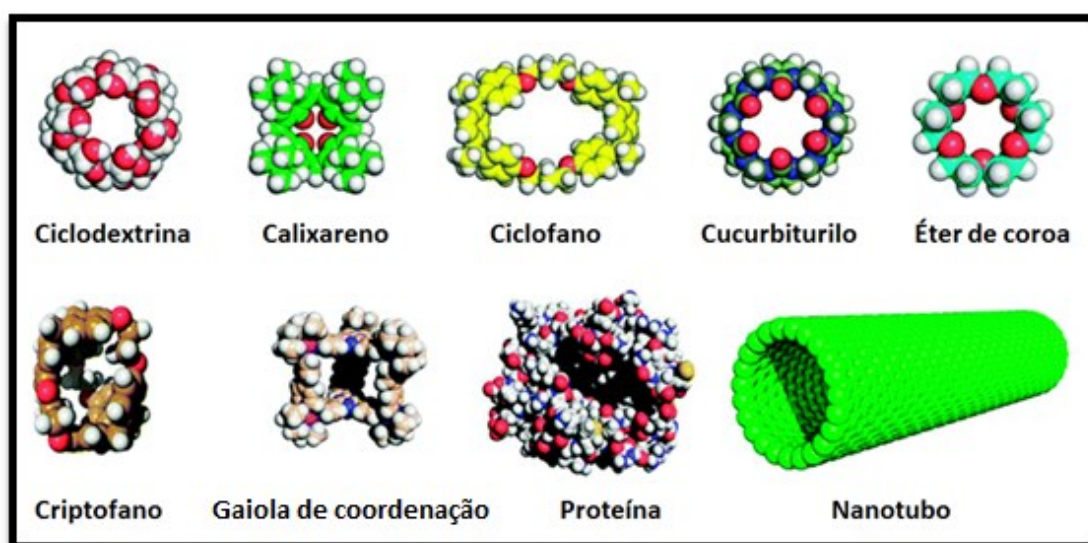
É comumente definida como “a química das interações intermoleculares” ou uma outra elegante definição é “a química que vai além da molécula”,^{50,136} ou mais recentemente como “a química dos sistemas informados” na qual, estruturas moleculares são associadas ou automontadas por meio de interações/ligações de caráter não covalente, isto é, interações mais fracas e relativamente lábeis.¹⁴⁰⁻¹⁴² Estas interações são: ligação

hidrogênio, dipolo-dipolo, dipolo-íon, π - π , n- π , n-cátion, π -cátion, forças hidrofóbicas/solvofóbicas, interações eletrostáticas, entre outras.¹⁴³ Nessa proeminente categoria da química, os termos fundamentais mais empregados são: reconhecimento molecular, automontagem, auto-organização interações intermoleculares, associação, complementariedade, macromoléculas, macrociclos, polímeros e complexos supramoleculares.⁵⁰

Uma das abordagens da química supramolecular está baseada na associação do tipo “*host-guest*” (hospedeiro-hóspede), como o nome já diz do inglês “*host*” é uma molécula hospedeira e o “*guest*”, uma molécula/íon hóspede. No geral o “*host*” possui um tamanho apreciavelmente maior do que o “*guest*”.^{50,143} Apesar do termo “Host-guest” ou “hospede-hospedeiro” ter sido muito empregado ao longo da história, Lehn, vencedor do prêmio Nobel na área, sugere que o termo “receptor-substrato” seja o termo utilizado para sistemas em soluções e “hospede-hospedeiro” apenas para sistemas no estado sólido. Justificado pela relação histórica da interação enzima-substrato, e, também, pela tradução facilitada para diversos idiomas.

Vários receptores são comumente empregados em química supramolecular. Alguns exemplos são: ciclodextrinas, curcubitulos, calixarenos, éteres de coroa, proteínas, entre outros.^{137,139,143} Na Figura 16, são apresentados alguns exemplos de “*host*”.

Figura 16. Alguns exemplos de receptores utilizados na química supramolecular. Fonte: Ref.^{53,53}



Neste sentido, inaugurou-se uma química que possibilita infinitas combinações de diferentes tipos de “*receptor*” e “*substrato*”, bem como seu design racional para

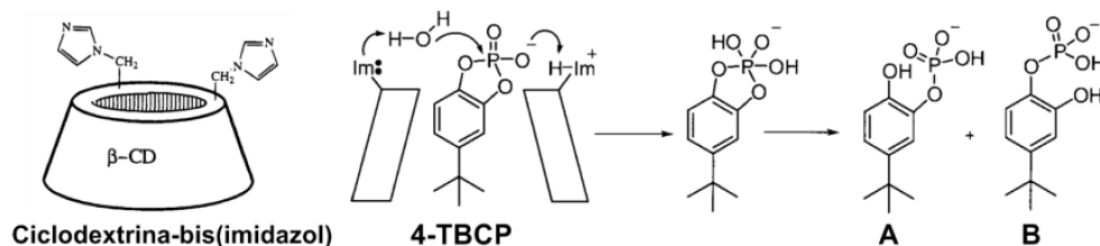
formação de diferentes complexos supramoleculares visando as mais diversas propriedades e funcionalidades.^{50,53,138,139,142} Porém, a química supramolecular vai muito além da associação receptor-substrato 1:1, abrangendo também sistemas de reconhecimento e interação de múltiplas moléculas, como na associação intermolecular entre surfactantes, polímeros, entre outros.^{50,53,80} Assim, toda essa diversidade e possibilidades asseguram estudos altamente promissores para as próximas décadas e, provavelmente, até para os próximos séculos. Dessa forma, consideração especial deve ser dada à compreensão molecular de sistemas biológicos propiciando consistentemente a aproximação entre a química e a biologia.

A catálise supramolecular utiliza conceitos e estratégias fundamentais da química supramolecular no desenvolvimento de catalisadores eficientes e seletivos. Essa área de catálise apresenta grandes similaridades com enzimas: provendo cavidades hidrofóbicas e permitindo a funcionalização com grupos catalíticos biomiméticos. Assim, possibilita a utilização desses sistemas como modelos mecanísticos na compreensão de sistemas enzimáticos, bem como no desenvolvimento de enzimas artificiais com potencialidades multifuncionais.^{52,53,140}

Os catalisadores supramoleculares clássicos são geralmente baseados em macrocíclos, tais como ciclodextrina, pilararenos, entre outros.^{72,73,108} Contudo, estudos recentes mostraram a alta atividade de enzimas artificiais baseadas em complexos supramoleculares polímero/surfactante na desfosforilação de triésteres de fosfato,⁸⁰ sendo assim há grande interesse na compreensão de sistemas catalíticos similares. Diante disso, alguns exemplos de catálise supramolecular empregando macrocíclos e complexos polímero/surfactante serão abordados na sequência.

Anslyn e colaboradores publicaram um dos trabalhos pioneiros em catálise supramolecular por macrocíclos funcionalizados. Neste trabalho foi reportada a hidrólise do diéster de fosfato 4-TBCP por ciclodextrinas funcionalizadas por dois grupos imidazóis (Figura 17), com incrementos na velocidade de reação de 120 vezes em relação à hidrólise espontânea do diéster de fosfato.⁴⁶ Estudos mecanísticos mostraram que tal reação se processa através do mecanismo de catálise bifuncional básica-geral e ácida-geral, similar ao mecanismo da Ribonuclease-A. Assim, esse sistema catalítico se demonstrou adequado como modelo mecanístico para tal enzima.¹⁰⁸

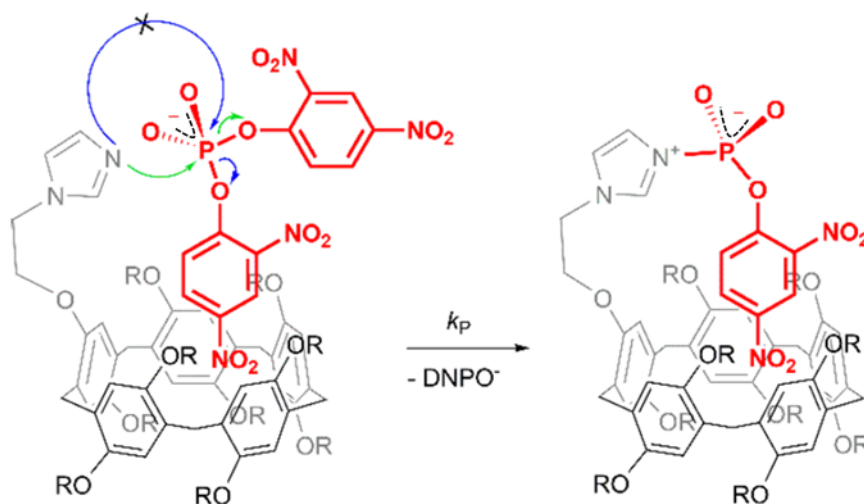
Figura 17. Catálise supramolecular tipo “Host-Guest” por ciclodextrina funcionalizada com grupos imidazóis em reações de desfosforilação de diésteres de fosfato. Fonte: Ref.¹⁰⁸



Recentemente foi reportado por Wanderlind e colaboradores reações de desfosforilação de diésteres de fosfato catalisada por pilar-5-areno funcionalizado com grupos imidazóis (Figura 18). As reações apresentaram incrementos na velocidade da reação de até 1×10^4 vezes comparado à hidrólise espontânea do diéster de fosfato. A detecção de intermediários fosforil-imidazóis por RMN ^{31}P permitiram definir consistentemente o mecanismo por uma catálise do tipo nucleofílica.⁷²

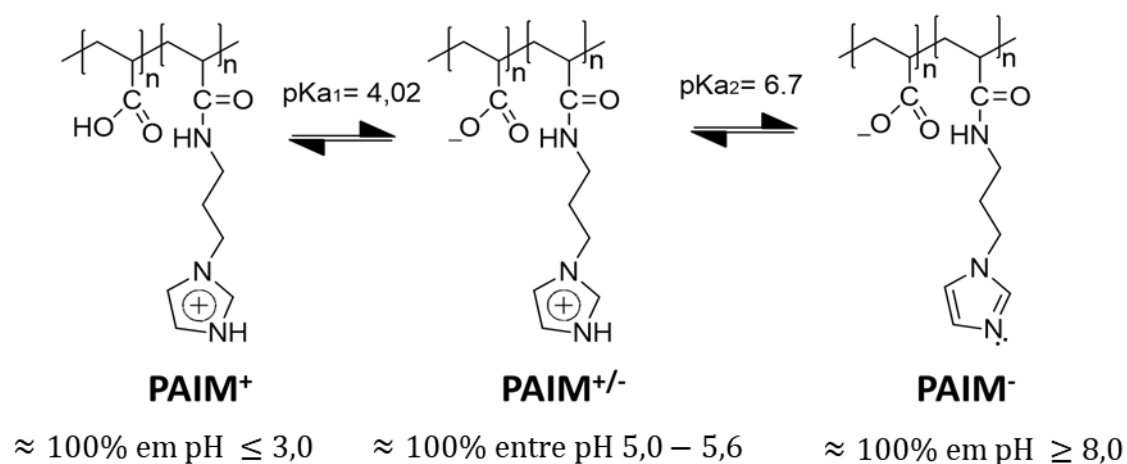
Além disso, tal reação demonstrou notável seletividade, em que foi demonstrado, por meio do estudo com três diésteres de fosfato, que a reação se processa somente quando o grupo abandonador está posicionado fora do pilar-5-areno. Esse efeito foi justificado por cálculos computacionais em conjunto com os dados cinéticos, os quais demonstraram restrição espacial do grupo imidazol frente ao ataque nucleofílico de um dos orbitais LUMO do diéster de fosfato, ilustrado na Figura 18.⁷²

Figura 18. Catálise supramolecular tipo receptor-substrato por Pilar-5-areno funcionalizado com grupos imidazóis em reações de desfosforilação de diésteres de fosfato. Fonte: Ref.⁷²



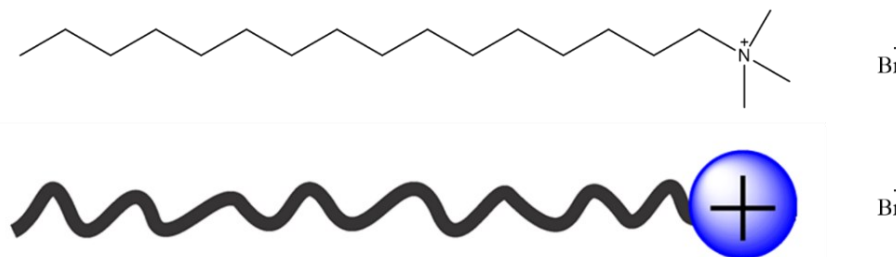
Giusti e colaboradores reportaram em 2014 a síntese e caracterização do poli(ácido acrílico) funcionalizado por grupos imidazóis ligados por estáveis ligações amidas, PAIM. O polímero obtido possui grupos imidazóis e carboxilatos em proporção 1:1. Tal polímero foi projetado sob uma estratégia biomimética, inspirando-se em enzimas que contém grupos imidazóis e carboxilatos no sítio ativo, tal como a super família das fosfolipases D.⁴³ A estrutura molecular, formas iônicas e equilíbrios ácido-base do polímero PAIM são apresentadas na Figura 19. Neste trabalho, o PAIM apresentou um notável efeito catalítico frente à reação de hidrólise de um éster carboxílico e do triéster de fosfato 2,4-dinitro-fenil-fosfato (DEDNPP),⁴³ assim, despertando interesse para novos estudos empregando tal polímero.

Figura 19. Equilíbrios ácido-base e espécies iônicas do polímero PAIM. Fonte: Adaptado da Ref.⁸⁰



Posteriormente, Gerola e colaboradores reportaram em 2017 a formação e caracterização de complexos supramoleculares do tipo polímero/surfactante baseados na associação supramolecular entre PAIM e brometo de cetiltrimetilamônio (C₁₆TAB). A estrutura molecular e representação ilustrativa do surfactante catiônico C₁₆TAB são apresentadas na Figura 20.

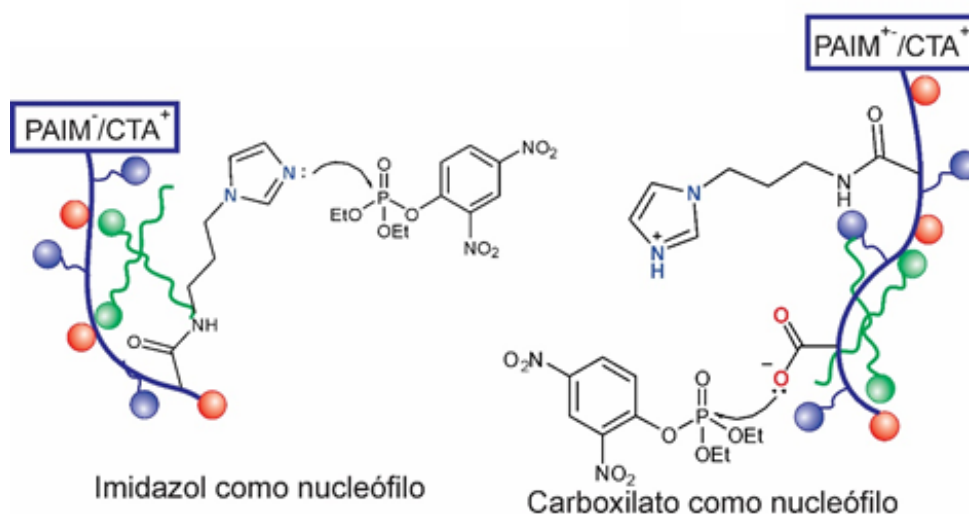
Figura 20. Estrutura molecular e representação ilustrativa do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio ($C_{16}TAB$).



Estudos de equilíbrios ácido-base mostraram através das frações das espécies de PAIM em solução aquosa que em $\text{pH} \leq 3$ tem-se aproximadamente 100% da espécie PAIM^+ ; entre $\text{pH} 5$ e $5,7$ tem-se aproximadamente 100% da espécie $\text{PAIM}^{+/-}$; e, em $\text{pH} \geq 8$, aproximadamente 100% da espécie PAIM^- . Assim, foram realizados estudos de associação dessas espécies de PAIM com o surfactante $C_{16}TAB$, os quais foram consistentemente caracterizadas as formações dos complexos $\text{PAIM}^{+/-}/C_{16}TA^+$ e $\text{PAIM}^-/C_{16}TA^+$.

Esses complexos apresentaram efeitos catalíticos extraordinários frente à reação de desfosforilação do triéster DEDNPP, com incremento na velocidade da reação catalisada por $\text{PAIM}^{+/-}/C_{16}TA^+$ de $1,4 \times 10^5$ e $\text{PAIM}^-/C_{16}TA^+$ de até $1,2 \times 10^6$ vezes em relação a hidrólise espontânea. Tal reação catalisada por complexos $\text{PAIM}/C_{16}TA^+$ se demonstrou altamente dependente da $[C_{16}TAB]$ e do pH , que foi consistentemente justificado pela formação de cavidades hidrofóbicas, potencial zeta, tamanho e fração das espécies iônicas do PAIM.⁸⁰ Na Figura 21, são ilustrados os complexos supramoleculares polímero/surfactante do tipo $\text{PAIM}/C_{16}TAB$ como catalisadores nas reações de desfosforilação do DEDNPP.

Figura 21. Complexos supramoleculares polímero/surfactante como catalisadores em reações de desfosforilação de um triéster de fosfato. Fonte: Ref.⁸⁰



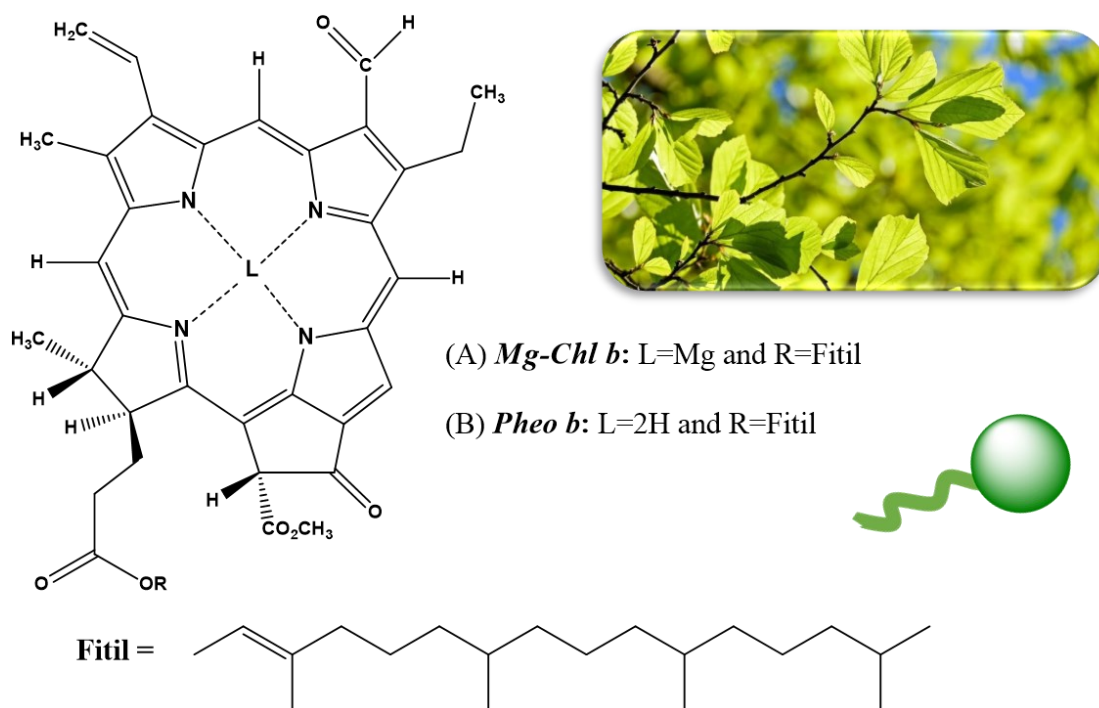
O mecanismo de reação foi consistentemente elucidado através do efeito isotópico cinético (KIE) nos dois patamares observados no perfil de pH da reação. Assim, no (i) primeiro patamar: referente à catálise pelo grupo carboxilato, em pH 5, obteve-se $k_{D_2O}/k_{H_2O} = 1,0$. Enquanto que no (ii) segundo patamar: referente ao grupo imidazol, pH > 8 , também obteve-se $k_{D_2O}/k_{H_2O} = 1,0$. Portanto, ambos os grupos imidazol e carboxilato atuam como catalisadores nucleofílicos (Figura 21), uma vez que não envolvem a participação de uma molécula de água na etapa determinante da reação, sendo essa proposição consistente com o alto efeito catalítico observado para esses complexos supramoleculares.⁸⁰

Devido aos efeitos catalíticos excepcionais reportados neste primeiro artigo envolvendo complexos supramoleculares polímero/surfactante de nosso grupo de pesquisa,⁸⁰ temos atualmente grande interesse em estudos de sistemas relacionados. Sendo que tal interesse se consolida tanto no desenvolvimento acadêmico/intelectual da área (ainda praticamente inexplorada), quanto nas inúmeras aplicações supracitadas que esses estudos podem propiciar. Assim, pretende-se explorar nesta tese de doutorado novas reações e parâmetros que permitam o design racional e modelagem mecanísticas de enzimas artificiais baseadas em complexos polímero/surfactante. Sendo que os parâmetros de design racional incluem: pH, concentração de surfactante, tamanho da cadeia do surfactante e tipos de surfactantes (catiônicos e zwitteriônicos).

1.8. Fotocatálise: Fundamentos e aplicações

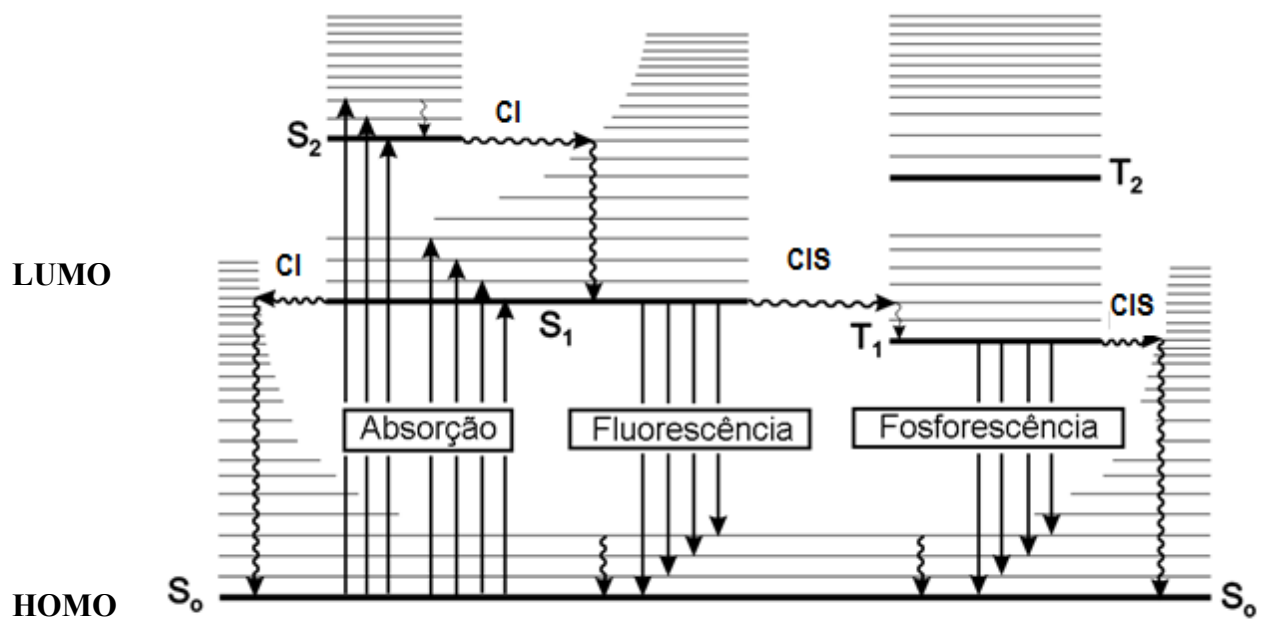
Os processos fotoquímicos e fotocatalíticos estão diretamente relacionados ao surgimento e sobrevivência da vida. A fotossíntese é um exemplo de um processo fotoquímico em que um cromóforo, no caso a clorofila, absorve a energia luminosa proveniente do sol que, posteriormente, é convertida em energia química. Esse processo fornece diretamente ou indiretamente energia para todos os seres vivos. Assim, a combinação da luz com um pigmento antena mais CO_2 e H_2O produz carboidrato (energia química) e oxigênio molecular (o ar que respiramos), sendo tal processo altamente vital para o planeta. A fotossíntese é também é uma grande lição de fotocatálise, sendo conhecida como fotocatálise do tipo não canônica, ou seja, a fotocatálise de uma reação que é termodinamicamente inviável na ausência de luz. Já a fotocatálise canônica é aquela em que a reação é termodinamicamente favorável, contudo, é acelerada na presença de luz. Existe o processo fotoquímico direto, em que a molécula absorve luz e as reações são processadas a partir da absorção desses fótons, e existe a fotocatálise, na qual uma outra molécula absorve luz e transfere a energia de alguma forma para a outra molécula fotocatalisada. A fotossíntese, por exemplo, é um exemplo de fotocatálise fotossensibilizada / fotocatalisada por moléculas de clorofila (Figura 22).^{144,145}

Figura 22. Estrutura molecular da clorofila *b* (Mg-Chl *b*) e feofitina *b* (Pheo *b*).



A base da fotocatalise são os processos fotoquímicos e fotofísicos, os quais são baseados na interação da luz com a matéria, que ocorrem após a absorção de fótons por moléculas fotoativas, promovendo elétrons para estados de maior energia, processo que ocorre por meio de transições do estado fundamental para o estado excitado, do tipo HOMO – LUMO. Os processos moleculares com absorção de luz e fenômenos subsequentes são representados e sumarizados no diagrama de Jablonski (Figura 23).¹⁴⁶

Figura 23. Digrama de Jablonski - representação esquemática do processo de absorção e caminhos para desativação do estado excitado.



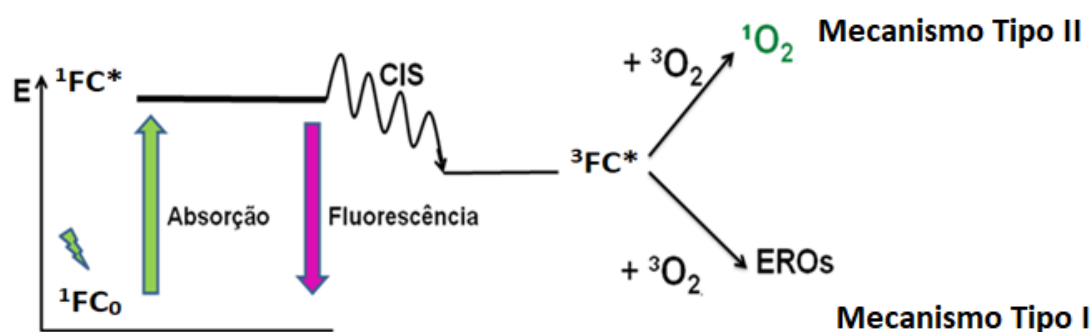
A molécula no estado quântico singleto fundamental (S_0) ao absorver um fóton é promovida para níveis quânticos de maior energia, por meio de transições eletrônicas, ou seja, o estado singleto excitado (S_1 , S_2 e etc). Transições eletrônicas de mesma multiplicidade, como as desativações de estados S_2 para S_1 são processos conhecidos como de conversão interna (CI). Tal processo envolve desativações por colisões devido a movimentos de rotação, translação e vibração das moléculas. O tempo de vida do estado quântico S_1 é da ordem de aproximadamente 10^{-9} s. Tal estado pode ser desativado por CI ou por emissão de fluorescência.^{146,147}

Outras transições competitivas que podem ocorrer é a conversão inter-sistema (CIS), em que ocorre a mudança da multiplicidade, isto é, a inversão de spin. Tal processo é induzido pelo acoplamento spin-orbita. A molécula antes no estado singleto excitado (S_1) passa para o estado tripleto excitado (T_1). Apesar de a CIS ser proibida por spin, a presença de átomos pesados confere maior rigidez estrutural na molécula o que favorece o acoplamento spin-orbita, aumentando a probabilidade da inversão de spin, e, conseqüentemente, a mudança da multiplicidade.^{146,147}

Já o processo de desativação do estado T_1 para S_1 , pode ocorrer por colisões (CIS) ou pela emissão de luz (fosforescência), sendo esse processo também proibido por spin, o estado T_1 apresenta um tempo de vida particularmente maior que o estado S_1 . Outros mecanismos de desativação do estado excitado são: mudança conformacional, transferência de carga intramolecular e interação no estado excitado com outras moléculas (transferência de elétron, transferência de próton, transferência de energia, formação de excímeros e exciplexos, entre outros).¹⁴⁶

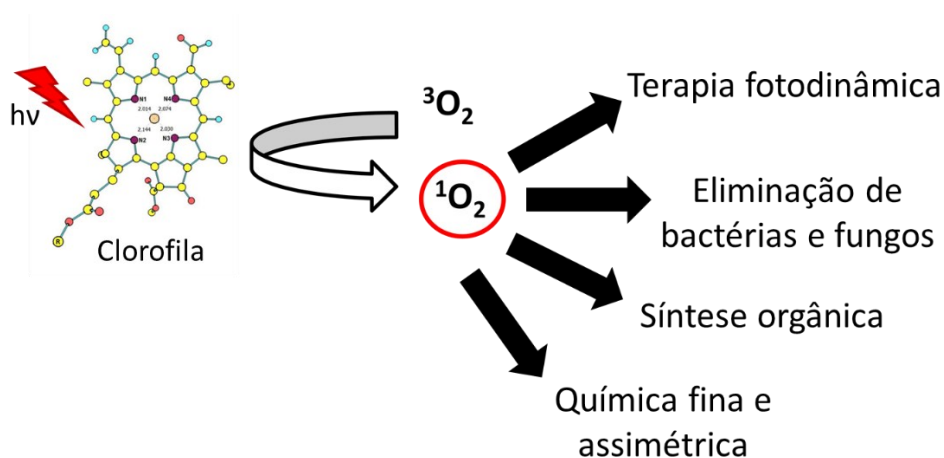
A ativação de moléculas fotossensíveis (corantes ou pigmentos), ou simplesmente fotossensibilizadores, neste caso o fotocatalisador (FC), por radiação de luz em comprimento de onda adequado, na presença de oxigênio molecular no estado fundamental, é o princípio básico da fotocatalise via espécies reativas de oxigênio.^{144,145} O Fotocatalisador no estado singleto fundamental (1FC_0) é excitado por radiação luminosa adequada e promovido para o estado singleto excitado ($^1FC^*$). Este pode sofrer conversão inter-sistema (CIS), em que ocorre a mudança da multiplicidade, convertendo o FC para estado tripleto excitado ($^3FC^*$). Uma vez no estado $^3FC^*$ pode transferir energia ou elétrons para o 3O_2 , sendo esse processo permitido por spin. A transferência de energia e de elétrons resume os dois mecanismos fotoquímicos de fotocatalise fotossensibilizada. É importante destacar que a fluorescência é um processo competitivo aos mecanismos fotoquímicos (Figura 24).

Figura 24. Diagrama de fotossensibilização para produção de oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio.



O mecanismo fotoquímico tipo I ocorre via transferência de elétrons do fotocatalisador excitado (${}^3\text{FC}^*$) para o ${}^3\text{O}_2$ formando espécies reativas de oxigênio (EROs). Por outro lado, o mecanismo fotoquímico tipo II ocorre via transferência de energia do fotocatalisador excitado (${}^3\text{FC}^*$) para o ${}^3\text{O}_2$ formando o oxigênio singleto (${}^1\text{O}_2$), Figura 24, sendo tal espécie altamente eletrofílica e reativa, e ainda possui um tempo de vida apreciavelmente maior do que os EROs. Assim, o oxigênio singleto é uma espécie de vasta versatilidade, podendo ser empregada frente a reações de oxidação de vários substratos orgânicos, em especial insaturações ou outros grupos nucleofílicos, possibilitando diversas aplicações em síntese orgânica, química fina, química assimétrica. Além disso, o oxigênio singleto é uma espécie que pode atacar corantes (moléculas altamente insaturadas), pesticidas e outros poluentes, propiciando a fotodegradação dessas moléculas e contribuindo para o desenvolvimento sustentável, aspecto estratégico da Química verde.^{4,40,148–152} Ainda, o oxigênio singleto pode ser empregado na oxidação de substratos biológicos, podendo atuar na eliminação de bactérias, inclusive as multiresistentes, fungos e outros alvos biológicos.^{152–154} No que se refere à uma abordagem terapêutica, tal espécie reativa pode ser empregada para destruição de biomoléculas cancerígenas, levando à cura de vários tipos de cânceres. Tal abordagem é conhecida como terapia fotodinâmica.^{28,29,31,155,156} Na Figura 25 são apresentadas esquematicamente as principais potencialidades de reações fotocatalizadas por moléculas de clorofila via oxigênio singleto.

Figura 25. Clorofilas como geradores de oxigênio singlete e aplicações das reações de foto-oxidação via oxigênio singlete.

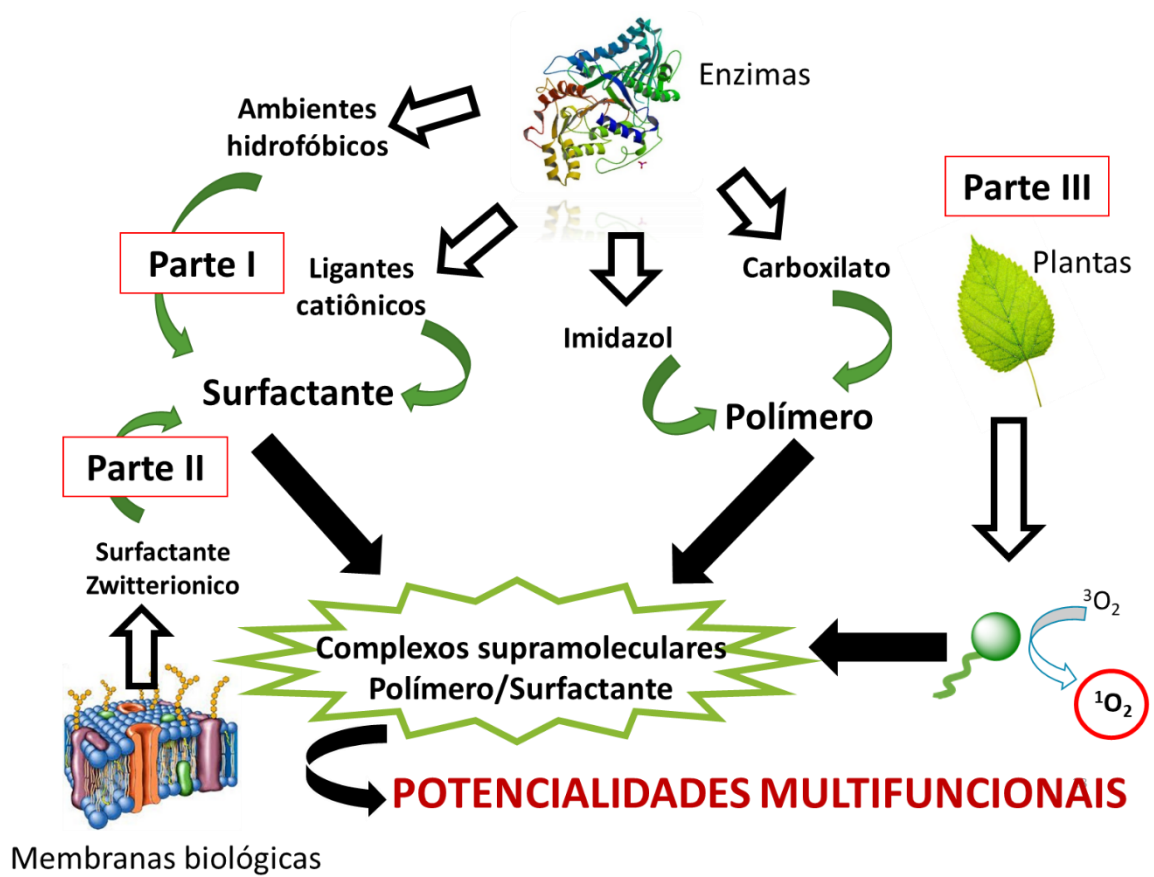


Além das reações com substratos orgânicos e biológicos, há a possibilidade de fotodegradação do próprio FC, processo nomeado de fotobranqueamento. Tal processo conduz à diminuição da concentração da espécie fotoativa levando à redução da atividade fotocatalítica, sendo esse processo indesejado visando a fotocatalise. O fotobranqueamento é evidenciado pelas mudanças nos espectros de absorção, interferindo na eficiência do processo fotocatalítico alvo. Uma mesma molécula de FC fotoestável pode gerar inúmeras moléculas da espécie reativas. Nesse caso, o oxigênio singlete, responsável pela ação catalítica. Por outro lado, no tocante à aplicação terapêutica, o fotobranqueamento poderia ser favorável no sentido da eliminação do FC do organismo e na diminuição de efeitos colaterais prolongados, isto é, contanto que essas espécies formadas pelo fotobranqueamento não sejam tóxicas.

Finalmente, tem-se grande interesse em obter sistemas fotocatalisadores estáveis, bem como incluir moléculas de clorofila do tipo *b* (praticamente não estudadas na literatura), em complexos supramoleculares/polímero surfactante visando obter sistemas catalisadores que possam atuar por várias frentes reativas, catálise nucleofílica e/ou básica geral e fotoquímica/fotocatalítica.

Como resumo da revisão bibliográfica, é apresentado uma representação esquemática do objetivo da tese no Esquema 4.

Esquema 4



2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo investigar complexos supramoleculares polímero/surfactante como catalisadores na clivagem de ésteres de fosfato, bem como na estabilização com clorofilas *b* visando o design racional e a modelagem mecânica de enzimas artificiais com potencialidades multifuncionais via catálise básica-geral, nucleofílica e fotoquímica.

2.1. ESTRATÉGIAS

Parte I

- ✓ Caracterização dos complexos supramoleculares polímero/surfactante catiônico;
- ✓ Complexos supramoleculares polímero/surfactante catiônico como nanoreatores para a clivagem de diésteres de fosfato.

Parte II

- ✓ Caracterização de micelas zwitteriônicas e complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico;
- ✓ Complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico como nanoreatores na clivagem de diésteres de fosfato.

Parte III

- ✓ Caracterização de clorofilas *b* em meio homogêneo e nanoestruturado (micelar e complexos supramoleculares polímero/surfactante);
- ✓ Complexos supramoleculares polímero/surfactante como estabilizadores de clorofilas *b* para fotocatalise.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q, com resistividade $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

O polímero Poliácido acrílico funcionalizado com grupos imidazóis (PAIM) e o substrato bis(2,4-dinitrofenil) fosfato de piridínio (BDNPP) utilizados neste trabalho foram sintetizados e disponibilizados no laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI).^{43,72,111}

Os surfactantes C_{16}TAB (Pureza $\geq 99\%$), C_{14}TAB (Pureza $\geq 99\%$), C_{12}TAB (Pureza $\geq 98\%$), C_{10}TAB (Pureza $\geq 98\%$) foram todos obtidos pela Sigma-Aldrich. A sonda fluorescente Pireno foi obtida pela Sigma-Aldrich (qualidade para fluorescência, pureza $\geq 99,0\%$), posteriormente foi purificada e recristalizada até a obtenção de cristais brancos. Os tampões Tris (Pureza $99,9\%$), Bis-Tris (Pureza $\geq 98\%$) e CHES (Pureza $\geq 99\%$) foram obtidos pela Sigma-Aldrich e o Ácido cítrico (Pureza $99,5\%$) obtido pela Synth.

Dimetilsulfóxido de alta pureza (Sigma-Aldrich) foi usado para a preparação de soluções estoque de Mg-Chl *b* e Pheo *b*. F-127 $[(\text{EO})_{106}(\text{PO})_{70}(\text{EO})_{106}$, $\text{MM} = 12600 \text{ g mol}^{-1}$] e P-123 $[(\text{EO})_{20}(\text{PO})_{70}(\text{EO})_{20}$, $\text{MM} = 5750 \text{ g mol}^{-1}$] foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Tween 20 $[\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$, $\text{MM} = 1227,54 \text{ g mol}^{-1}$] e Tween 80 $[\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$, $\text{MM} = 1310 \text{ g mol}^{-1}$] foram adquiridos da Synth. Os surfactantes foram secos sob vácuo por 24 horas antes do uso. O Mg-Chl *b* foi separado e purificado utilizando uma cromatografia de camada fina circular (aparelho de cromatotron da Harrison Research, modelo 8924) e Pheo *b* foi obtido de Mg-Chl *b* como descrito abaixo.

A Mg-Chl *b* foi extraída das folhas de agrião de acordo com a metodologia descrita na literatura.¹⁵⁷ As folhas foram imersas em metanol / éter (2: 1, v / v), seguido pela adição de hexano / éter dietílico (1: 1, v / v). Foi realizada uma extração líquido-líquido em solvente orgânico e solução salina, os compostos orgânicos foram separados e o solvente removido em um rotaevaporador. O extrato sólido foi eluído numa coluna de sílica gel 60 utilizando uma mistura de etanol: hexano 5:95 v/v e os pigmentos verdes foram isolados. Os principais componentes dos tipos Mg-Chl *a* e *b* foram finalmente

separados por cromatografia circular em camada delgada com sílica como fase estacionária e etanol / hexano (5:95 v / v) como fase móvel. A Pheo *b* foi obtida adicionando algumas gotas de HCl 2,0 molL⁻¹ a uma solução de clorofórmio de Mg-Chl *b*, seguida de adição de água para remover os íons magnésio. As Chls foram confirmadas por espectroscopia UV-Vis e os espectros comparados aos encontrados na literatura.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

As medidas deste trabalho foram realizadas em sua grande maioria no Laboratório 203, e também nos laboratórios 312 e 313 do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. O laboratório 203 possui uma câmara limpa (capela TROX série 2061, modelo FLV-CLIB2 de fluxo laminar, Classe 100) que funciona utilizando sistemas de ventiladores de insuflamento e exaustão, além de filtros especiais, visando a obtenção de uma atmosfera com um número de partículas em suspensão controlada, e, assim, possuindo um controle de partículas de 0,3 – 0,5 µm, sendo classificado como laboratório branco. A contagem do número de partículas é realizada pelo Núcleo de Manutenção da UFSC, o qual está credenciado pelo INMETRO, que utiliza um aparelho de contagem de partículas tipo: MEI-ONE 277-B, calibrado pela Instrutécnica (São Paulo). Além disso, o laboratório possui um rigoroso controle de temperatura em 25°C.

Todos os laboratórios citados são pertencentes ao Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI) que é associado ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Catálise em sistemas moleculares e nanoestruturados (INCT-Catálise). As medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram realizadas no Laboratório de Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

As cubetas utilizadas neste trabalho são de quartzo, com caminho ótico de 1 cm, de 4 faces translúcidas para fluorescência e 2 faces translúcidas para absorção UV-Vis.

Condutivimetria. Para as medidas de condutividade de pH das soluções foi utilizado um condutivímetro Metrohm modelo 712.

Potenciometria. Para controle do pH das soluções foi utilizado um potenciômetro Metrohm modelo 827.

Espalhamento dinâmico de Luz (DLS). O diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos agregados supramoleculares foram obtidos através do equipamento de espalhamento dinâmico de luz Brookhaven Zeta Plus / Bi-MAS com laser operando em 657 nm e ângulo de espalhamento de 90°.

Espectrofotometria de fluorescência. As medidas de emissão de fluorescência molecular no estado estacionário foram realizadas utilizando o espectrofluorímetro Cary Eclipse da Varian. Esse equipamento utiliza como fonte de excitação uma lâmpada de Xenônio de 450 W e permite ajustar tamanhos de fendas e voltagens.

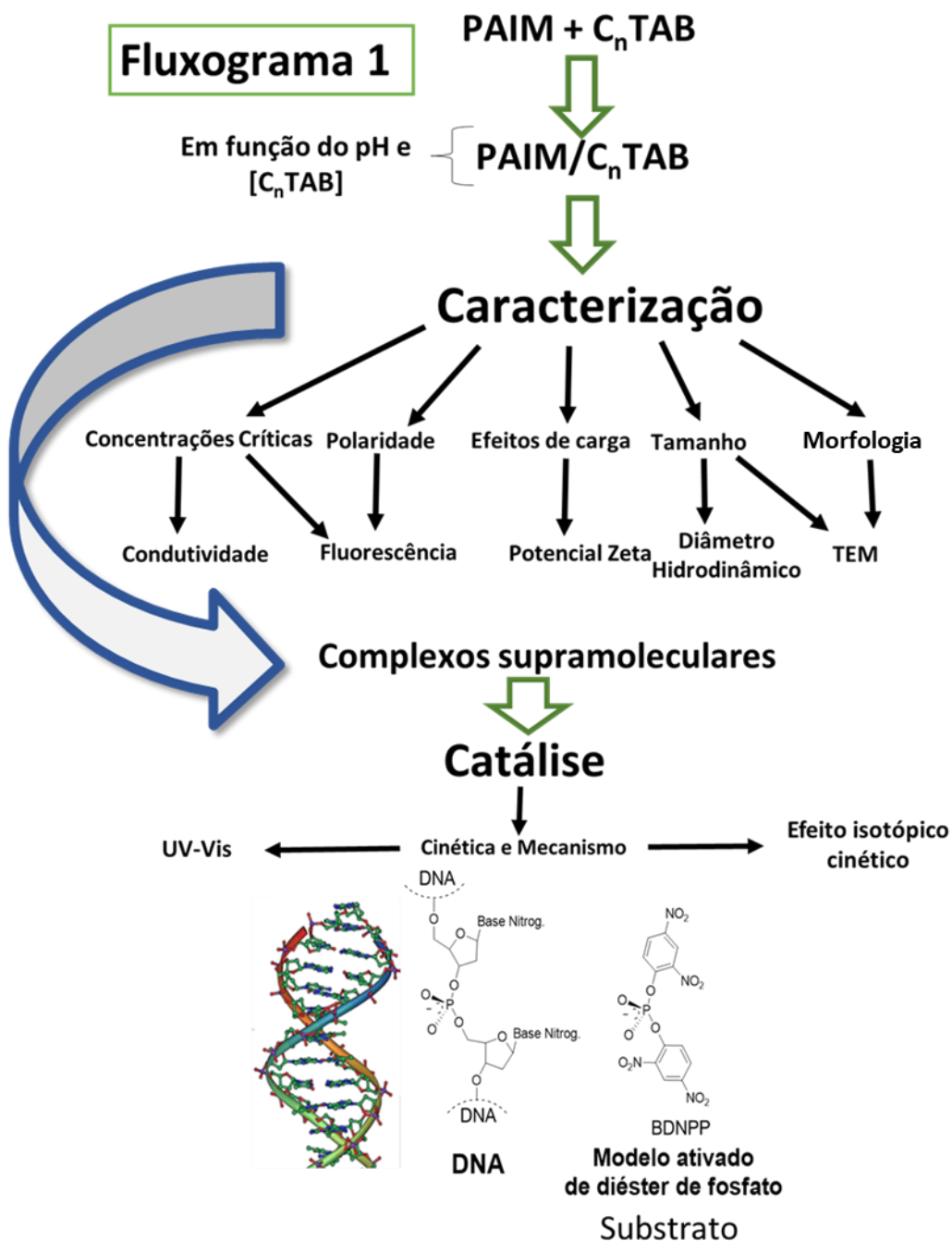
Espectrofotometria de absorção eletrônica. As medidas de absorção eletrônica foram realizadas utilizando o espectrofotômetro UV-Vis Cary 50 da Varian acoplado a um sistema Peltier de controle de temperatura.

Microscopia de transmissão eletrônica. A microscopia eletrônica de transmissão, MET, foi realizada em um microscópio de transmissão eletrônica JEOL JEM-1011 e/ou JEM-2100 operado a 100 kV e 200kV, respectivamente (utilizando um filamento de tungstênio como fonte de elétrons).

3.3. METODOLOGIA

PARTE I

Fluxograma 1. Fluxograma metodológico da Parte I. Complexos supramoleculares polímero/surfactante catiônico: caracterização, catálise e mecanismo de reações de desfosforilação.

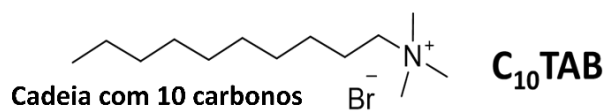
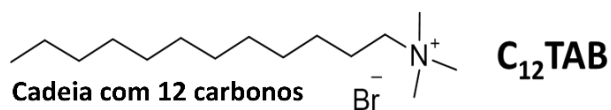
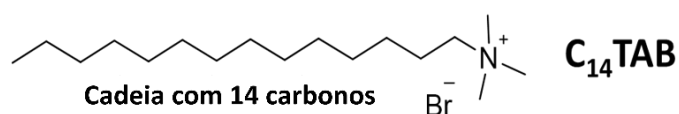
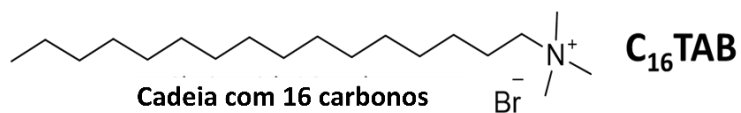
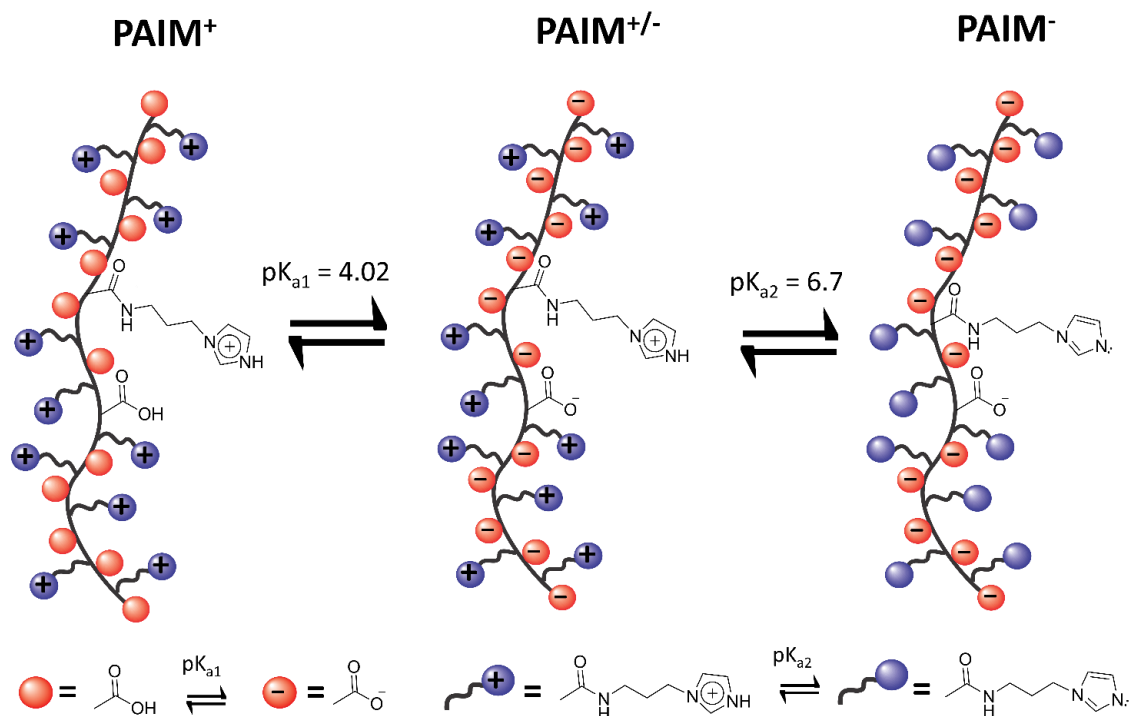


3.3.1. Complexos supramoleculares no design de enzimas artificiais

Foram empregados neste trabalho complexos supramoleculares baseados na associação entre:

- ✓ Políácido acrílico funcionalizado com grupos imidazóis (PAIM).
- ✓ Surfactantes catiônicos: brometo de N-álquil-N,N,N-trimetil-amônio (C_n TAB) com diferentes tamanhos de cadeias alquílicas, contendo dez, doze, catorze e dezesseis carbonos (C_{10} TAB, C_{12} TAB, C_{14} TAB e C_{16} TAB, respectivamente). Em todos os experimentos, manteve-se a concentração de PAIM constante (2×10^{-4} mol L⁻¹), em função da concentração de surfactante e pH. A ilustração e as estruturas moleculares do polímero PAIM e suas respectivas espécies ácido-base; e os surfactantes catiônicos da classe C_n TAB utilizados neste trabalho são apresentados na Figura 26.

Figura 26. Ilustração e estruturas moleculares do polímero PAIM e suas respectivas espécies ácido-base; e os surfactantes catiônicos da classe C_n TAB utilizados neste trabalho (C_{16} TAB, C_{14} TAB, C_{12} TAB e C_{10} TAB).



3.3.2. Caracterização dos complexos supramoleculares

I. Concentrações críticas por condutividade

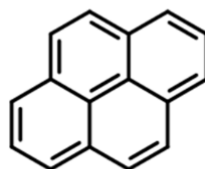
As medidas de condutividade foram realizadas utilizando uma célula com controle constante de temperatura em $25,0 \pm 0,1$ °C. Foram realizadas titulações com soluções estoque de surfactantes C_n TAB sobre soluções aquosas do polímero PAIM (2×10^{-4} mol L⁻¹) com volume inicial de 20 mL sob agitação magnética em pH 9,0; 7,0; 6,0; 5,0 e 3,0. As titulações foram realizadas para determinação das concentrações micelares críticas e avaliação da formação dos complexos supramoleculares PAIM/ C_n TAB. As concentrações das soluções estoques dos surfactantes empregados foram: $[C_{14}TAB]=0,02$ mol L⁻¹; $[C_{12}TAB]=0,1$ mol L⁻¹ e $[C_{10}TAB]=0,5$ mol L⁻¹. Todas as soluções foram preparadas na ausência de tampão, em que tais soluções foram autotampoadas pelo polímero PAIM. Em ordem de comparação, foram realizadas medidas em água pura com diferentes concentrações de C_n TAB (ausência de PAIM).

II. Concentrações críticas e polaridade por fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando a sonda fluorescente Pireno (Py) (que possui a razão entre as suas bandas vibrônicas sensíveis à polaridade e à formação de ambientes hidrofóbicos). A estrutura molecular da sonda fluorescente pireno é apresentada na Figura 27. As soluções foram preparadas dentro de uma câmara limpa (capela TROX, classe 100), em um laboratório branco certificado, utilizando luvas de nitrila (isentas de talco). A concentração de Pireno empregada foi 5×10^{-7} mol L⁻¹, muito abaixo da concentração de formação de excímeros em água ($> 2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). A excitação foi realizada em 334nm, com fendas de excitação e emissão fixadas em 5nm. Foram registrados espectros de emissão de fluorescência do Pireno com concentração do polímero fixa ($[PAIM]=2 \times 10^{-4}$) e em diferentes concentrações de surfactantes C_n TAB e em pH 9,0; 7,0; 6,0 e 3,0. As soluções em pH 9,0 foram tampoadas com Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), em pH 7,0 e 6,0 com Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (Bis-Tris) e em pH 3,0 com citrato. Os efeitos de polaridade dos complexos supramoleculares e das micelas formadas em solução foram acompanhados pela razão entre as bandas vibrônicas I e III, nos comprimentos de onda de 373 nm e 385 nm, respectivamente. Adicionalmente, as concentrações críticas foram estimadas a partir

da razão entre a banda do excímero (Ex) e a banda referente ao monômero (M), nos comprimentos de onda de 475nm e 385nm, respectivamente.¹⁶¹

Figura 27. Estrutura molecular da sonda fluorescente Pireno.



Pireno (Py)

III. Medidas de Diâmetro hidrodinâmico

Os diâmetros hidrodinâmicos dos complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB foram determinados em quintuplicata através do equipamento de Espalhamento Dinâmico de Luz Zeta Plus BrookHeaven. As soluções foram preparadas e manipuladas dentro de uma câmara limpa (capela TROX, classe 100), em um laboratório branco certificado, utilizando luvas de nitrila (isentas de talco). Todas as soluções foram filtradas com filtro PVDF 0,45 µm (ChromafilXtraCA-45) antes da preparação dos complexos. Condições das amostras: [PAIM] = 2x10⁻⁴ mol L⁻¹; em diferentes concentrações de C_nTAB; e pH 9,0; 7,0; 6,0 e/ou 3,0. Todas as análises foram realizadas em T=25,0 °C com sistema peltier de controle de temperatura. As soluções em pH 9,0 foram tamponadas com Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), em pH 7,0 e 6,0 com Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (Bis-Tris) e em pH 3,0 com Citrato. Ainda foram realizadas cinéticas de estabilidade termodinâmica dos complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB acompanhando a variação do diâmetro hidrodinâmico com o tempo.

\

IV. Medidas de Potencial Zeta

Os potenciais zeta dos complexos PAIM/C_nTAB em pH 9 foram determinados em quintuplicata através do equipamento de Espalhamento Dinâmico de Luz ZetaPlus da BrookHeaven, pelo método analisador de potencial zeta. As soluções foram preparadas e manipuladas dentro de uma câmara limpa (capela TROX, classe 100), em um laboratório

branco certificado, utilizando luvas de nitrila (isentas de talco). Todas as soluções foram filtradas com filtro PVDF 0,45 μm (ChromafilXtraCA-45) antes da preparação dos complexos. As amostras foram preparadas com $[\text{PAIM}] = 2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; pH 9,0 e diferentes concentrações de C_nTAB . Todas as análises foram realizadas em $T=25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ com sistema peltier de controle de temperatura. As soluções em pH 9,0 foram tamponadas com Tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Foram reportadas neste trabalho medidas referentes aos complexos PAIM/ C_{14}TAB em pH 9.

V. Medidas de Espalhamento de luz relativo

As medidas de espalhamento de luz relativo dos complexos supramoleculares PAIM/ C_nTAB foram determinadas através da leitura de absorção de luz do espectrofotômetro Varian Cary-50 em 400nm na ausência de moléculas cromofóricas. As soluções foram preparadas dentro de uma câmara limpa (capela TROX, classe 100), em um laboratório branco certificado, utilizando luvas de nitrila (isentas de talco). As amostras foram preparadas com $[\text{PAIM}] = 2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; em e pH 9,0; 7,0; 6,0 e/ou 3,0, e em diferentes concentrações de C_nTAB . Todas as análises foram realizadas em $T=25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ com sistema peltier de controle de temperatura. As soluções em pH 9,0 foram tamponadas com Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), em pH 7,0 e 6,0 com Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (Bis-Tris) e em pH 3,0 com Citrato. Em ordem de comparação foram realizadas medidas em água pura com diferentes concentrações de C_nTAB (ausência de PAIM).

VI. Morfologia e tamanho dos complexos por microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM)

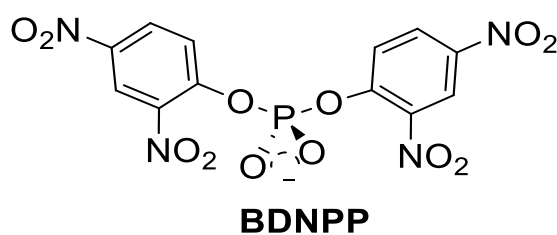
As micrografias de complexos polímero / surfactante foram obtidas utilizando microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 TEM (equipamento de LCME-UFSC). As micrografias foram obtidas pela Pós-doutoranda Laíze Zaramello. Todas as soluções foram preparadas em uma câmara limpa (TROX Classe 100) em um laboratório branco certificado usando luvas de nitrila (sem talco) e filtradas com filtro PVDF de 0,45 μm (ChromafilXtraCA-45) antes da preparação dos complexos, nas condições: $[\text{PAIM}] =$

$2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{C}_{16}\text{TAB}] = 7,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (muito próximo ao CMC), $\text{pH} = 9,0$. Após 72 horas de preparação do complexo (para estabilidade completa), as amostras foram preparadas depositando a solução de complexos supramoleculares em uma grade de Cu-carbono. O excesso de solução foi removido com um toque lateral suave de um papel de filtro. Foi utilizada uma gota de uma solução de acetato de uranil (0,05%, m/v) como um agente de coloração negativo. Posteriormente, foi realizada uma etapa criogênica. A grade foi imediatamente congelada com nitrogênio líquido com liofilização simultânea. A liofilização foi realizada por 24 horas usando o liofilizador Labconco. Os complexos supramoleculares foram contados e medidos usando o software ImageJ.

3.3.3. Cinéticas de reações orgânicas de desfosforilação

As cinéticas das reações de desfosforilação do diéster bis-2,4-dinitrofenil fosfato (BDNPP) foram monitoradas através da formação da banda de absorção do produto 2,4-dinitrofenolato em 360nm utilizando um espectrofotômetro Varian Cary 50 com sistema peltier de controle de temperatura constante a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$. O substrato BDNPP esteve sempre na forma monoaniônica em todos os pH investigados neste trabalho ($\text{pK}_{\text{aBDNPP}} \approx -1,5$). A estrutura molecular do BDNPP é apresentada na Figura 28. As reações foram realizadas na presença dos sistemas catalisadores aquosos (PAIM e complexos PAIM/ C_nTAB) avaliando o efeito da concentração de surfactante C_nTAB , efeito do pH, e efeito isotópico (reações em D_2O e H_2O). Tais reações foram iniciadas pela adição de $10 \mu\text{L}$ de uma solução estoque concentrada do substrato ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila) em 2mL do sistema reacional aquoso, resultando em $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do substrato em solução.

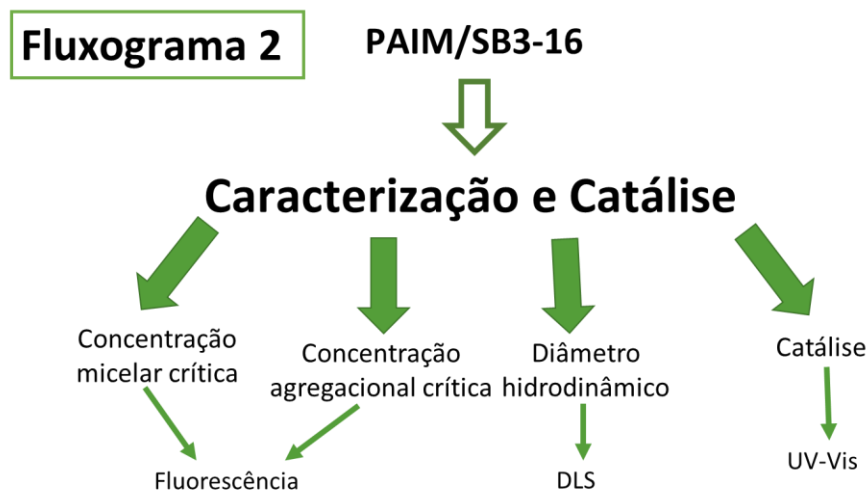
Figura 28. Estrutura molecular do substrato Bis-(2,4,-dinitro-fenil) fosfato.



Foram realizados ajustes iterativos das cinéticas para obtenção das constantes de velocidades observadas utilizando a equação para reação de duas etapas consecutivas, considerando a hidrólise do diéster e subsequente hidrólise do monoéster de fosfato. As reações continham grande excesso de nucleófilos no meio reacional, o que garante a consideração de uma cinética pseudo-primeira-ordem no caso de ataque nucleofílico sobre o substrato na primeira ou segunda etapa da reação. Todas as soluções foram tamponadas com ácido cítrico (pH 3-5), Bis-Tris (pH 5,5-7), Tris (pH 7,5-9) e CHES (pH 9,5-10).

PARTE II

Fluxograma 2. Fluxograma metodológico da Parte II: Micelas zwitteriônicas e complexos polímero/surfactante zwitteriônico: Novo método de determinação de CMC, caracterização e catálise de reações de desfosforilação.



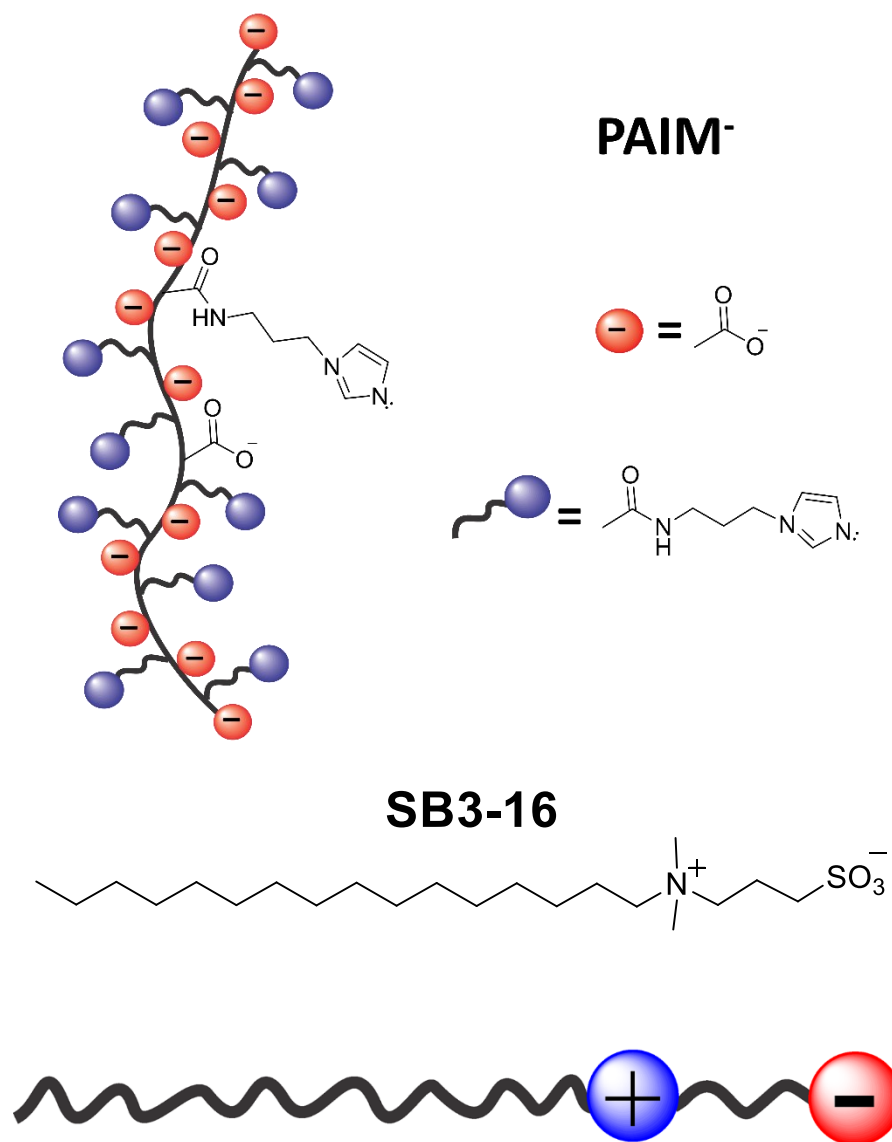
3.3.4. Complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico

Foram empregados neste trabalho complexos supramoleculares baseados na associação entre:

- ✓ Políácido acrílico funcionalizado com grupos imidazóis (PAIM).
- ✓ Surfactante zwitteriônico: Brometo de N-Hexadecil-N,N-dimetil-amônio-N-propanesulfonate (SB3-16)

Em todos os experimentos, manteve-se a concentração de PAIM constante ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), em função da concentração de surfactante e pH. A ilustração e as estruturas moleculares do polímero PAIM⁻ e suas respectivas espécies ácido-base e o surfactante zwitteriônico SB3-16 utilizados neste trabalho são apresentados na Figura 29.

Figura 29. Ilustração e estruturas moleculares do polímero PAIM e suas respectivas espécies ácido-base; e o surfactante zwitteriônico SB3-16.



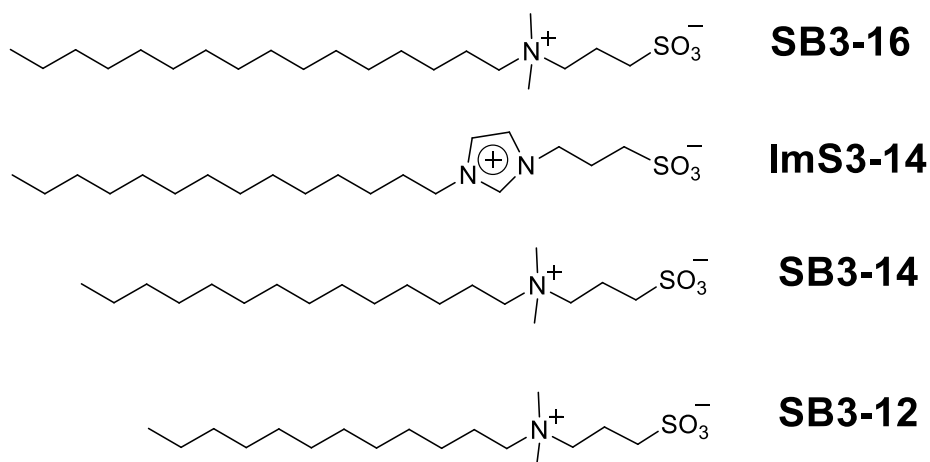
I. Medidas de condutividade.

As medidas de condutividade foram realizadas usando o condutímetro Metrohm modelo-712 e os dados experimentais foram coletados por uma titulação em função da concentração do surfactante. Condições experimentais: todas as amostras estavam em tampão Bis-Tris ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 7,0. O ajuste e controle do pH foram realizados utilizando um potenciômetro Metrohm modelo 713. Todas as medições foram realizadas sob agitação magnética. Uma célula revestida com água foi utilizada com equipamentos de banho-maria para o controle de temperatura a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando termômetro durante todos os ensaios para garantir um controle rigoroso da temperatura.

II. Medidas de espalhamento dinâmico de luz.

Os diâmetros hidrodinâmicos (D_H) das micelas zwitteriônicas foram determinados usando o equipamento de espalhamento dinâmico de luz Brookhaven Zeta Plus / Bi-MAS com laser operando a 657 nm e ângulo de espalhamento de 90° . As estruturas moleculares dos surfactantes zwitteriônicos investigados são apresentadas na Figura 30. As análises foram realizadas na presença de tampão Bis-Tris $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,0 e a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ com um sistema de controle de temperatura Peltier. O ajuste e o controle do pH foram realizados com um potenciômetro Metrohm modelo 713. As soluções foram preparadas e manuseadas em uma câmara limpa (capela TROX classe 100) usando luvas de nitrila (livres de talco). $[\text{SB3-n}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{ImS3-14}] = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Todas as amostras foram filtradas através do filtro PVDF de $0,20 \text{ }\mu\text{m}$ antes da análise.

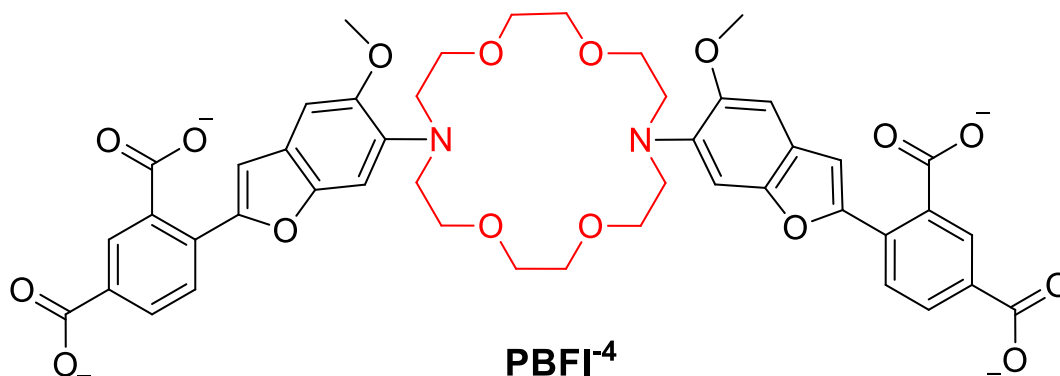
Figura 30. Estruturas moleculares dos surfactantes zwitteriônicos investigados.



III. Determinação das constantes de ligação PBFI em micelas zwitteriônicas.

As constantes de ligação (K_b) da sonda PBFI nas micelas zwitteriônicas foram determinadas a partir da emissão de fluorescência em função da concentração do surfactante. A estrutura molecular da sonda fluorescente PBFI é apresentada na Figura 31. As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas usando o espectrofluorímetro Cary Eclipse da Varian. Esse equipamento utiliza como fonte de excitação uma lâmpada de xenônio de 450 W. As amostras foram preparadas em uma câmara limpa (TROX 2061 Chapel, Série FLV-CLIB2, Classe 100) em um laboratório branco certificado usando luvas de nitrila (sem talco). As condições experimentais utilizadas foram: $[PBFI] = 1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (concentração muito baixa, evitando o efeito do filtro interno), $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,0$ e tampão Bis-Tris $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ para controlar o pH.

Figura 31. Estrutura molecular da sonda fluorescente PBFI⁴.



O comprimento de onda de excitação foi fixado em 343 nm e a emissão foi avaliada na faixa de 400 a 670 nm. Ajustes nas isotermas foram feitos a partir da Eq. 1, obtido da Ref.¹⁶² para determinar constantes de ligação simultânea nos sistemas surfactantes (K_b) (a partir da emissão em função da concentração do surfactante) e CMC.

$$F = F_f + \frac{(F_0 - F_f)}{(1/K_b([S] - cmc)^N) + 1} \quad \text{Eq. 1}$$

na qual, F : intensidade de fluorescência; F_f : fluorescência de Chl com surfactante; F_0 : fluorescência na ausência de surfactante; K_b : constante de ligação; $[S]$: concentração de surfactante e N : número de compostos por micela.

IV. Rendimento quântico de fluorescência do PBFI em micelas zwitteriônicas.

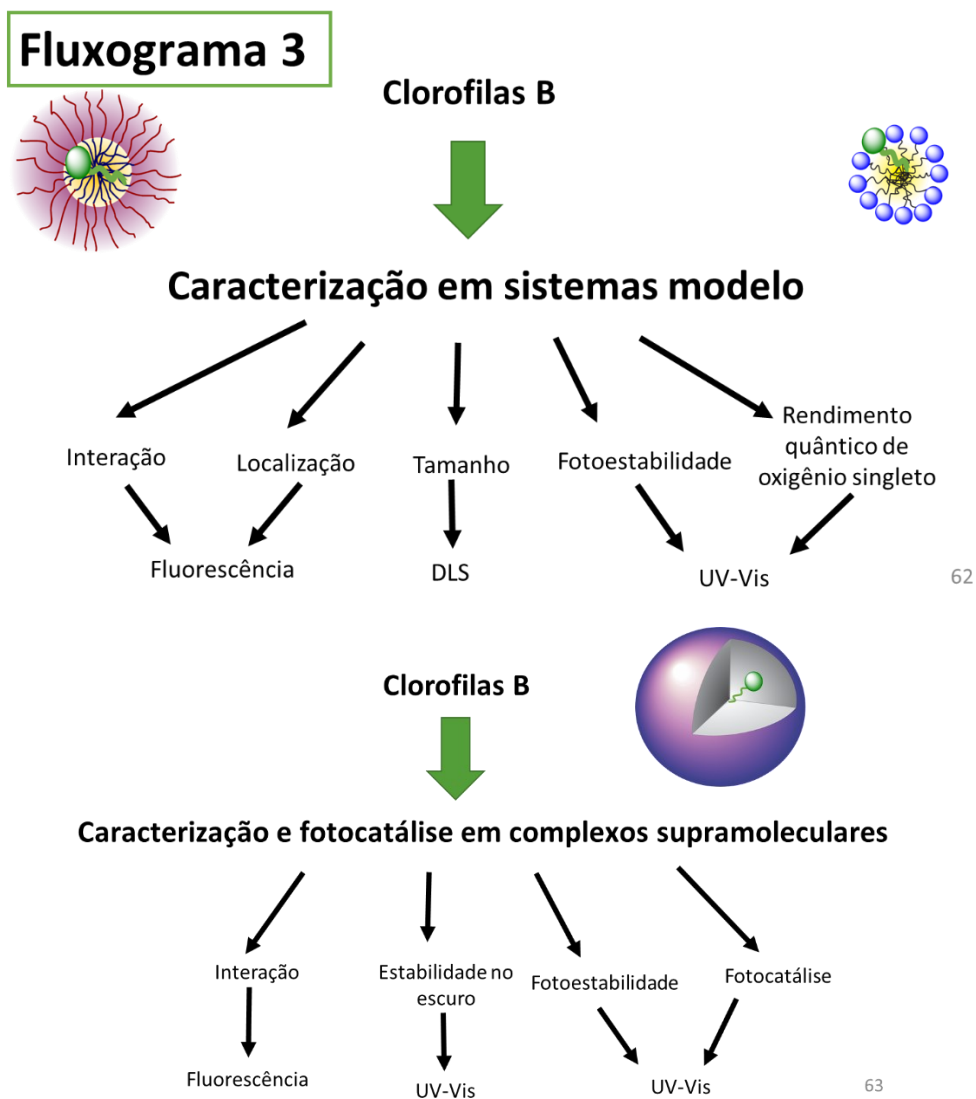
Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) de PBFI na presença de surfactantes e micelas zwitteriônicas foram determinados usando PBFI em água como padrão, $\Phi_F = 0,024$.¹⁶³ Os espectros de absorção e emissão das amostras foram obtidos a 25,0°C e pH 7,0 (tampão Bis-Tris). O comprimento de onda de excitação foi fixado em 350 nm e a emissão foi avaliada na faixa de 400 a 670 nm. Os valores de Φ_F foram calculados a partir da Eq. 2.¹⁴⁶

$$\phi_{F,C} = \frac{Abs_P \cdot F_C \cdot n_P^2}{Abs_C \cdot F_P \cdot n_C^2} \cdot \phi_P \quad \text{Eq. 2}$$

na qual, P : padrão e C : corante; n : índice de refração; F : área do espectro de emissão de fluorescência, Abs : absorvância no λ de excitação.

PARTE III

Fluxograma 3. Esquema metodológico da Parte III: Caracterização de clorofilas *b* em sistemas modelo; caracterização e fotocatalise em complexos supramoleculares polímero/surfactante



3.3.5. *Clorofilas b em meio homogêneo e sistemas nanoestruturados modelo*

I. Coeficiente de partição

Os pigmentos de clorofila (Chl) foram adicionados a uma mistura 50% (v / v) de 1-octanol / água. Após vigorosa mistura e repouso por 48h no escuro, as concentrações de corante nas fases aquosa ($[Chl]_{\text{água}}$) e orgânica ($[Chl]_{\text{oct}}$) foram determinadas por espectrofotometria UV-Vis. O coeficiente de partição (K_P) foi calculado usando a Eq. 3

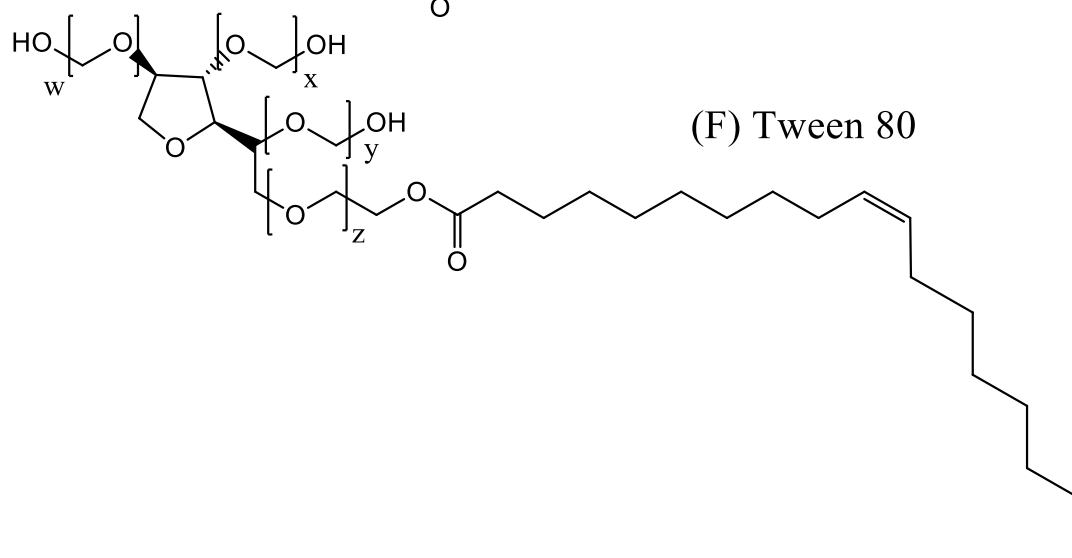
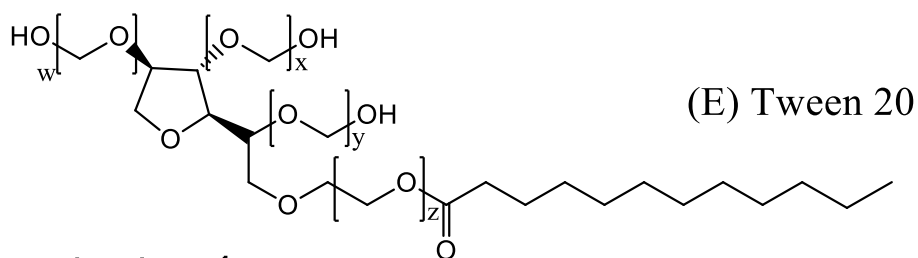
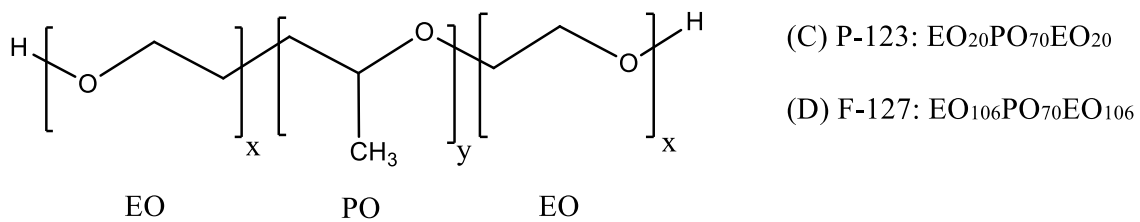
$$K_P = \frac{[Chl]_{\text{oct}}}{[Chl]_{\text{água}}} \quad \text{Eq. 3}$$

na qual, K_P = coeficiente de partição, $[Chl]_{\text{oct}}$ = concentração de Chl em 1-octanol; $[Chl]_{\text{água}}$ = concentração de Chl em água.

II. Estudos de ligação em sistemas micelares

As constantes de ligação K_b entre as Chls e as micelas não-iônicas modelo foram estimadas por curvas de titulação dos compostos investigados contra soluções aquosas de surfactante. Após a adição de cada alíquota de surfactante (F-127, P-123, Tween 80 ou Tween 20), sob agitação, o espectro de emissão de fluorescência foi registrado usando um controlador de temperatura Varian Cary Eclipse com Peltier e os dados foram ajustados usando a Eq. (1).¹⁶² As estruturas moleculares dos surfactantes não-iônicos modelos F-127, P-123, Tween 80 e Tween 20 são apresentadas na Figura 32. O comprimento de onda de excitação para Mg-Chl *b* foi 461nm e para Pheo *b* 435nm e a concentração total de fluoróforo foi de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, o que corresponde a uma absorvância menor que 0,065 na faixa de Soret para evitar erros de filtro interno. As condições usuais para todas as experiências foram pH = 7,25 (pH fisiológico, tampão McIlvaine, $[Na_2HPO_4] = [ácido\ cítrico] = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 25,0 ° C e $[NaCl] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

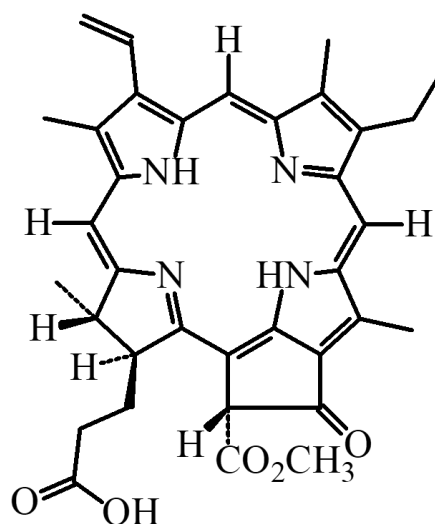
Figura 32. Estruturas moleculares de surfactantes não-iônicos empregados como sistemas modelo.



III. Rendimento quântico de fluorescência

Os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_F) foram obtidos por espectros de absorção UV-Vis e emissão do corante padrão (Feoforbídeo *a* (Pheid *a*) em etanol, Figura 31) e os investigados: Mg-Chl *b* e Pheo *b* em diferentes meios a $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH}=7,25$. Os valores de ϕ_F foram obtidos utilizando a Eq. 2. A estrutura molecular do padrão de fluorescência Pheid *a* é apresentada na Figura 33.

Figura 33. Estrutura molecular do padrão de rendimento quântico de fluorescência: Feoforbídeo *a* (Pheid *a*).



Feoforbídeo a (Pheid a)

IV. Medidas do tamanho micelar e do potencial zeta

Os diâmetros hidrodinâmicos e o potencial zeta dos sistemas coloidais foram determinados pelo equipamento de dispersão dinâmica da luz - DLS ZetaPlus Brookhaven, utilizando o método de dimensionamento de partículas e potencial zeta. Condições das amostras: 1% (m / v) de surfactantes na água que corresponde a: [P-123] = $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, [F-127] = $7,94 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, [Tween 20] = $8,96 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e [Tween 80] = $8,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, todos acima da CMC, que garante a presença de micelas, em pH = 7,25 (pH fisiológico do sangue, tampão McIlvaine, [Na₂HPO₄] = [ácido cítrico] = $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 25,0 ° C e [NaCl] = $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram preparadas e manipuladas em uma câmara limpa (TROX Chapel classe 100) usando luvas de nitrila (livres de talco) em um laboratório branco certificado. Todas as amostras foram filtradas através do filtro PVDF 0,20 µM (ChromafilXtraCA-20/25) antes da análise.

V. Incorporação de clorofila *b* e feofitina *b* em sistemas micelares não-iônicos

As soluções de Mg-Chl *b* e Pheo *b* foram preparadas adicionando solução estoque de clorinas em soluções aquosas de 1% (m / v) de surfactante F-127, P-123, Tween 80 e Tween 20 em pH = 7,25 (pH fisiológico do sangue, tampão McIlvaine, [Na₂HPO₄] = [ácido cítrico] = $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 25,0 ° C e [NaCl] = $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação. A quantidade de DMSO nesta solução aquosa sempre foi inferior a 1% (v / v). As amostras foram preparadas 24 horas antes da análise. As concentrações dos surfactantes nessas soluções aquosas geralmente eram: [P-123] = $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, [F-127] = $7,94 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, [Tween 20] = $8,96 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e [Tween 80] = $8,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Todas as concentrações estavam acima do CMC, o que garante a presença de micelas.

VI. Estudos de supressão de fluorescência

A supressão de fluorescência dos compostos estudados foi avaliada em micelas não-iônicas. Para esses estudos, o íon iodeto foi utilizado como agente supressor solúvel em água. A constante de Stern-Volmer (K_{SV}) foi obtida pela Eq. (4)¹⁴⁶

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[I^-] \quad \text{Eq. 4}$$

na qual, F_0 : intensidade de fluorescência na ausência do supressor e F : intensidade de fluorescência na presença de supressor e $[I^-]$: concentração de iodeto (supressor aquo-solúvel).

VII. Cinéticas de fotobranqueamento

Os estudos de fotodegradação foram realizados para Mg-Chl *b* e Pheo *b* em sistemas micelares não iônicos, e complexos supramoleculares polímero/surfactante. As cinéticas foram monitoradas por espectroscopia eletrônica UV-Vis com irradiação constante da luz por LASER com emissão máxima de 658nm, 102 mW. Os dados cinéticos foram ajustados usando uma equação de decaimento biexponencial.

VIII. Rendimentos quânticos de oxigênio singlete

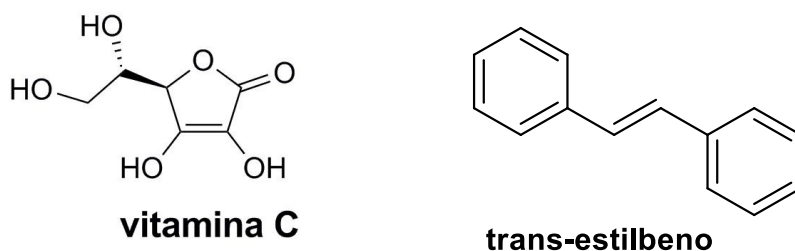
A determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete para Mg-Chl *b* e Pheo *b* foi realizada em etanol, de acordo com a metodologia e o tratamento matemático descritos na literatura.^{164,165} O ácido úrico (UA) foi utilizado como sonda química, utilizando três concentrações diferentes de Chl a 25° C. O sistema de iluminação foi um LASER com emissão máxima em 658nm, 102mW.

3.3.6. *Clorofilas b em complexos supramoleculares polímero/surfactante: Caracterização e aplicação em fotocatalise*

IX. Cinética de fotocatalise com Vitamina C e Trans-estilbeno

Os estudos de fotocatalise foram realizados para Mg-Chl *b* em complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico sobre os substratos modelo: Ácido ascórbico (Vitamina C) e trans-estilbeno (Figura 34). Modelos de reações de oxidação bem reconhecidos pela sua alta reatividade frente ao oxigênio singleto.^{149,150} As cinéticas foram monitoradas por espectroscopia eletrônica UV-Vis com irradiação constante da luz por LASER com emissão máxima de 658nm, 102 mW. Os dados cinéticos foram ajustados usando uma equação de decaimento biexponencial.

Figura 34. Estruturas moleculares dos substratos para reações de foto-oxidação: Vitamina C e trans-estilbeno.



PARTE I

Parte I: Complexos supramoleculares polímero/surfactante catiônico: caracterização, catálise e mecanismo de reações de desfosforilação

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

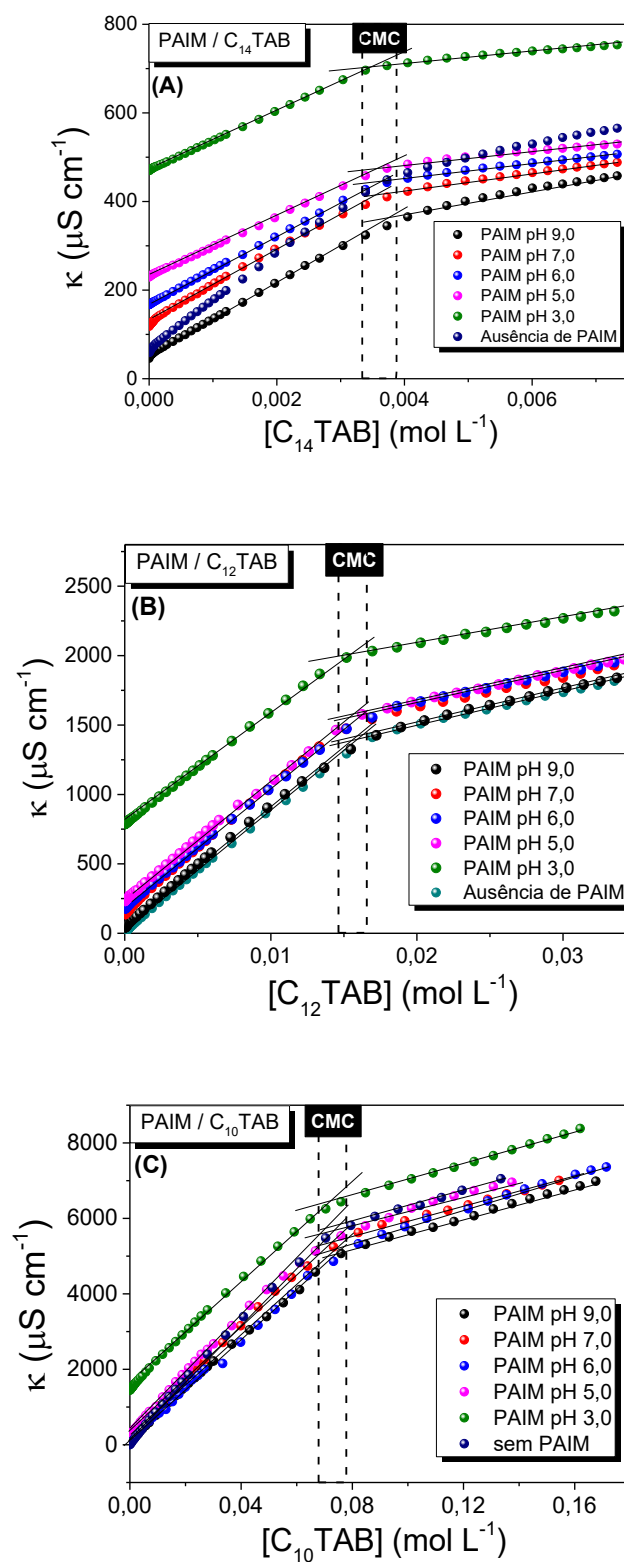
4.1. **PARTE I: Complexos supramoleculares polímero/surfactante catiônico: caracterização, catálise e mecanismo de reações de desfosforilação**

Visão geral - Parte I: Nesta parte são apresentados estudos de caracterização, catálise e mecanismo por complexos supramoleculares polímero/ surfactante tipo complexos polímero poliácido acrílico funcionalizado com grupos imidazóis (PAIM), associado por interações supramoleculares com surfactantes catiônicos brometo de N-alkuil-N-N-N-trimetil-amônio (C_n TAB). A caracterização dos complexos supramoleculares foi realizada através das técnicas de condutividade, fluorescência pela sonda fluorescente pireno, diâmetro hidrodinâmico, espalhamento de luz relativo, microscopia eletrônica de transmissão e potencial zeta. Além disso, os complexos caracterizados foram empregados como catalizadores em reações de desfosforilação de um diéster de fosfato ativado, as cinéticas foram acompanhadas por espectrofotometria de absorção eletrônica, as constantes de velocidade de segunda ordem obtida por ajustes matemáticos específicos e o mecanismo elucidado por efeito isotópico cinético.

4.1.1. *Caracterização dos complexos polímero/surfactante catiônico*

Medidas de condutividade permitiram determinar a concentração micelar crítica (CMC) dos surfactantes C_{14} TAB, C_{12} TAB e C_{10} TAB na presença e ausência do polímero PAIM em diferentes pH. Os valores de CMC foram determinados através do ponto de intersecção entre duas retas consecutivas, sendo essa metodologia padrão para determinação de CMC por condutividade.¹⁶⁶⁻¹⁷⁰ Na Figura 35, são apresentados os dados de condutividade obtidos em função da concentração de C_n TAB na presença e ausência de PAIM em diferentes pH, na qual (A) PAIM/ C_{14} TAB (B) PAIM/ C_{12} TAB e (C) PAIM/ C_{10} TAB.

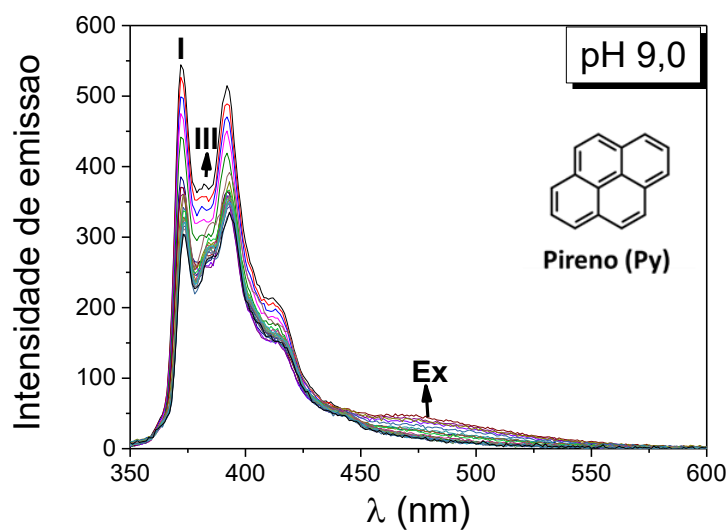
Figura 35. Condutividade das soluções de PAIM em diferentes pH e concentrações de C_n TAB. Dados de C_n TAB em água como padrão para comparação. (A) PAIM/ C_{14} TAB (B) PAIM/ C_{12} TAB e (C) PAIM/ C_{10} TAB. Medidas realizadas em $T=25,0\text{ }^\circ\text{C}$ e $[\text{PAIM}]=2\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$. Fonte: O autor.



Os resultados obtidos de CMC para os surfactantes C₁₄TAB, C₁₂TAB e C₁₀TAB foram listados nas Tabelas A1, A2 e A3 (Apêndice). Tais resultados mostraram que a CMC se mantém constante na presença ou ausência de PAIM, assim como frente aos diferentes pH em todos sistemas avaliados, sendo consistente com os dados reportados para o C₁₆TAB e C₁₆TAB/PAIM Ref.⁸⁰. A manutenção da CMC é claramente evidenciada na Figura 35, na qual é possível observar que as variações entre os sistemas ocorreram unicamente nas intensidades de condutividade, justificado pelo aumento da [H₃O⁺] em menores pH. Também é possível observar que não se tem variação significativa no ponto de intersecção entre as retas ajustadas, ou seja, na concentração micelar crítica dos sistemas. Portanto, pode-se concluir que o PAIM e suas diferentes espécies iônicas PAIM⁺, PAIM^{+/-} e PAIM⁻ não interferem no processo de micelização dos surfactantes do tipo C_nTAB, no que se refere à concentração mínima de surfactantes necessária para que as micelas sejam formadas em solução. Adicionalmente, diferente dos dados reportados para o C₁₆TAB,⁸⁰ não foi possível determinar concentrações agregacionais críticas (CAC) por medidas de condutividade para os surfactantes C₁₄TAB, C₁₂TAB e C₁₀TAB.

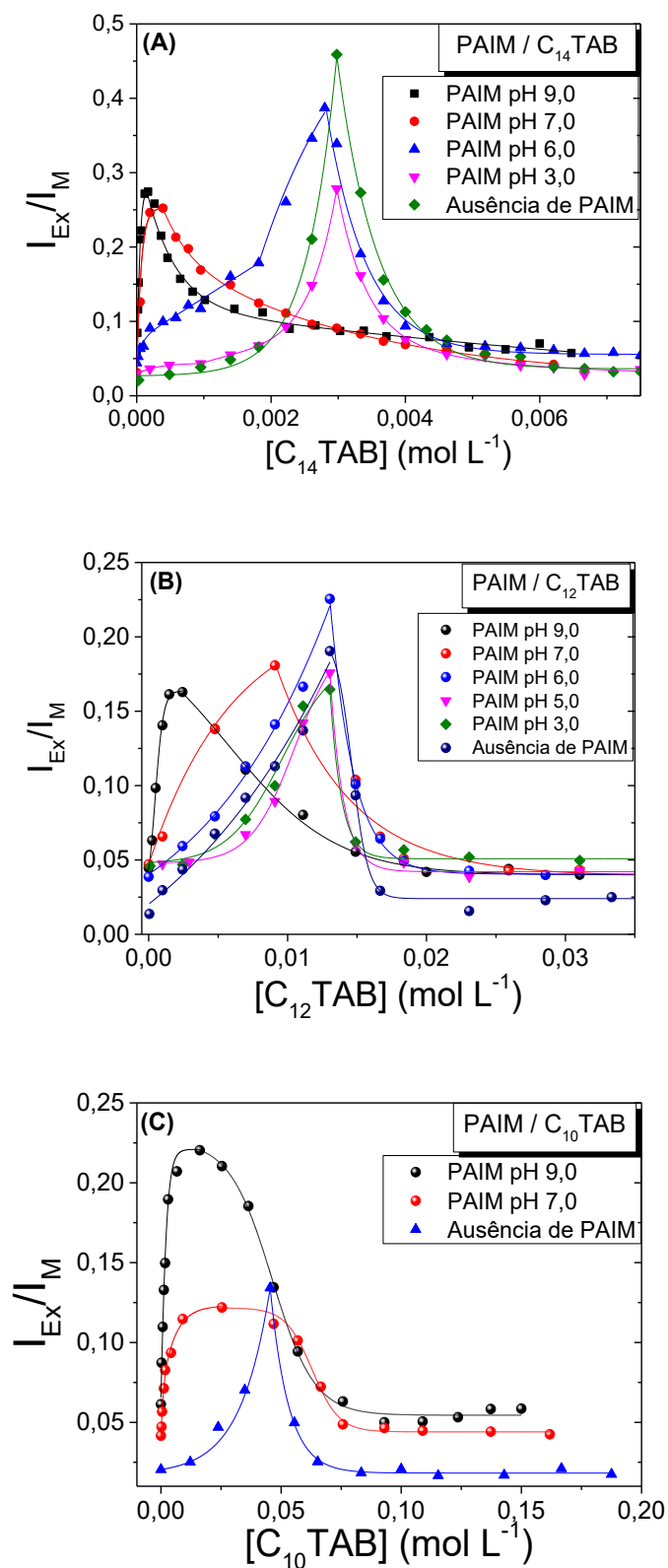
Medidas de fluorescência empregando a sonda Pireno (Py) também permitiram determinar as CMC dos surfactantes C₁₄TAB, C₁₂TAB e C₁₀TAB em água (tampão), apresentando resultados consistentes aos obtidos por condutividade em presença de tampão. Tais resultados foram obtidos através da análise da razão entre a intensidade de fluorescência da banda do excímero (I_{Ex}) e a intensidade da banda de fluorescência do monômero (I_M), ou seja, I_{Ex} / I_M (exemplo de medidas, espectros e bandas na Figura 36).

Figura 36. Espectros de emissão de Fluorescência do Pireno, exemplo das bandas I, III e Excímero (Ex).



Na Figura 37, são apresentados os dados experimentais obtidos da I_{Ex} / I_M de Py para a determinação de concentrações críticas de C_n TAB e complexos PAIM / C_n TAB, na qual (A) PAIM/ C_{14} TAB (B) PAIM/ C_{12} TAB e (C) PAIM/ C_{10} TAB. Os resultados obtidos de CMC e CAC por medidas de fluorescência foram listados nas Tabelas A1, A2 e A3 (Apêndice).

Figura 37. Razão entre a intensidade de fluorescência do excímero (I_{Ex}) e monômero (I_M) da sonda Pireno (Py) nos complexos PAIM/ C_n TAB em diferentes pH e concentrações de C_n TAB. Dados de C_n TAB em água como padrão para comparação. (A) PAIM/ C_{14} TAB (B) PAIM/ C_{12} TAB e (C) PAIM/ C_{10} TAB. Medidas realizadas em $T=25,0\text{ }^\circ\text{C}$; $[PAIM]=2\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ e $[Py]=5,0\times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$. Fonte: O autor.

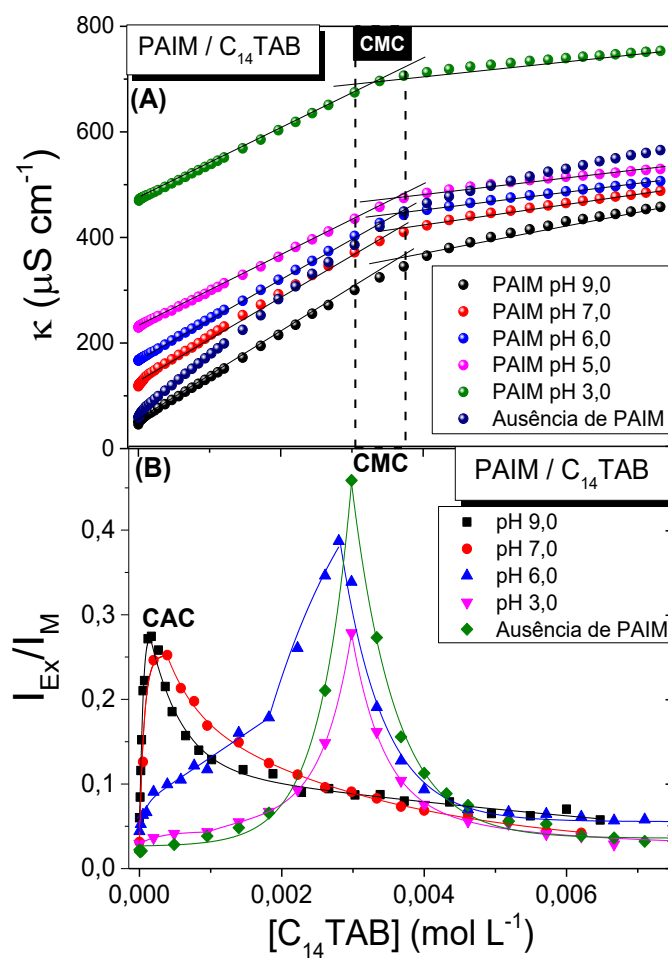


A razão I_{Ex}/I_M em função da concentração de C_n TAB em água, ilustrada pelo C_n TAB na Figura 37, apresenta a formação de picos em concentrações específicas. Tais picos referem-se à concentração na qual se tem a quantidade máxima de excímeros (auto-agregados de moléculas de pireno) nos sistemas avaliados. Sabe-se que a $[Py]$ na qual foram realizadas as medidas, $[Py]=5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, é uma concentração muito abaixo da necessária para formação de excímeros em água. Contudo, com o aumento da concentração de C_n TAB em água, são detectados excímeros de Py por sua banda característica com máximo em 475nm, sendo que esse fenômeno é justificado pela formação dos primeiros microambientes hidrofóbicos que promovem a concentração de moléculas de pireno propiciando a formação de tais excímeros. O contínuo aumento da concentração do surfactante C_{12} TAB possibilita a formação de novas unidades de micelas, e, assim, promovendo a diluição das moléculas de pireno nesses novos agregados coloidais. Esse efeito de formação e dissociação de excímeros é o responsável pela formação dos picos ilustrados na Figura 37, os quais possibilitam a determinação de concentrações críticas.

Para os sistemas aquosos contendo PAIM e C_n TAB (C_{14} TAB, C_{12} TAB e C_{10} TAB), a sonda Py permitiu detectar concentrações críticas abaixo da CMC em pH 9,0, pH 7,0, e para o C_{14} TAB também em pH 6. Tais resultados, em conjunto com a evidência da manutenção da CMC dos C_n TAB na presença de PAIM através das medidas de condutividade, indicam consistentemente que tais concentrações críticas são referentes à formação de microambientes hidrofóbicos pré-micelares baseados em complexos do tipo polímero/surfactante (PAIM/ C_n TAB). As concentrações críticas pré-micelares obtidas são referidas neste trabalho como concentrações agregacionais críticas (CAC) dos complexos PAIM/ C_n TAB. Por outro lado, em pH 5,0 e pH 3,0, as concentrações críticas foram consistentes com os valores de CMC obtidos para C_n TAB (C_{14} TAB, C_{12} TAB e C_{10} TAB) em água, indicando que nesses pH não se tem a formação de complexos polímero/surfactante pré-micelares com cavidades hidrofóbicas. Assim, em resumo, na Figura 38, são apresentadas a sobreposição dos dados de condutividade e de fluorescência I_{Ex}/I_M pela sonda pireno para o sistema PAIM/ C_{14} TAB (como exemplo), ilustrando que os valores de CMC são consistentes entre si nas duas técnicas, com pequena diferença justificada pela maior sensibilidade do pireno e presença de tampão nas medidas de fluorescência. Além disso, é possível notar que em pH 9,0 e 7,0 é observam-se

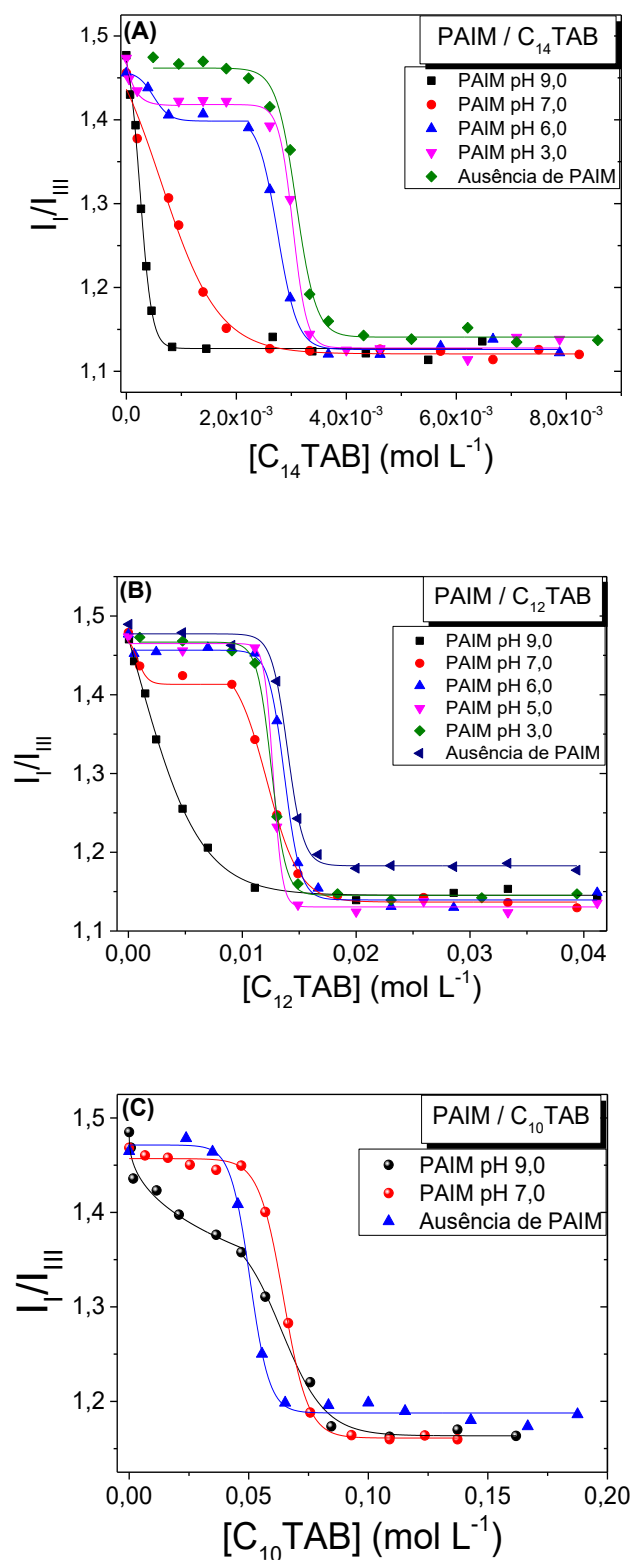
concentrações críticas bem abaixo da CMC, que não podem ser observadas pela técnica de condutividade, assim como discutido anteriormente.

Figura 38. Sobreposição das medidas de condutividade e fluorescência para os complexos PAIM/ C_{14} TAB em função da concentração de surfactante C_{14} TAB (exemplo). Medidas realizadas em 25,0 °C; $[PAIM]=2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $[Py]=5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Fonte: O autor.



Ainda, as medidas de fluorescência empregando a sonda Py também permitiram explorar aspectos de polaridade microlocal de micelas de C_n TAB bem como os complexos PAIM/ C_n TAB. Tais estudos foram realizados através da razão entre a intensidade de emissão da banda vibrônicas I e a intensidade de emissão da banda vibrônicas III (I_I/I_{III}), baseando-se em estudos reportados na literatura.^{80,161} A razão I_I/I_{III} do pireno é adequada para estudos de efeitos de polaridade em sistemas coloidais dessa natureza devido à forte dependência das intensidades das bandas vibrônicas I e III frente a diferentes solventes e/ou microambiente próximo à sonda fluorescente. Uma vez que se sabe que quanto maior a razão I_I/I_{III} maior é a polaridade, do mesmo modo, quanto menor essa razão menor a polaridade. Na Figura 39, são apresentados os dados experimentais da I_I/I_{III} da sonda Pireno (Py) em sistemas aquosos contendo PAIM e C_n TAB em diferentes pH em função da concentração de C_n TAB, na qual (A) PAIM/ C_{14} TAB (B) PAIM/ C_{12} TAB e (C) PAIM/ C_{10} TAB.

Figura 39. Razão entre a intensidade de fluorescência da banda I (I_I) e banda III (I_{III}) da sonda Pireno (Py) nos complexos PAIM/ C_{12} TAB em diferentes pH e concentrações de C_n TAB. Dados de C_n TAB em água como padrão para comparação. (A) PAIM/ C_{14} TAB (B) PAIM/ C_{12} TAB e (C) PAIM/ C_{10} TAB. Medidas realizadas em 25,0 °C, $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ $[Py] = 5,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$. Fonte: O autor.

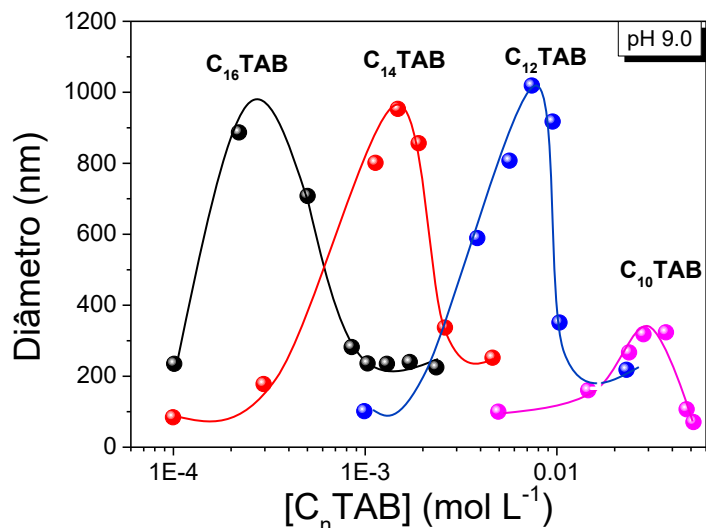


Os dados experimentais apresentados na Figura 39 evidenciam que a polaridade dos sistemas avaliados em condições acima da CMC é independente do pH, enquanto que abaixo da CMC é dependente do pH. Na presença de PAIM em pH 9,0 foi observado que a redução da razão I_I/I_{III} (polaridade) ocorre em concentrações de $C_{12}TAB$ muito menores do que nos demais sistemas. Resultados similares foram obtidos para os surfactantes $C_{14}TAB$ e $C_{10}TAB$, estando de acordo com os resultados reportados na literatura para $C_{16}TAB$.⁸⁰ Assim, tal fenômeno em pH 9,0 em sistemas contendo PAIM e todos os C_nTAB avaliados ($C_{16}TAB$ ⁽⁸⁰⁾, $C_{14}TAB$, $C_{12}TAB$ e $C_{10}TAB$) indica consistentemente a formação de microambientes hidrofóbicos pré-micelares baseados em complexos supramoleculares do tipo $PAIM^-/C_nTA^+$.

Em pH 7,0 e pH 6,0 também foi possível observar considerável redução da razão I_I/I_{III} em concentrações pré-micelares para o sistema contendo PAIM e $C_{14}TAB$. Tais resultados indicam consistentemente a formação de complexos supramoleculares do tipo $PAIM^-/C_{14}TA^+$ e/ou $PAIM^{+/-}/C_{14}TA^+$. Para o sistema contendo PAIM e $C_{12}TAB$, foi possível observar, somente em pH 7,0, modesta redução da razão I_I/I_{III} em concentrações pré-micelares do surfactante (Figura 39) justificada pela menor fração molar da espécie $PAIM^-$, o que indica a formação de complexos $PAIM^-/C_{12}TA^+$ em menor proporção. Finalmente, para o sistema contendo PAIM e $C_{10}TAB$ não foi possível observar redução da razão I_I/I_{III} (polaridade) em concentrações pré-micelares do surfactante além do sistema em pH 9,0, indicando a não formação de complexos $PAIM^{+/-}/C_{10}TA^+$ e a baixa interação entre $PAIM^-$ e $C_{10}TA^+$ (Figura 39). Assim, os resultados mostram que a formação de complexos supramoleculares $PAIM/C_nTAB$ é dependente da cauda hidrofóbica do surfactante. Adicionalmente, os estudos de fluorescência realizados neste trabalho não fornecem subsídios para considerar a formação de complexos supramoleculares $PAIM^+/C_nTA^+$ em pH 3, o que já era esperado devido à repulsão das cargas positivas.

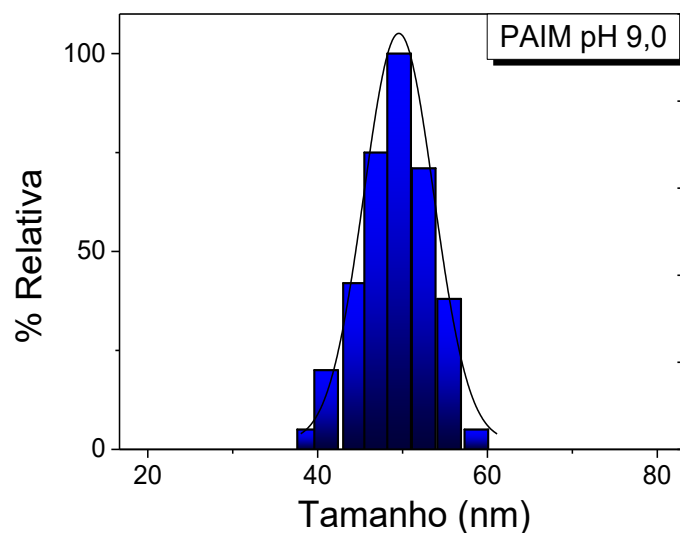
Medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) permitiram estimar os tamanhos dos complexos supramoleculares investigados através da determinação dos diâmetros hidrodinâmicos (D_H). Na Figura 40, são apresentados os dados experimentais dos D_H de complexos supramoleculares $PAIM/C_nTAB$ em função da concentração C_nTAB ($C_{16}TAB$,⁽⁸⁰⁾ $C_{14}TAB$, $C_{12}TAB$ e $C_{10}TAB$).

Figura 40. Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos PAIM/ C_n TAB em diferentes concentrações de C_n TAB. Medidas realizadas em pH 9,0, $T=25,0\text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{PAIM}]=2\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$. Dados do C_{16} TAB obtidos da Ref.⁸⁰. Fonte: O autor.



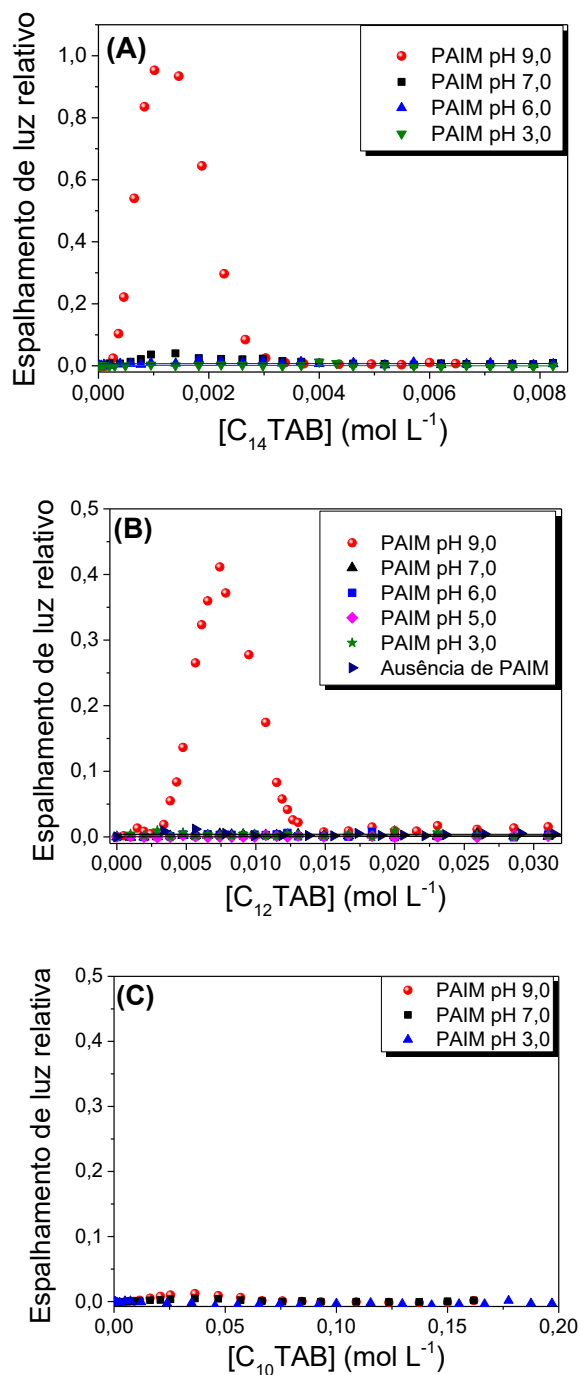
Os dados de D_H evidenciaram consistentemente a formação de complexos supramoleculares PAIM/ C_n TA⁺ em pH 9 devido à formação de agregados relativamente grandes entre 100 e 1100nm. A justificativa se consolida fortemente considerando o fato de que agregados de PAIM em solução formam agregados de 50nm (Figura 41), enquanto que micelas de C_n TAB entre 2-5nm. Além disso, é possível notar que os tamanhos dos complexos apresentaram forte dependência frente à concentração e tamanho da cadeia hidrofóbica do surfactante.

Figura 41. Porcentagem relativa dos agregados de PAIM em função do tamanho (diâmetros hidrodinâmicos). As medidas foram realizadas em 25,0°C, pH 9,0, e $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.
Fonte: O autor.



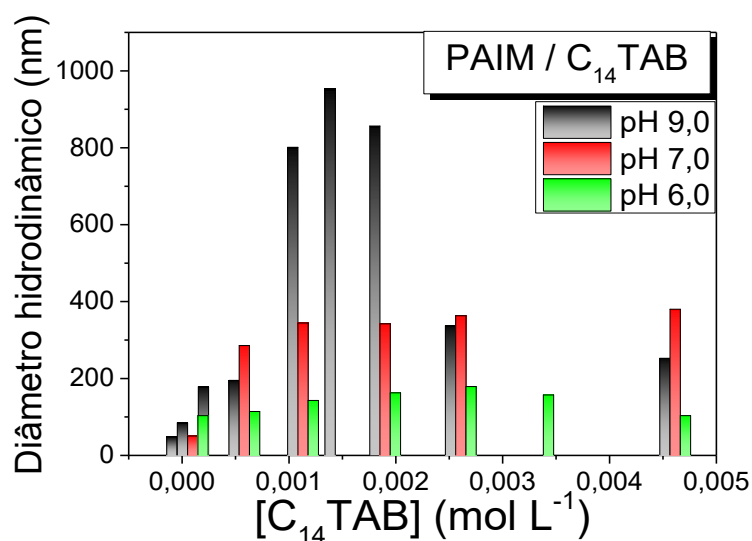
Os D_H de máximo apresentados na Figura 40 foram todos em concentrações pré-micelares (abaixo da CMC) e muito similares para complexos formados com os surfactantes C₁₆TAB,⁽⁸⁰⁾ C₁₄TAB e C₁₂TAB (~ 1000-1100nm), enquanto que para os complexos com C₁₀TAB próximo de 400nm. Os perfis dos dados obtidos por D_H são consistentes com os obtidos por espalhamento de luz relativo UV-Vis (Figura 42).

Figura 42. Espalhamento de luz relativo dos complexos supramoleculares PAIM / C_n TAB em diferentes pH e em função da concentração de C_n TAB. Medidas realizadas em 25,0 °C, $[PAIM]=2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $\lambda=400\text{nm}$. C_n TAB: (A) C_{14} TAB, (B) C_{12} TAB, and (C) C_{10} TAB.



Além disso, os diâmetros hidrodinâmicos dos complexos PAIM/C_nTAB se mostraram altamente dependentes do pH. Na Figura 43, são apresentados como exemplo os D_H dos complexos PAIM/C₁₄TAB em função da concentração de C₁₄TAB em diferentes pH.

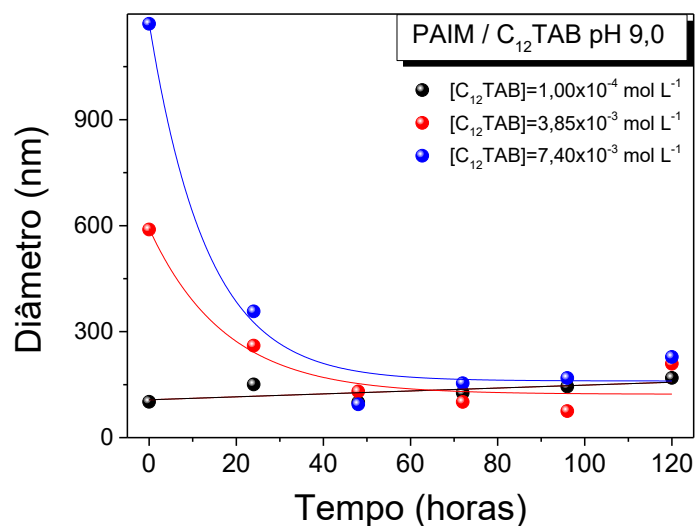
Figura 43. Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos PAIM/C₁₄TAB em diferentes pH e concentrações de C₁₄TAB. Medidas realizadas em T=25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹. Dados de PAIM/C₁₄TAB como exemplo. Fonte: O autor.



Os dados de D_H da Figura 43, por exemplo, mostram claramente que, além da dependência da concentração do surfactante, os complexos PAIM/C_nTAB são altamente dependentes do pH. Em pH 9, são observados os complexos de maior tamanho, seguido pelo pH 7 e pH 6, ou seja, D_H em pH 9 > pH 7 > pH 6. Adicionalmente, demais dados de diâmetros hidrodinâmicos em função da concentração dos outros surfactantes catiônicos investigados nesse trabalho estão foram inseridos no apêndice, Figuras A1, A2 e A3.

Cinéticas monitoradas por diâmetro hidrodinâmico e espalhamento de luz relativo UV-Vis permitiram avaliar a estabilidade dos complexos PAIM/C_nTAB em solução. Na Figura 44, são apresentadas, como exemplo, cinéticas de estabilidade dos complexos PAIM/C₁₂TAB monitorada por diâmetro hidrodinâmico.

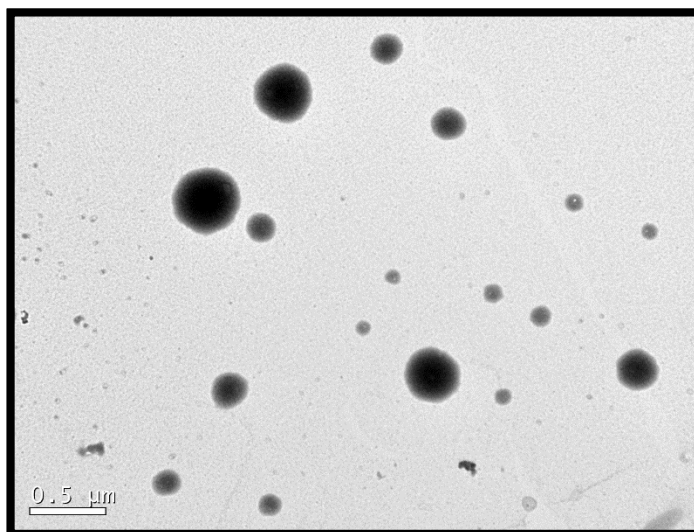
Figura 44. Cinética de estabilidade dos complexos PAIM/ C_{12} TAB monitorada por diâmetro hidrodinâmico. Medidas realizadas em $T=25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $[\text{PAIM}]=2\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$. $[\text{C}_{12}\text{TAB}]=1\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$; $[\text{C}_{12}\text{TAB}]=3,85\times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$; e $[\text{C}_{12}\text{TAB}]=7,4\times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$. Fonte: O autor.



As cinéticas mostraram que os complexos supramoleculares PAIM/ C_n TAB são estruturalmente reorganizados ao longo do tempo, o que promove a redução de seus respectivos diâmetros hidrodinâmicos. Para todos os complexos avaliados, foram obtidos complexos estáveis, ou seja, produtos termodinâmicos com tempo máximo de estabilidade de 72hs. Assim, os estudos posteriores deste trabalho, tal como: potencial zeta e catálise de reações orgânicas, foram realizados empregando os complexos estáveis após as 72 horas. Tais complexos PAIM/ C_n TAB termodinamicamente estáveis apresentaram D_H entre 150-250nm, sendo tais valores dependentes da concentração e tamanho da cadeia hidrofóbica do surfactante.

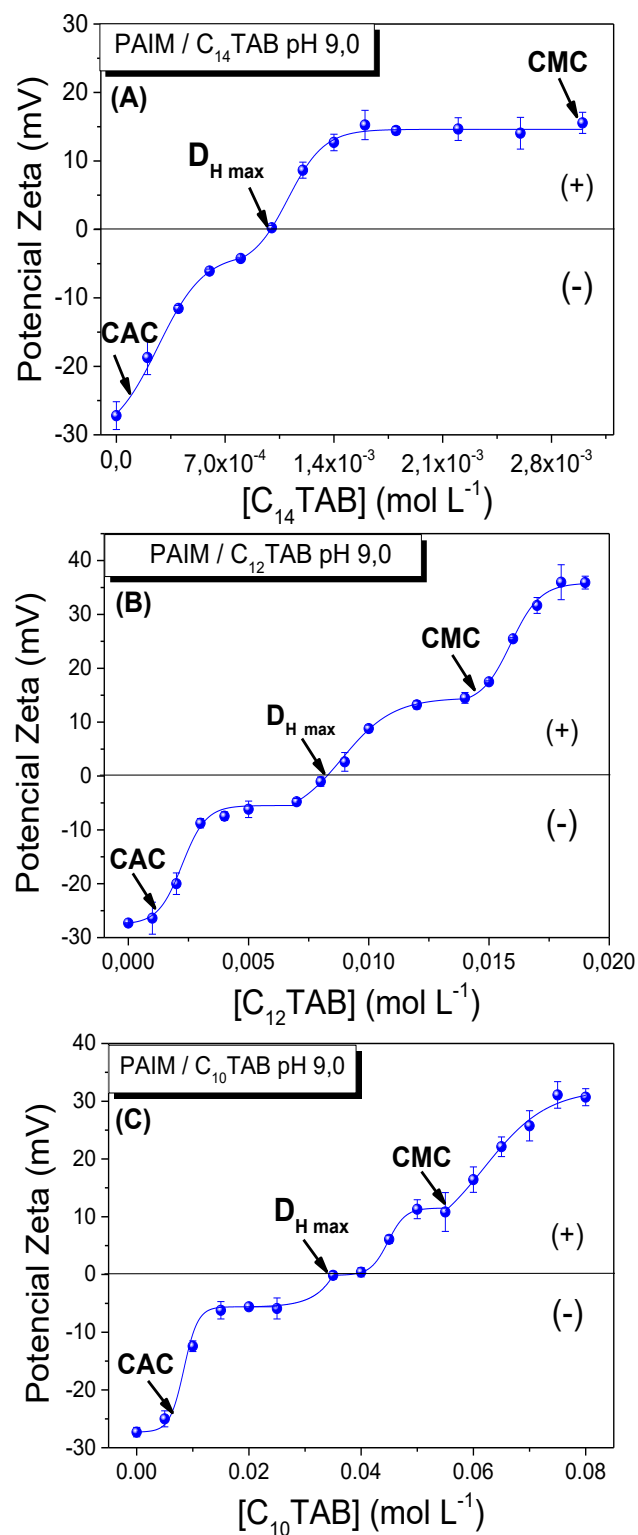
A caracterização morfológica dos complexos supramoleculares ($\text{PAIM}^- / \text{C}_n\text{TA}^+$) foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A Figura 45 mostra um exemplo para o complexo formado com $C_{16}\text{TAB}$ ($7,2\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$) em pH 9,0, mostrando a formação de nanopartículas globulares / esféricas com tamanho médio de 200 nm, de acordo com as medições de DLS nas mesmas condições.

Figura 45. Micrografia dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₆TAB em pH 9,0 por microscopia eletrônica de transmissão. [PAIM]= 2×10^{-4} mol L⁻¹ e [C₁₆TAB]= $7,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.
Fonte: O autor.



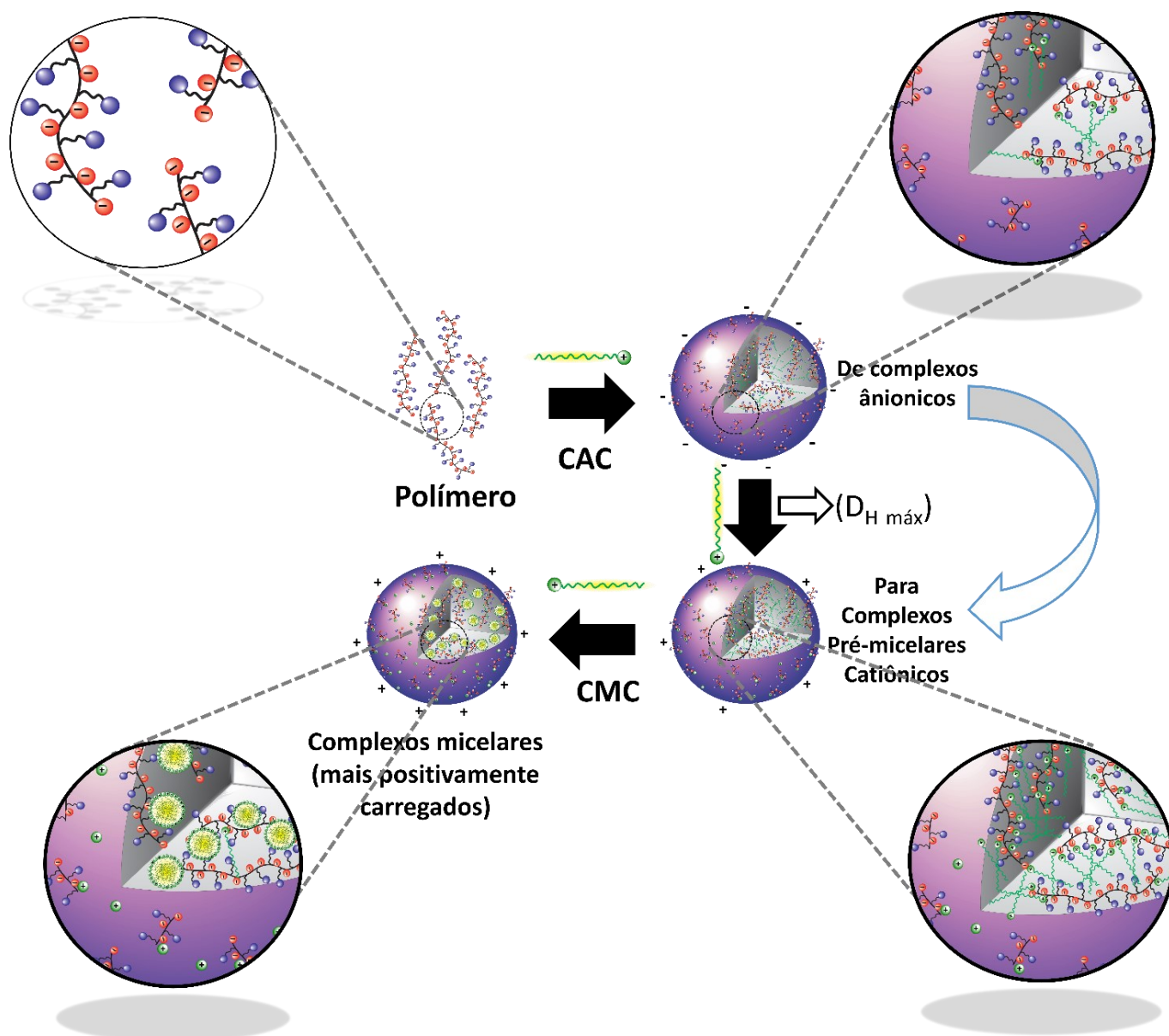
Medidas de potencial zeta (ζ) dos complexos PAIM/C_nTA⁺ em pH 9,0, em função da concentração de C_nTAB (Figura 46), mostram que, inicialmente, o agregado formado por somente PAIM em pH 9,0 (sem C_nTAB) tem um potencial negativo de -27,3mV, consistente com o fato de que nesse pH predomina a espécie aniônica do PAIM (PAIM⁻). À medida que a concentração do surfactante catiônico C_nTAB aumenta, o potencial zeta também aumenta modestamente até CAC (consistente com o CAC obtido por fluorescência) e intensamente após o CAC. Assim, tais dados experimentais indicam que a associação supramolecular ocorre via ligação específica da região carregada positivamente do surfactante (trimetilamônio) com a região carregada negativamente do polímero (carboxilato), devido à atenuação do potencial negativo do PAIM⁻ com o aumento da concentração do surfactante em condições não micelares (evidenciado na Figura 46).

Figura 46. Potencial zeta dos complexos PAIM/ C_n TAB em função da concentração de C_n TAB. (A) PAIM / C_{14} TAB; (B) PAIM / C_{12} TAB; e (C) PAIM / C_{10} TAB. Medidas realizadas em $T=25,0\text{ }^\circ\text{C}$ e $[\text{PAIM}]=2\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$. Fonte: O autor.



A neutralização total do potencial ocorre exatamente na concentração da formação de complexos $\text{PAIM}^- / \text{C}_n\text{TA}^+$ com os diâmetros hidrodinâmicos máximos ($D_{H\text{-máx}}$). Esses complexos neutros com $D_{H\text{-máx}}$ de $\text{PAIM}^- / \text{C}_n\text{TA}^+$ foram encontrados em: (A) $[\text{C}_{14}\text{TAB}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (B) $[\text{C}_{12}\text{TAB}] = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; e (C) $[\text{C}_{10}\text{TAB}] = 3,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Após a passagem pelo diâmetro hidrodinâmico máximo com potencial zeta neutro, um aumento contínuo da concentração do surfactante promove uma formação de complexos supramoleculares $\text{PAIM}^- / \text{C}_n\text{TA}^+$, atingindo um patamar até a CMC. Na CMC, foram obtidos os seguintes potenciais zeta: (A) $\text{PAIM}^- / \text{C}_{14}\text{TA}^+$: +14,6mV; (B) $\text{PAIM}^- / \text{C}_{12}\text{TA}^+$: +14,3mV; (C) $\text{PAIM}^- / \text{C}_{10}\text{TA}^+$: +11,5mV. Observa-se que o patamar foi atingido antes da CMC, ou seja, antes da formação das micelas. Tais fatos associados ao resultado de manutenção do CMC para o C_nTAB na presença de PAIM , por meio de medidas de condutividade, mostram que os agregados presentes nessas condições antes do CMC representam complexos supramoleculares pré-micelares positivamente carregados. Após a CMC, com aumento da concentração do surfactante, o potencial zeta continua aumentando e muito mais intensamente, conforme mostrado na Figura 46, consistente com a formação de complexos supramoleculares micelares positivamente carregados. O Esquema 5 ilustra e resume a seção de caracterização dos complexos supramoleculares polímero surfactante catiônico.

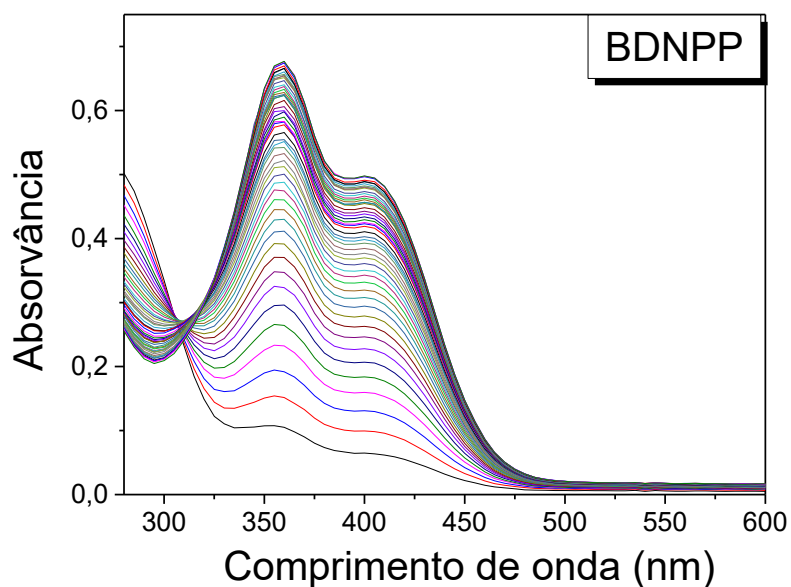
Esquema 5



4.1.2. *Catálise e mecanismo de reações de desfosforilação*

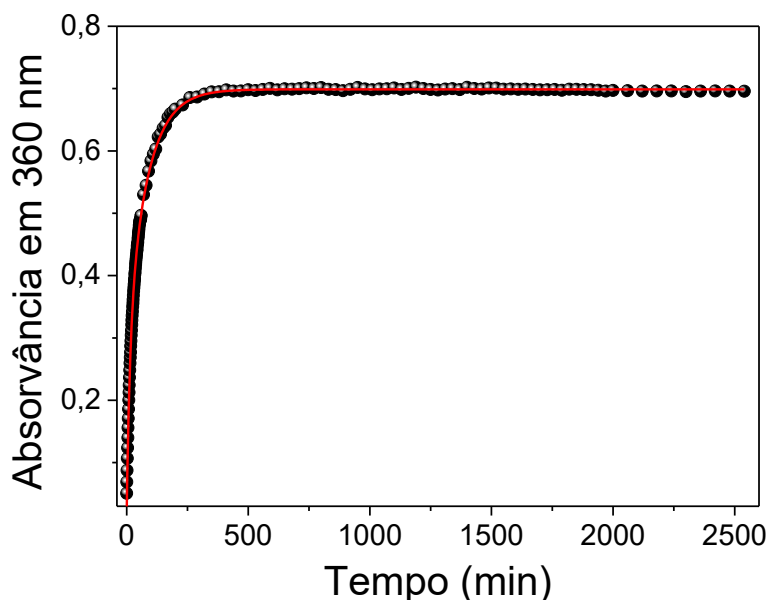
Estudos cinéticos foram realizados com objetivo de investigar o efeito catalítico dos complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB sobre reações de desfosforilação de um diéster de fosfato ativado, bis-2,4-dinitro-fenil fosfato (BDNPP). As reações foram acompanhadas por espectrometria UV-Vis através do surgimento da banda em 360nm referente ao produto 2,4-dinitro-fenolato. Na figura 47, são apresentados os espectros das cinéticas das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB monitoradas por espectrofotometria de absorção UV-Vis (exemplo).

Figura 47. Espectros das cinéticas das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB monitoradas por espectrofotometria de absorção UV-Vis (exemplo).



Na figura 48, é apresentado um exemplo de cinética e ajuste para as reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB.

Figura 48. Um exemplo de cinética e ajuste para as reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB.



Os ajustes das cinéticas de desfosforilação foram realizados através da equação cinética para uma reação com duas etapas consecutivas (Eq. 5) encontrada na literatura.¹⁷¹ As análises foram baseadas na primeira constante de velocidade observada na desfosforilação do BDNPP.

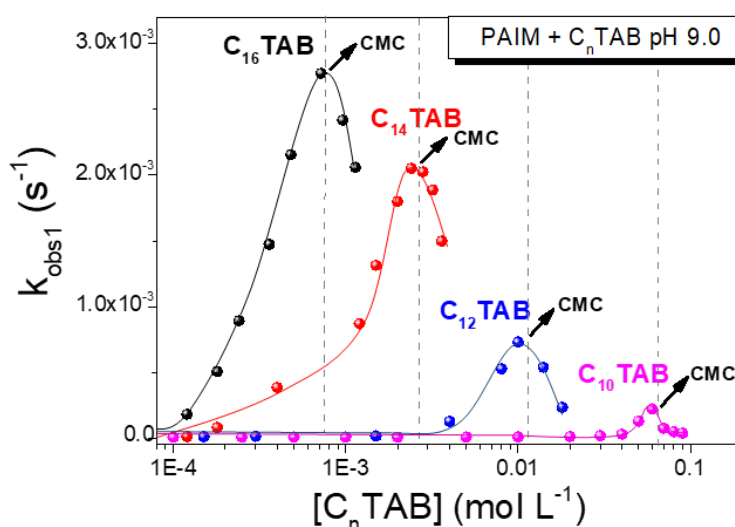
$$[A_P] = [A_P]_i + [A_B]_0 \left[1 + \frac{(k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t})}{(k_1 - k_2)} \right] + [A_B]_0 (1 - e^{-k_1 t}) \quad \text{Eq. 5.}$$

na qual, $[A_P]$ é a absorvância do fenolato (2 equivalentes), $[A_P]_i$ é a absorvância do fenolato no tempo inicial, $[A_B]_0$ é a absorvância do BDNPP no tempo inicial, k_1 e k_2 são as constantes de velocidade observadas na primeira e segunda etapa da reação, respectivamente.

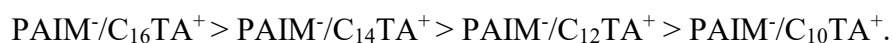
Foram obtidas constantes de velocidade observadas (k_{obs}) para tais reações na presença de PAIM em função da concentração dos surfactantes C₁₂TAB nos pH 9,0; 7,0; e 3,0. Tais resultados mostraram que em pH 9,0 foram obtidos os melhores efeitos catalíticos para os sistemas contendo PAIM e todos os C₁₂TAB, sendo consistente com os

dados reportados para PAIM/ C_{16} TAB na reação de desfosforilação do triéster de fosfato DEDNPP.⁸⁰ Assim, na Figura 49 são apresentados os dados experimentais de k_{obs} das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM⁻/ C_n TA⁺ em função da concentração de C_n TAB nas melhores condições de pH (pH 9,0).

Figura 49. Constantes de velocidade observadas das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM⁻/ C_n TA⁺ em função da concentração de C_n TAB. Reações realizadas em pH=9,0; T=25,0 °C e [PAIM]= 2×10^{-4} mol L⁻¹. Fonte: O autor.



Os dados experimentais mostraram que as eficiências catalíticas dos complexos supramoleculares PAIM/ C_n TAB seguem tendência:



Tal tendência mostra claramente que com o aumento da cadeia hidrofóbica do surfactante nos complexos PAIM⁻/ C_n TA⁺ se aumenta intensamente a velocidade da reação catalisada. Assim, os resultados evidenciam consistentemente que os efeitos hidrofóbicos são centrais na catálise de reações dessa natureza, permitindo a formação de cavidades hidrofóbicas que possibilitam a aproximação / maior tempo de proximidade entre os grupos catalíticos e o substrato. Os resultados também indicam que as cavidades

hidrofóbicas dos complexos $\text{PAIM}^-/\text{C}_n\text{TA}^+$ são moduladas pelo tamanho da cadeia hidrofóbica do surfactante, assim, permitindo o design racional de enzimas artificiais com propriedades almejadas.

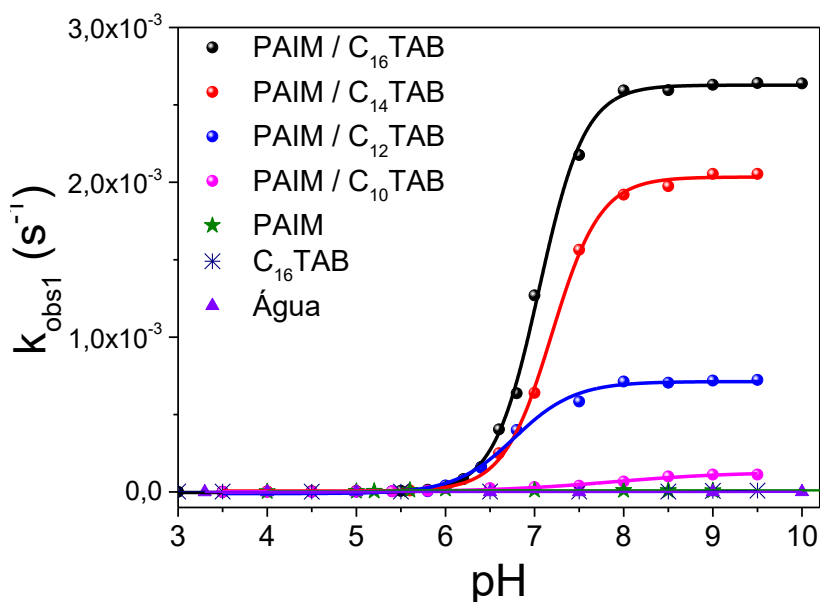
É possível notar que as reações catalisadas pelos complexos $\text{PAIM}^-/\text{C}_n\text{TA}^+$ passam por uma concentração de C_nTAB de máxima eficiência catalítica (C_{maxeff}), sendo tais concentrações as seguintes: $[\text{C}_{16}\text{TAB}] = 7,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{C}_{14}\text{TAB}] = 2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{C}_{12}\text{TAB}] = 1,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{C}_{10}\text{TAB}] = 5,6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, todas as C_{maxeff} dos complexos $\text{PAIM}^-/\text{C}_n\text{TA}^+$ são consistentes com os valores CMC obtidos por fluorescência (Figura 49). Assim, os resultados mostram que os complexos supramoleculares mais eficientes para essa reação são do tipo pré-micelares, uma vez que após a CMC se tem um decréscimo das constantes de velocidades das reações catalisadas.

O perfil passando por uma C_{maxeff} da Figura 49 sugere forte ligação entre o substrato BDNPP e os complexos $\text{PAIM}^-/\text{C}_n\text{TA}^+$ pré-micelares, justificado pela carga negativa do substrato, potencial zeta positivo dos complexos supramoleculares pré-micelares associados aos efeitos hidrofóbicos (cooperatividade entre as interações eletrostáticas e forças de van der Waals).

Os resultados apresentados na Figura 49 se diferem consideravelmente dos reportados na catálise de desfosforilação do triéster DEDNPP por $\text{PAIM}^-/\text{C}_{16}\text{TA}^+$.⁸⁰ Apesar dos complexos formados abaixo da CMC também apresentarem excelentes efeitos catalíticos para o triéster DEDNPP, estes não foram os complexos de maior eficiência catalítica. Além disso, a catálise de máxima eficiência não passa por uma C_{maxeff} , mas sim por um patamar de máxima eficiência acima da CMC, ou seja, os melhores catalisadores para tal reação são complexos $\text{PAIM}^-/\text{C}_{16}\text{TA}^+$ contendo micelas de C_{16}TAB .⁸⁰

Para detalhar ainda mais o estudo cinético e descrever mecanisticamente as reações de desfosforilação do BDNPP catalisadas por complexos $\text{PAIM}^-/\text{C}_n\text{TAB}$, foram obtidos os perfis de pH das reações nas condições otimizadas de catálise descritas previamente pelas C_{maxeff} , avaliando as constantes de velocidade observadas das reações em função do pH nos sistemas investigados. Nesse sentido, são apresentados na Figura 50 perfis de pH das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por $\text{PAIM}^-/\text{C}_n\text{TAB}$ nas concentrações de máxima eficiência catalítica de C_nTAB (C_{maxeff}).

Figura 50. Perfis de pH das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por PAIM/ C_n TAB nas concentrações ótimas de C_n TAB. Reações realizadas $T=25,0$ °C e $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} . $[C_{16}TAB]=7,2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} ; $[C_{14}TAB]=2,2 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} ; $[C_{12}TAB]=1,1 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} ; $[C_{10}TAB]=5,6 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} . Dados em água retirados da Ref.¹⁷². Fonte: O autor.



Os perfis de pH mostram que os incrementos catalíticos mais significativos foram entre pH 6,2 – 7,5, sendo consistente com o aumento da fração das espécies de $PAIM^-$ devido à desprotonação do imidazol (pK_a 6,7)⁸⁰. É possível notar que o patamar de máxima eficiência catalítica em função do pH é alcançado plenamente para todos os sistemas em $pH > 8$. Tal resultado sugere que o imidazol atua como grupo catalítico de maior eficiência nos complexos supramoleculares. Além disso, a desprotonação do imidazol propicia a perda da carga positiva do polímero, o que favorece ainda mais a interação entre o surfactante catiônico e o polímero aniônico na formação dos complexos supramoleculares.

Os dados de k_{obs} em função do pH (Figura 50) mostraram que a eficiência catalítica dos sistemas avaliados apresenta a seguinte tendência: $PAIM/C_{16}TAB > PAIM/C_{14}TAB > PAIM/C_{12}TAB > PAIM/C_{10}TAB > PAIM > C_{16}TAB > \text{Água}$, sendo consistente com os dados e tendência da Figura 49 referentes a $PAIM^-/C_nTA^+$ em pH 9,0. É possível notar que a eficiência catalítica é diretamente relacionada com o tamanho da cadeia hidrofóbica do surfactante. É importante ainda destacar a enorme diferença entre a catálise promovida pelo polímero PAIM e pelos complexos $PAIM^-/C_nTA^+$ ($pH > 8$),

especialmente em relação ao complexo PAIM⁻/C₁₆TA⁺. Tal resultado e tendência mostram a importância da formação dos domínios hidrofóbicos e aproximação dos grupos catalíticos com os substratos no design racional de enzimas artificiais.

Além disso, tais resultados podem ser empregados como um modelo compreensível dos efeitos que cooperaram para catálise enzimática, e, através de uma correlação, permitindo ilustrar o papel de resíduos de aminoácidos apolares e suas cavidades hidrofóbicas nessa importante abordagem catalítica. A consistência de tal modelo se baseia no fato de que o polímero PAIM contém a mesma quantidade de grupos efetivamente catalíticos (carboxilato e imidazol) do que o complexo PAIM/C_nTAB. Contudo, com o aumento da cadeia hidrofóbica do surfactante no complexo, tem-se um progressivo incremento da velocidade da reação catalisada. Assim, mostrando de modo compreensível e em detalhe o efeito de cavidades hidrofóbicas na potencialização da catálise promovida por grupos catalíticos similares aos contidos no sítio ativo de enzimas (imidazol e carboxilato).

Com objetivo de aprofundar a análise da eficiência catalítica dos complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB, foram obtidas constantes de velocidades de segunda ordem das reações catalisadas a partir de tratamento matemático com os dados experimentais da Figura 50. Os tratamentos matemáticos dos dados cinéticos foram baseados na relação das constantes de velocidade referente aos caminhos reacionais que compõem o k_{obs} (descrito matematicamente abaixo).

$$k_{obs} = k_0 + k_{OH}[OH^-] + (k_{w,PAIM^{+/-}} \cdot \chi_{w,PAIM^{+/-}} + k_{w,PAIM^-} \cdot \chi_{w,PAIM^-} + k_{S,(PAIM^{+/-})/C_nTA^+} \cdot \chi_{S,(PAIM^{+/-})/C_nTA^+} + k_{S,(PAIM^-)/C_nTA^+} \cdot \chi_{S,(PAIM^-)/C_nTA^+}) [PAIM] \quad \text{Eq. 6}$$

na qual, (i) k_0 : constante de velocidade de hidrólise espontânea; (ii) k_{OH} : constante de velocidade de catálise básica específica; (iii) $k_{w,PAIM^{+/-}}$: constante de velocidade de catálise pelo polímero na forma PAIM^{+/-}; (iv) $k_{w,PAIM^-}$: constante de velocidade de catálise pelo polímero na forma PAIM⁻; (v) $k_{S,(PAIM^{+/-})/C_nTA^+}$: constante de velocidade de catálise pelo complexo supramolecular PAIM^{+/-}/C_nTA⁺; (vi) $k_{S,(PAIM^-)/C_nTA^+}$: constante de velocidade de catálise pelo complexo supramolecular PAIM⁻/C_nTA⁺; (vii) $\chi_{w,PAIM^{+/-}}$: fração molar do polímero na forma PAIM^{+/-}; (viii) $\chi_{w,PAIM^-}$: fração molar do polímero na forma PAIM⁻;

(ix) $\chi_{S,(PAIM^{+/-})/C_nTA^+}$: fração molar do complexo supramolecular $PAIM^{+/-}/C_nTA^+$; e (x) $\chi_{S,PAIM^-/C_nTA^+}$: fração molar do complexo supramolecular $PAIM^-/C_nTA^+$.

$$\chi_{w,PAIM^+} = \frac{[H_3 O^+]^2}{[H_3 O^+]^2 + K_{a1}[H_3 O^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad \text{Eq. 7}$$

$$\chi_{w,PAIM^{+/-}} = \frac{K_{a1}[H_3 O^+]}{[H_3 O^+]^2 + K_{a1}[H_3 O^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad \text{Eq. 8}$$

$$\chi_{w,PAIM^-} = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H_3 O^+]^2 + K_{a1}[H_3 O^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad \text{Eq. 9}$$

$$\chi_{w,PAIM(T)} = \chi_{w,PAIM^+} + \chi_{w,PAIM^{+/-}} + \chi_{w,PAIM^-} = 1 \quad \text{Eq. 10}$$

$$\chi_{S,PAIM^+} = \frac{[H_3 O^+]^2}{[H_3 O^+]^2 + K_{a1}[H_3 O^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad \text{Eq. 11}$$

$$\chi_{S,PAIM^{+/-}} = \frac{K_{a1}[H_3 O^+]}{[H_3 O^+]^2 + K_{a1}[H_3 O^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad \text{Eq. 12}$$

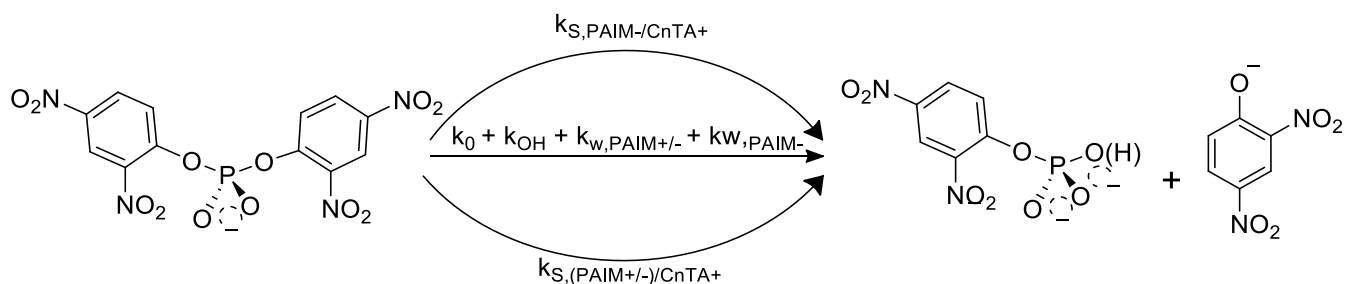
$$\chi_{S,PAIM^-} = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H_3 O^+]^2 + K_{a1}[H_3 O^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad \text{Eq. 13}$$

$$\chi_{S,PAIM(T)} = \chi_{S,PAIM^+} + \chi_{S,PAIM^{+/-}} + \chi_{S,PAIM^-} = 1 \quad \text{Eq. 14}$$

na qual, $\chi_{w,PAIM^{+/-}}$: fração molar do polímero na forma $PAIM^{+/-}$; $\chi_{w,PAIM^-}$: fração molar do polímero na forma $PAIM^-$; $\chi_{S,(PAIM^{+/-})/C_nTA^+}$: fração molar do complexo supramolecular $PAIM^{+/-}/C_nTA^+$; e $\chi_{S,PAIM^-/C_nTA^+}$: fração molar do complexo supramolecular $PAIM^-/C_nTA^+$. K_{a1} = equilíbrio ácido-base entre as espécies $PAIM^+$ e $PAIM^{+/-}$; K_{a2} = equilíbrio ácido base entre as espécies $PAIM^{+/-}$ e $PAIM^-$; $[H_3O^+]$ = concentração molar do íon hidrônio; $\chi_{w,PAIM(T)}$ = fração molar total das espécies de PAIM em meio aquoso. $\chi_{S,PAIM(T)}$ = fração molar total das espécies de PAIM / C_nTAB supramolecular.

Na Figura 51, são apresentados os caminhos reacionais através das constantes de velocidade de segunda ordem que descrevem a reação de desfosforilação do BDNPP catalisada pelos complexos supramoleculares PAIM/ C_nTAB .

Figura 51. Caminhos reacionais e cinéticos para reação de desfosforilação do BDNPP catalisada por complexos supramoleculares PAIM/C_nTAB. Fonte: O autor.



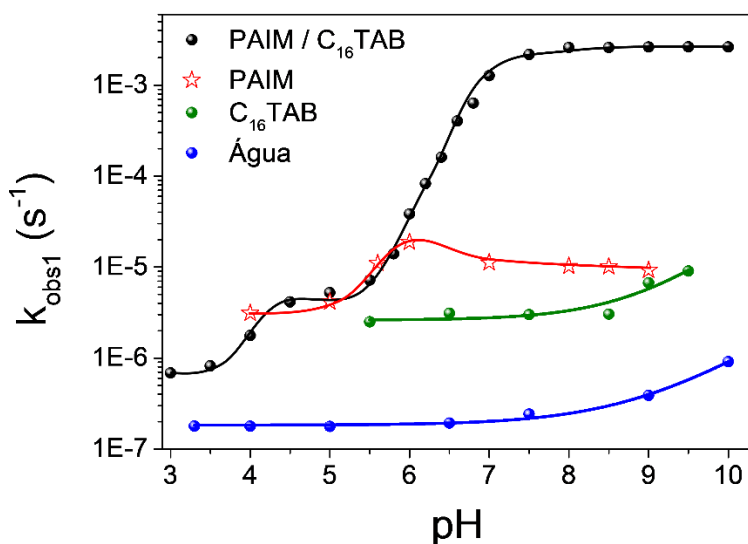
As constantes de velocidade de segunda ordem obtidas e os resultados de eficiência catalítica expressa pela razão k_{cat}/k_{uncat} são apresentados na Tabela 2 (na qual, (i) k_{cat} : constante de velocidade de segunda ordem da reação catalisada e (ii) k_{uncat} : é a constante de hidrólise espontânea da reação não catalisada). Além disso, a Tabela 2 apresenta os dados de efeito isotópico cinético obtidos para as reações catalisadas por PAIM/C_nTAB.

Tabela 2. Constantes de velocidade da reação de desfosforilação do BDNPP em água, PAIM e nos complexos PAIM/C_nTAB. Fonte: O autor.

Catalisador	Constante de velocidade de segunda ordem		k _{cat} /k _{unecat}	k _D / k _H
PAIM ⁻ /C ₁₆ TA ⁺	k _{S,PAIM-/C16TA+} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	13,2	6,0x10 ⁹	1,0
PAIM ⁻ /C ₁₄ TA ⁺	k _{S,PAIM-/C14TA+} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	10,3	4,7 x10 ⁹	1,0
PAIM ⁻ /C ₁₂ TA ⁺	k _{S,PAIM-/C12TA+} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	3,62	1,6x10 ⁹	1,1
PAIM ⁻ /C ₁₀ TA ⁺	k _{S,PAIM-/C10TA+} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	0,56	2,5x10 ⁸	2,0
PAIM ⁻	k _{w,PAIM-} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	0,03	1,4x10 ⁷	1,7
PAIM ^{+/-} /C ₁₆ TA ⁺	k _{S,(PAIM+/-)/C16TA+} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	0,028	1,2x10 ⁷	2,0
PAIM ^{+/-} /C ₁₄ TA ⁺	k _{S,(PAIM+/-)/C14TA+} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	0,028	1,2x10 ⁷	2,0
PAIM ^{+/-} /C ₁₂ TA ⁺	k _{S,(PAIM+/-)/C12TA+} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	7,9x10 ⁻³	3,5x10 ⁶	2,1
PAIM ^{+/-} /C ₁₀ TA ⁺	k _{S,(PAIM+/-)/C10TA+} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	4,2x10 ⁻³	1,9x10 ⁶	2,1
PAIM ^{+/-}	k _{w,PAIM+/-} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	0,022	1,0x10 ⁷	1,8
H ₂ O	k ₀ (s ⁻¹)	1,2x10 ⁻⁷	-	-
	k _{H2O} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	2,2x10 ⁻⁹	-	-
OH ⁻	k _{OH} (L mol ⁻¹ s ⁻¹) ¹⁷³	2,9x10 ⁻³	-	-

Os complexos supramoleculares mostraram desempenho catalítico excepcional: com a razão k_{cat} / k_{unecat} aumentando com a taxa da reação catalisada PAIM⁻/C_nTA⁺ de até 6,6x10⁹ vezes e PAIM^{+/-}/C_nTA⁺ até 1,2x10⁷ em relação à reação de desfosforilação em água. Em ambos os casos, os efeitos catalíticos máximos referem-se aos complexos formados pelo surfactante catiônico com a maior cadeia hidrofóbica (C₁₆TAB). O complexo PAIM^{+/-}/C₁₆TA⁺ possui apenas o grupo carboxilato como um possível grupo catalítico e pode atuar por meio de um mecanismo de base geral ou nucleofílico. Embora o complexo PAIM⁻/C₁₆TA⁺ tenha o imidazol como principal grupo catalítico, também pode atuar através de um mecanismo de base geral ou nucleofílico. Os dados de k_{obs} foram plotados em escala logarítmica em função do pH para permitir a apresentação dos dois patamares de catálise por PAIM/C₁₆TAB como exemplo (Figura 52).

Figura 52 – Perfil de pH das reações de desfosforilação do BDNPP catalisada por PAIM/ C_{16} TAB nas concentrações ótimas de C_{16} TAB (k_{obs} em escala logarítmica). Reações realizadas em 25,0 °C; $[PAIM]=2 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ e $[C_{16}TAB]=7,2 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$. Dados em água retirados da Ref.¹⁷² Fonte: O autor.



O primeiro patamar em pH 5 se refere ao mecanismo de catálise promovido pelo complexo $PAIM^{+/-}/C_{16}TA^{+}$, enquanto que o segundo patamar em pH > 8 se refere ao mecanismo de catálise promovido pelo complexo $PAIM^{-}/C_{16}TA^{+}$, de acordo com os dados de equilíbrio ácido-base e as frações das espécies iônicas de PAIM reportados na literatura.⁸⁰ Os complexo $PAIM^{+/-}/C_nTA^{+}$ possui somente o grupo carboxilato como possível catalizador básico-geral ou nucleofílico, enquanto que o complexo $PAIM^{-}/C_nTA^{+}$ possui o imidazol como principal grupo catalisador básico-geral ou nucleofílico. Em resumo, o mecanismo catalítico do patamar em pH 5 se refere principalmente à catálise por grupos carboxilatos e em pH > 8 se refere à catálise por grupos imidazóis.

Os mecanismos de catálise básica-geral e nucleofílica são as principais possibilidades mecanísticas para a catálise por complexos PAIM/ C_n TAB promovidas por grupos carboxilatos e imidazóis. Além disso, devido à presença de grupos imidazóis nos complexos $PAIM^{+/-}/C_nTAB$ também existem as possibilidades de ainda mais dois mecanismos bifuncionais: catálise básica-geral + ácido-geral; e catálise nucleofílica + ácido-geral. Finalmente, todas as possibilidades mecanísticas são apresentadas na Figura 53 (para grupos carboxilatos) e na Figura 54 (para grupos imidazóis).

Figura 53. Possíveis mecanismos da reação de desfosforilação do BDNPP catalisada por grupos carboxilatos (e/ou imidazólios) do complexo PAIM^{+/·}/C_nTA⁺ em pH 5. Caminho A: Catálise básica-geral; Caminho B: Catálise Nucleofílica. Fonte: O autor.

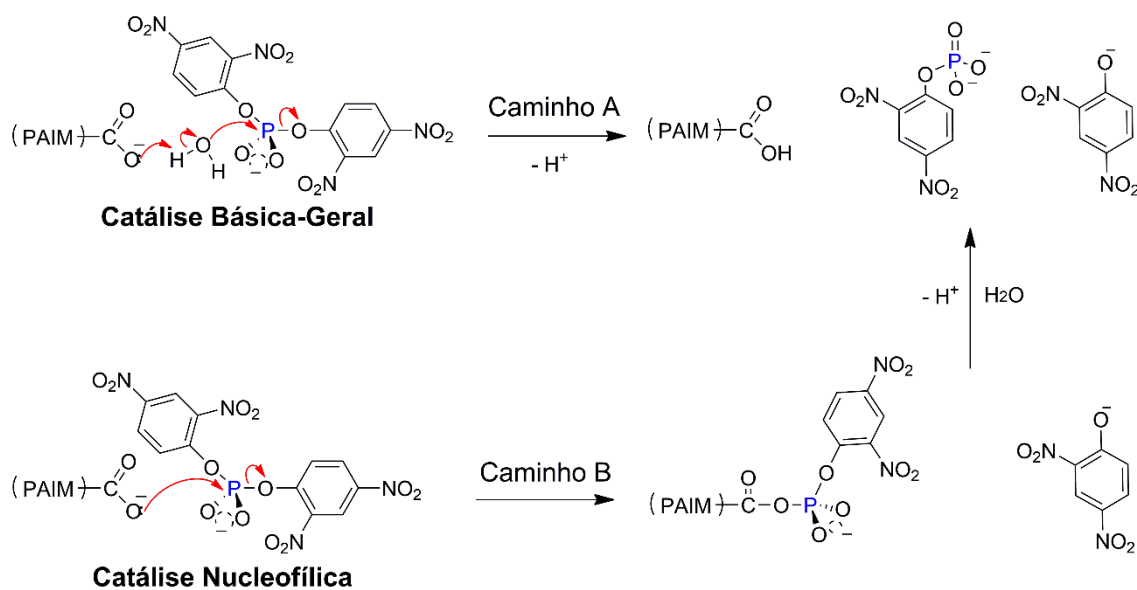
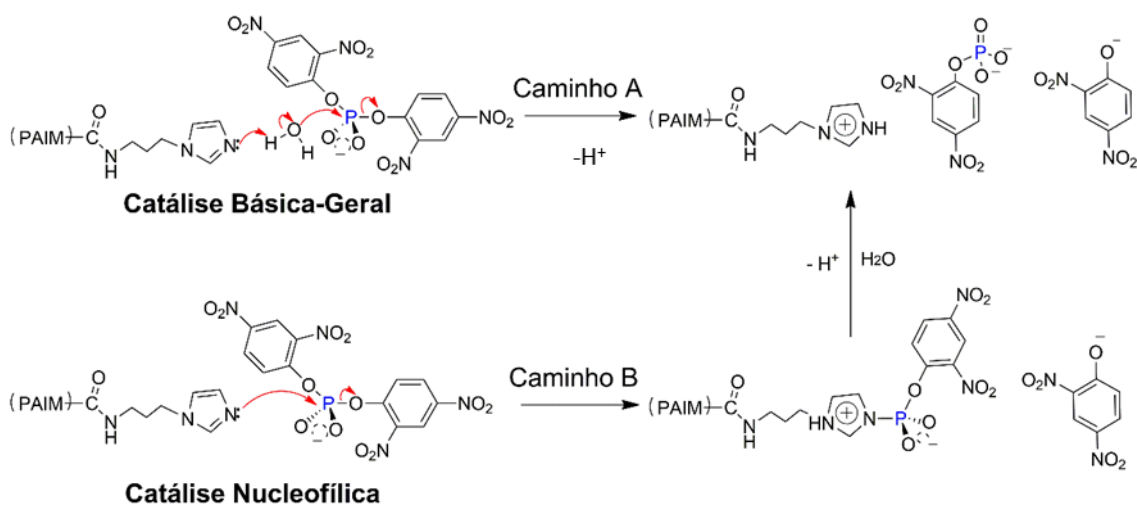
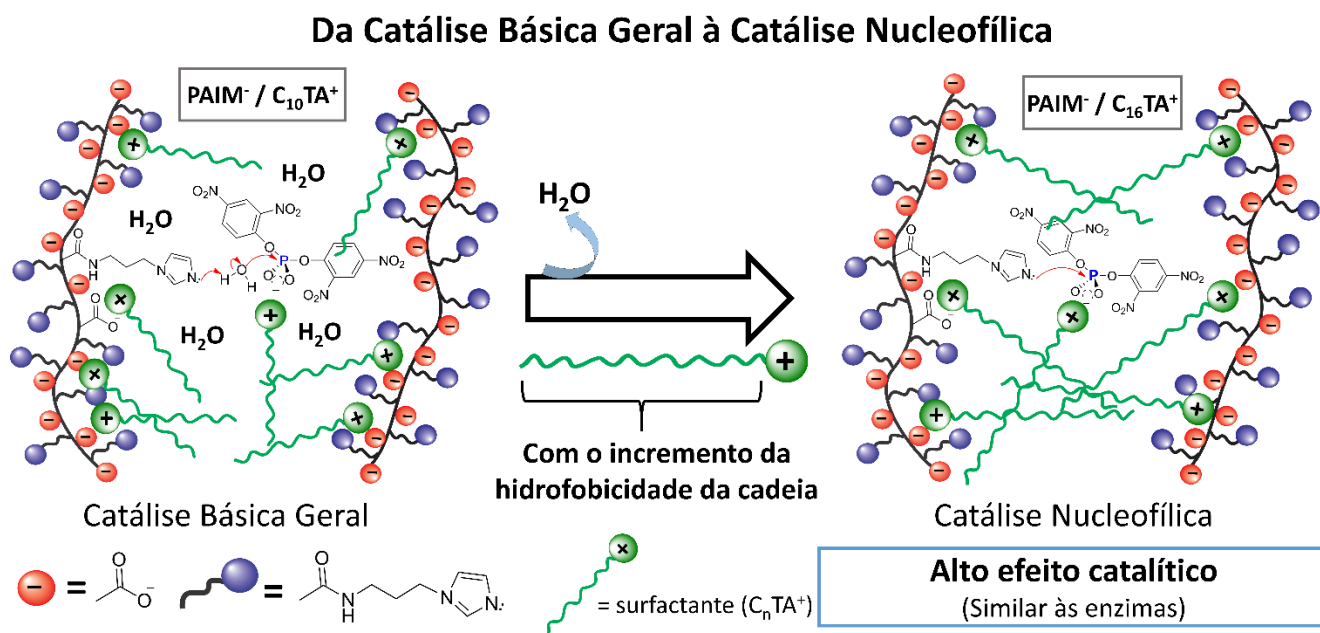


Figura 54. Possíveis mecanismos da reação de desfosforilação do BDNPP catalisada por grupos imidazóis do complexo PAIM/C_nTA⁺ em pH > 8. Caminho A: Catálise Básica-geral; Caminho B: Catálise Nucleofílica. Fonte: O autor.



Os resultados de efeitos isotópicos cinéticos (KIE), listados na Tabela 2, permitiu definir os mecanismos catalíticos que envolvem os complexos $\text{PAIM}^{+/-} / \text{C}_n\text{TA}^+$ e $\text{PAIM}^- / \text{C}_n\text{TA}^+$. No patamar em pH 5, referente à catálise por grupos carboxilato ($\text{PAIM}^{+/-} / \text{C}_n\text{TA}^+$), os valores de k_D / k_H obtidos para os complexos foram todos próximos de 2, o que indica fortemente a transferência de um próton na etapa de determinação da taxa da reação, conforme estabelecido na literatura⁴² e sendo consistente com o mecanismo geral de catálise da base. Para $\text{PAIM}^{+/-}$ nesse mesmo pH, foi obtido $k_D / k_H = 1,8$, o que também indica um mecanismo de catálise geral de base predominante. No patamar em pH > 8, para catálise por grupos imidazol ($\text{PAIM}^- / \text{C}_n\text{TA}^+$), foram obtidos valores efeito isotópicos cinéticos de k_D / k_H muito próximos a 1,0 para o complexo $\text{PAIM}^- / \text{C}_{16}\text{TA}^+$, $\text{PAIM}^- / \text{C}_{14}\text{TA}^+$ e $\text{PAIM}^- / \text{C}_{12}\text{TA}^+$, indicando que não há transferência de prótons na etapa de determinação da reação, sendo consistente com o mecanismo de catálise nucleofílica promovido pelo grupo imidazol para esses complexos. Por outro lado, para o complexo $\text{PAIM}^- / \text{C}_{10}\text{TA}^+$ foi obtido o $k_D / k_H = 2,0$, sendo consistente com um mecanismo catálise básica geral. Para PAIM^- nesse mesmo pH, obtivemos $k_D / k_H = 1,7$, o que também indica um mecanismo de catálise básica geral predominante, como descrito para o complexo $\text{PAIM}^- / \text{C}_{10}\text{TA}^+$. A Figura 55 sumariza os estudos mecanísticos, ilustrando: o mecanismo estabelecido para a catálise pelos complexos $\text{PAIM}^- / \text{C}_n\text{TA}^+$ e a alteração mecanística induzida pela cadeia alquil do surfactante.

Figura 55. Complexos supramoleculares PAIM/ C_n TAB como catalisadores na reação de desfosforilação do bis-2,4-dinitro-fenil fosfato (BDNPP). Fonte: O autor.



Os resultados reportados nesta tese mostram claramente a relevância dos efeitos hidrofóbicos na reatividade e nos mecanismos das reações catalisadas por complexos supramoleculares bioinspirados. Os mecanismos de catálise foram completamente alterados em função da cadeia alquílica do surfactante no complexo, partindo de um mecanismo geral de catálise básica em sistemas mais hidratados para um mecanismo de catálise nucleofílica em sistemas com domínios mais hidrofóbicos. Essa alteração mecanística é descrita por meio do efeito específico do aumento do tamanho da cadeia hidrofóbica do surfactante no complexo catalítico. Tal abordagem identifica esse efeito devido ao incremento da significância da hidrofobicidade no sítio ativo catalítico. Os notáveis resultados apresentados fornecem suporte e validade de um modelo que descreve de maneira compreensível um dos fenômenos que controlam a catálise enzimática, a hidrofobicidade do sítio catalítico.

4.1.3. CONCLUSÕES PARCIAIS

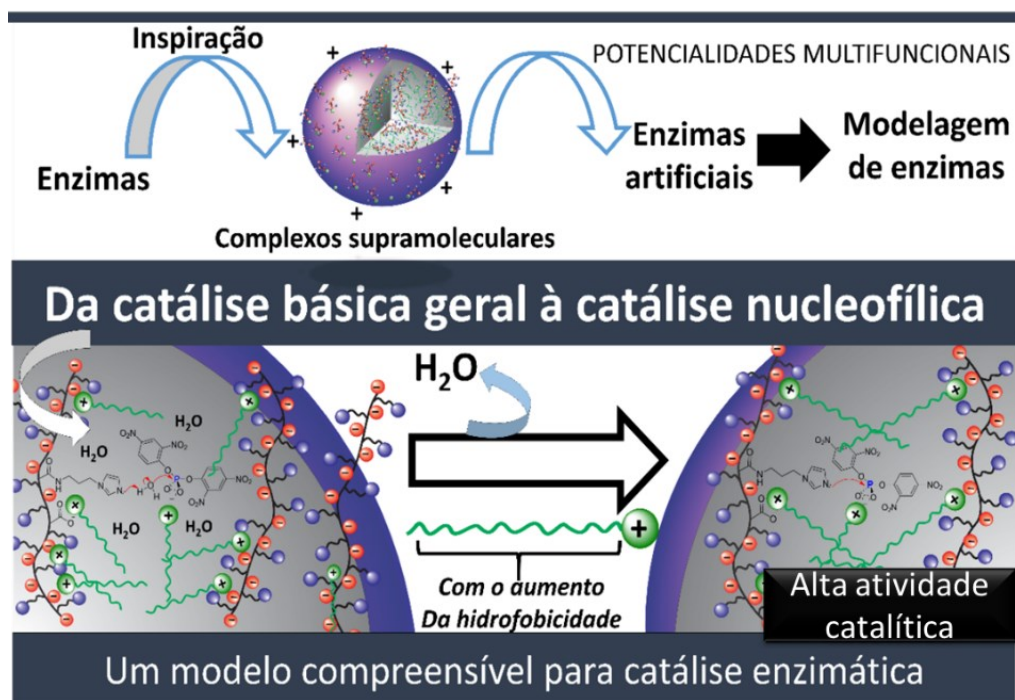
Os resultados das medidas de condutividade, fluorescência, espalhamento dinâmico de luz, espalhamento de luz relativo UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão, potencial zeta foram altamente consistentes entre si, os quais permitiram caracterizar a formação complexos supramoleculares polímero/surfactante (PAIM/C_nTAB), além de propriedades como: concentrações micelares críticas (CMC), concentrações agregacionais críticas (CAC), efeitos de polaridade, tamanho, estabilidade, morfologia e efeitos de carga interfacial. Em especial, os dados mostraram consistentemente que as propriedades dos complexos investigados são altamente dependentes e adaptativas ao pH, concentração do surfactante e tamanho da cadeia hidrofóbica do surfactante.

Os complexos PAIM/C_nTAB apresentaram efeitos catalíticos extraordinários nas reações de desfosforilação do BDNPP, sendo também altamente responsivos ao (a) pH, (b) concentração do surfactante e (c) tamanho da cadeia hidrofóbica do surfactante, altamente correlacionado com os estudos de caracterização. As melhores condições de catálise foram: (i) pH 9, (ii) complexos PAIM/C_nTAB pré-micelares e (iii) empregando complexos contendo surfactantes de maior cadeia hidrofóbica (PAIM⁻/C₁₆TA⁺). Nessas condições, foram obtidos incrementos catalíticos de até $6,0 \times 10^9$ vezes em relação à velocidade da reação de desfosforilação em água, sendo que tal eficiência catalítica é significativamente superior ao já reportado para muitas enzimas naturais. Tais complexos supramoleculares pré-micelares propiciam a formação de cavidades hidrofóbicas que possibilitam a aproximação entre substrato e grupos catalíticos. Evidências experimentais mostraram que o mecanismo de catálise do complexo PAIM⁻/C₁₆TA⁺ PAIM⁻/C₁₄TA⁺ e PAIM⁻/C₁₂TA⁺ é do tipo nucleofílico, enquanto que o mecanismo para PAIM⁻/C₁₀TA⁺ e PAIM⁻ é consistente com um mecanismo de catálise básica geral. Assim, os resultados mostram que os efeitos hidrofóbicos apresentam papel fundamental na catálise de tais reações de desfosforilação, sendo um fator de grande impacto que influencia fortemente tanto o aumento da velocidade de reação quanto o mecanismo reacional.

Por um lado, esses estudos possibilitam o desenvolvimento da ciência de base fornecendo um modelo compreensível que demonstra que efeitos hidrofóbicos são centrais em catálise enzimática; e subsidiam conceitos significativos da teoria espaço-temporal. Por outro, apresentam potencialidades multifuncionais em diversas aplicações

práticas, incluindo: nanomedicina, biotecnologia, e detoxificação química de pesticidas e armas químicas. No Esquema 6 é apresentada uma ilustração esquemática resumo da Parte I.

Esquema 6



PARTE II

Parte II: Micelas zwitteriônicas e complexos polímero/surfactante zwitteriônico: Novo método de determinação de CMC, caracterização e catálise de reações de desfosforilação

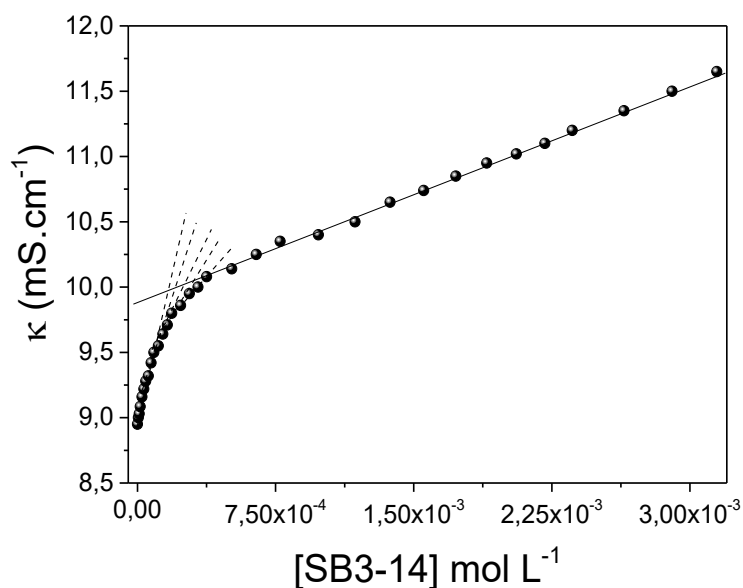
4.2. **PARTE II: Micelas zwitteriônicas e complexos polímero/surfactante zwitteriônico: Novo método de determinação de CMC, caracterização e catálise de reações de desfosforilação**

Visão geral - Parte II: Nesta parte são apresentados estudos de caracterização e catálise por complexos supramoleculares polímero/ surfactante tipo complexos polímero poliácido acrílico funcionalizado com grupos imidazóis (PAIM), associado por interações supramoleculares com surfactantes zwitteriônicos N-hexadecil-N-N-dimetil-amônio-N-propanosulfonato (SB3-16). Inicialmente foi realizado o desenvolvimento de um método específico para determinação de concentrações micelares críticas de micelas zwitteriônicas através da sonda fluorescente PBFI. A caracterização de complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico foi realizada através das técnicas de fluorescência pela sonda fluorescente PBFI, rendimento quântico de fluorescência, e diâmetro hidrodinâmico. Além disso, os complexos caracterizados foram empregados como catalizadores em reações de desfosforilação de um diéster de fosfato ativado, as cinéticas foram acompanhadas por espectrofotometria de absorção eletrônica e as constantes de velocidade de segunda ordem obtida por ajustes matemáticos específicos.

4.2.1. *PBFI: Uma sonda fluorescente supramolecular para determinação da CMC de surfactantes zwitteriônicos*

Medidas de condutividade foram realizadas para determinação da concentração micelar de surfactantes zwitteriônicos. Na Figura 56, é apresentado um exemplo para determinação da CMC do surfactante zwitteriônico SB3-14 em tampão Bis-Tris pH 7,0.

Figura 56. Medidas de condutividade para determinação da concentração crítica do surfactante zwitteriônico SB3-14 em tampão Bis-Tris pH 7,0 e 25,0 °C.

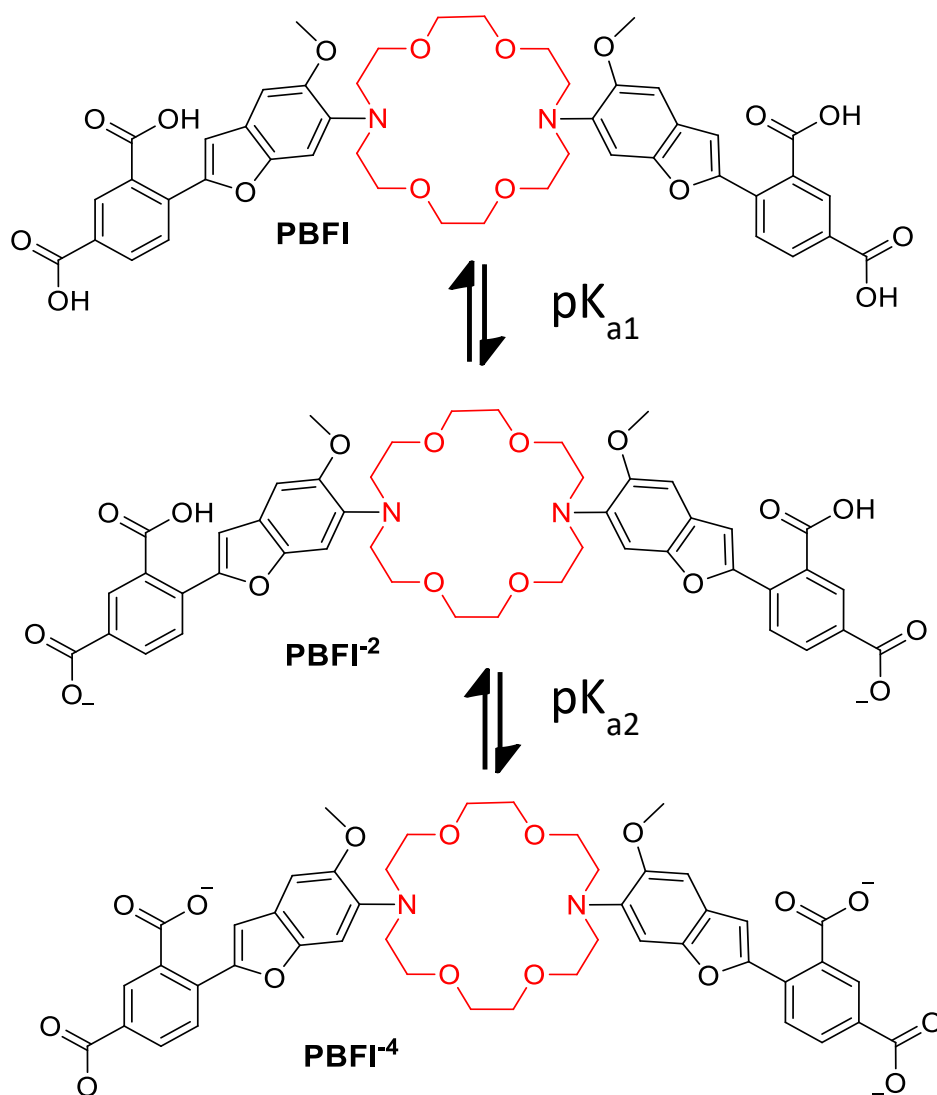


É possível notar, na Figura 56, que as medidas de condutividade não são adequadas para determinação de concentração micelar crítica de surfactantes zwitteriônicos, apresentando um perfil curvo e de difícil definição do valor de CMC. As linhas pontilhadas na Figura 56 demonstram a dificuldade de determinação da CMC por essa técnica, o que já era esperado, uma vez que comumente não se encontram na literatura valores de CMC determinados por condutividade para surfactantes zwitteriônicos. É possível notar que o perfil observado é muito distinto do qual foi observado para os surfactantes catiônicos da classe $C_n\text{TAB}$, apresentado previamente na Figura 35A, os quais apresentam uma abrupta mudança do coeficiente angular justamente na CMC, conferindo alta confiabilidade nos valores determinados. Logo, no que se refere aos surfactantes zwitteriônicos, as medidas de condutividade não podem ser empregadas como método para estudos específicos da associação supramolecular entre polímero e surfactante zwitteriônico.

Baseado nos conhecimentos reportados para surfactantes zwitteriônicos, tem-se como alvo nesta etapa obter uma sonda fluorescente específica e seletiva para determinação da concentração micelar crítica de surfactantes zwitteriônicos, em ordem de caracterizar micelas zwitteriônicas, e, assim, empregar como ferramenta fundamental para explorar complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico.

Nesse sentido, propõe-se que a sonda fluorescente supramolecular PBF1 possa ser empregada para determinação de CMC de surfactantes zwitteriônicos. Assim, a interação entre a sonda fluorescente PBF1 e surfactantes zwitteriônicos foi analisada em detalhe. Para isso, sabe-se que forma iônica (carga) é fator fundamental para a interação com surfactantes dessa natureza. Logo, primeiramente foram calculadas as frações das espécies ácido-base da referida molécula fluorescente. As frações molares das espécies ácido-base do PBF1 (Esquema 7) foram estimadas usando as equações 15-18.¹⁷⁴ Todos os cálculos foram baseados nos valores de pK_{a1} e pK_{a2} reportados.¹⁶³

Esquema 7



$$\chi_1 = \frac{[\text{PBFI}]}{c_t} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]^2}{[\text{H}_3\text{O}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}_3\text{O}^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad \text{Eq. 15}$$

$$\chi_2 = \frac{[\text{PBFI}^{-2}]}{c_t} = \frac{K_{a1}[\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_3\text{O}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}_3\text{O}^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad \text{Eq. 16}$$

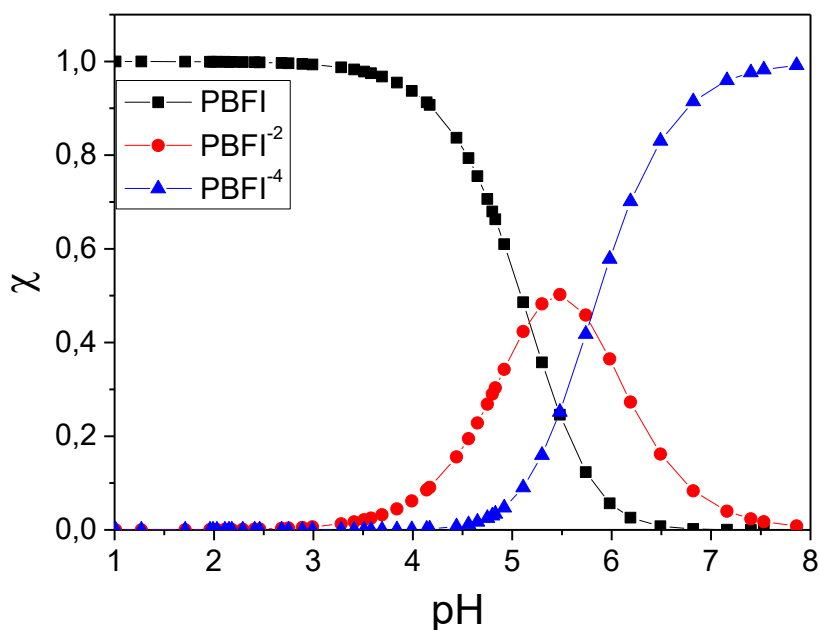
$$\chi_3 = \frac{[\text{PBFI}^{-4}]}{c_t} = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[\text{H}_3\text{O}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}_3\text{O}^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad \text{Eq. 17}$$

$$\chi_t = \chi_1 + \chi_2 + \chi_3 = 1 \quad \text{Eq. 18}$$

nas quais, χ_1 = fração molar de espécies PBFI; χ_2 = fração molar das espécies PBFI^{-2} ; χ_3 = Fração molar das espécies PBFI^{-4} ; K_{a1} = equilíbrio ácido-base entre as espécies PBFI e PBFI^{-2} ; K_{a2} = equilíbrio ácido-base entre as espécies PBFI^{-2} e PBFI^{-4} ; $[\text{H}_3\text{O}^+]$ = concentração molar de íon hidrônio; $[\text{PBFI}]$ = concentração molar de PBFI; $[\text{PBFI}^{-2}]$ = concentração molar de PBFI^{-2} ; $[\text{PBFI}^{-4}]$ = concentração molar de PBFI^{-4} ; C_t = concentração molar total; χ_t = fração molar total das espécies de PBFI.

Assim, na Figura 57 são apresentados os dados calculados das frações das espécies ácido-base do PBFI. Tais espécies são: neutra (PBFI), dianiônica (PBFI^{-2}) e tetra-aniônica (PBFI^{-4}).

Figura 57 – Fração das espécies protolíticas do PBFI em diferentes pH. $\text{p}K_{a1}=5,18$ e $\text{p}K_{a2}=5,77$.



As frações das espécies apresentadas na Figura 57 permitem avaliar as proporções das espécies em diferentes pH. Considerando as propriedades intrínsecas de surfactantes zwitteriônicos, no que se refere à incorporação específica de ânions, a espécie PBFI^{-4} se destaca por sua maior potencialidade de ligação nesses sistemas. Baseado nos dados da Figura 57, para garantir que a espécie PBFI^{-4} está presente em todos os estudos, foi adotado o $\text{pH} \geq 7,0$ para os estudos subsequentes com a sonda PBFI.

Os espectros de emissão de fluorescência da sonda PBFI⁴ em função da concentração do surfactante zwitteriônico SB3-14 ilustram o significativo aumento da emissão na presença dos sistemas micelares de surfactantes zwitteriônicos (Figura 58). A partir dos espectros de emissão de fluorescência, foram analisadas as variações de fluorescência no comprimento de onda de máxima intensidade ($\lambda_{\text{máx}}$) em função da concentração de surfactante, exemplificado para o SB3-14 na Figura 58.

Figura 58 - Espectros de emissão de fluorescência da sonda PBFI em diferentes concentrações de SB3-14. [PBFI]= $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, pH=7,00 (Tampão Bis-Tris) e 25°C.

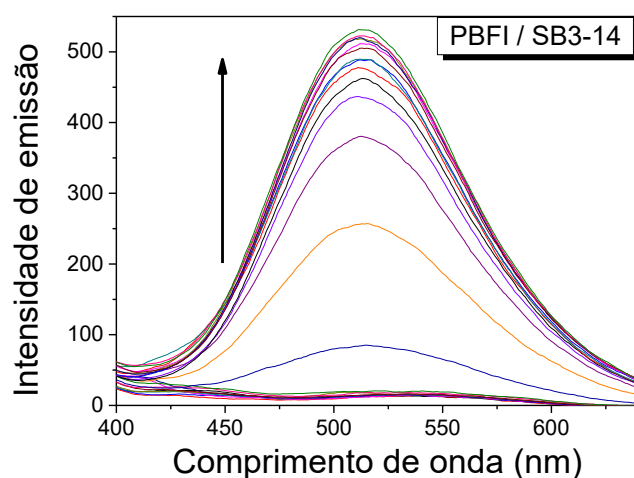
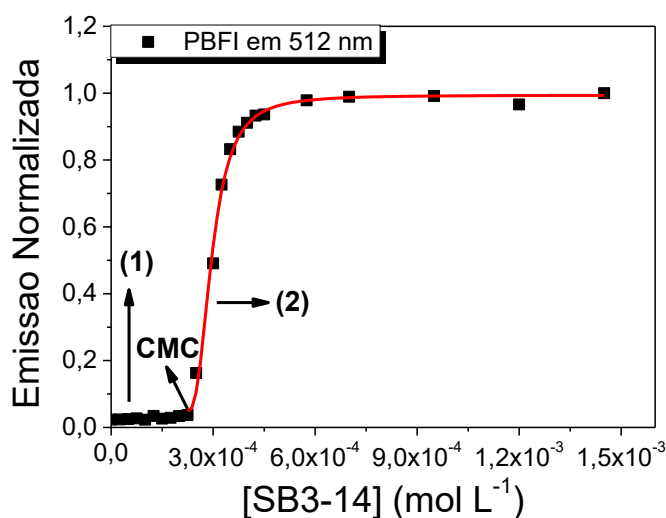


Figura 59 – Emissão normalizada da sonda PBFI em diferentes concentrações de SB3-14 e ajuste para determinação do K_b e CMC. [PBFI]= $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, pH=7,0 (Tampão Bis-Tris) em 25°C. Emissão no $\lambda_{\text{máx}} = 512\text{nm}$.



Dados da intensidade de emissão de fluorescência no comprimento de onda máximo (512 nm) em função da concentração do surfactante zwitteriônico SB3-14 mostram claramente duas regiões distintas, indicadas na Figura 59, sendo essas regiões: (1) não se tem variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração do surfactante, e, posteriormente, (2) tem-se um forte aumento da intensidade de fluorescência em função da concentração do surfactante. Assim, é possível observar claramente uma concentração crítica, bem definida e destacada, entre essas duas regiões distintas. Tal valor de concentração crítica obtida ($2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) é consistente com o valor de CMC obtido por tensão superficial de $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Ainda, ajustes matemáticos de ligação utilizando uma equação que inclui a CMC como parâmetro (Eq. 1), permitiram determinar simultaneamente a constante de ligação (K_b) do PBF1 ao sistema de surfactante zwitteriônico SB3-14 e a CMC do surfactante. O ajuste matemático para determinação do K_b do PBF1 em SB3-14 é apresentado na Figura 59. O valor de K_b obtido foi bastante pronunciado, $1,4 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ para o surfactante SB3-14, o que demonstra consistentemente a forte ligação entre sonda PBF1 e os sistemas coloidais de surfactantes zwitteriônicos. O valor de CMC obtido pelo ajuste matemático foi $2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para o surfactante zwitteriônico SB3-14, sendo tal valor o mesmo obtido por análise direta do gráfico. Assim, baseado na consistência com os dados de tensão superficial e o ajuste matemático multiparamétrico, incluindo a CMC, é possível inferir que a análise gráfica direta dos dados da intensidade de fluorescência da sonda PBF1 em função da concentração de surfactante pode ser utilizada como método para determinação da CMC de surfactantes zwitteriônicos.

Para conferir validade ao método proposto, além do surfactante SB3-14, tal método foi também investigado utilizando mais três surfactantes zwitteriônicos. Tais surfactantes são, primeiramente, o SB3-12 e o SB3-16, os quais juntos com o SB3-14 formam uma tríade que permite avaliar os efeitos hidrofóbicos do núcleo micelar no mecanismo de interação da sonda com os sistemas micelares. Por fim, também foi utilizado o surfactante zwitteriônico ImS3-14 que possui um outro grupo positivamente carregado, isto é, que possui um grupo imidazólio ao invés do grupo tetra-alkil-amônio do surfactante SB3-14. Assim, a mudança do grupo positivamente carregado, provável sítio de ligação do PBF1, permite explorar os efeitos interfaciais no processo de interação dos surfactantes zwitteriônicos.

Os dados experimentais de intensidade de fluorescência da sonda PBFI⁻⁴ em função da concentração dos surfactantes SB3-n (SB3-16, SB3-14 e SB3-12) são apresentados na Figura 60. É possível notar na Figura 60 que os dados obtidos para os surfactantes SB3-16 e SB3-12 apresentam o mesmo perfil do que previamente descrito para o surfactante SB3-14. Tal perfil possibilita a determinação da concentração micelar crítica através do método gráfico direto. Similarmente, na Figura 61, são apresentados os dados experimentais de intensidade de fluorescência da sonda PBFI⁻⁴ em função da concentração dos surfactantes SB3-14 e ImS3-14.

Figura 60. Intensidade de emissão de fluorescência do PBFI em 512 nm em função da concentração dos surfactantes SB3-n (SB3-16, SB3-14 e SB3-12). $[PBFI]=1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=7,0$ (Tampão Bis-Tris) em 25°C .

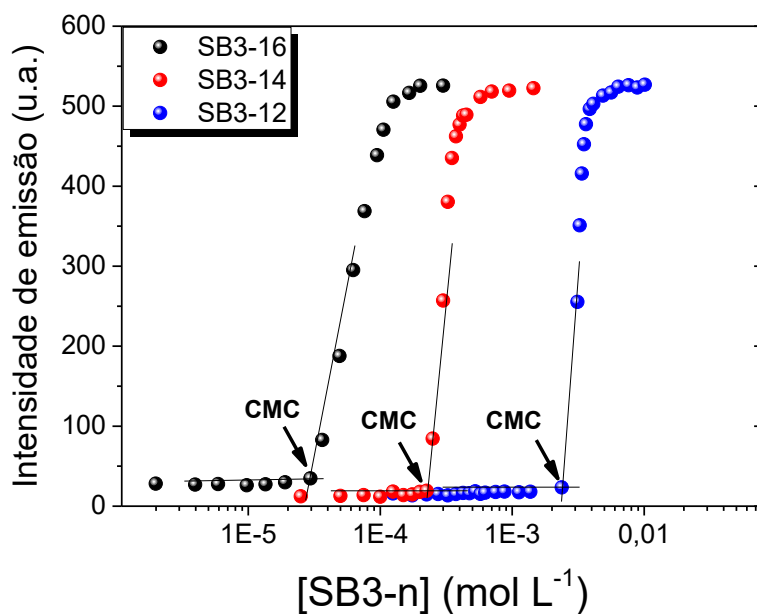
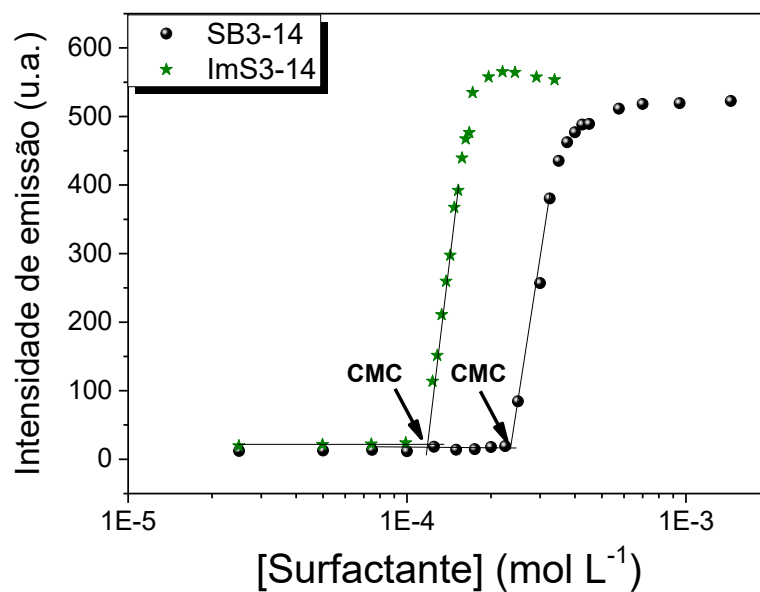


Figura 61. Intensidade de emissão de fluorescência do PBFI em função da concentração dos surfactantes ImS3-14 e SB3-14. $[PBFI]=1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=7,0$ (Tampão Bis-Tris) em 25°C .



Como é possível notar na Figura 61, os dados obtidos para o ImS3-14 também apresentam uma concentração crítica bem evidente, que permite uma análise direta para obtenção da CMC, consistente com os demais surfactantes zwitteriônicos da classe SB3-n. Os resultados obtidos das concentrações críticas obtidas pelo método PBF1 dos sistemas de surfactantes zwitteriônicos são listados na Tabela 3, juntamente com os dados obtidos por tensão superficial em ordem de comparação com os resultados obtidos.

Tabela 3 – Concentrações micelares críticas . [PBF1]= $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, pH=7,0 (Tampão Bis-Tris) em 25°C.

Sistema micelar	CMC (mol L⁻¹) Método PBF1⁴	CMC (mol L⁻¹) Método tensão superficial
SB3-12	$2,3 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$
SB3-14	$2,2 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-4}$
ImS3-14	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$
SB3-16	$2,9 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-5}$ (a)

(a) Ref.¹⁷⁵

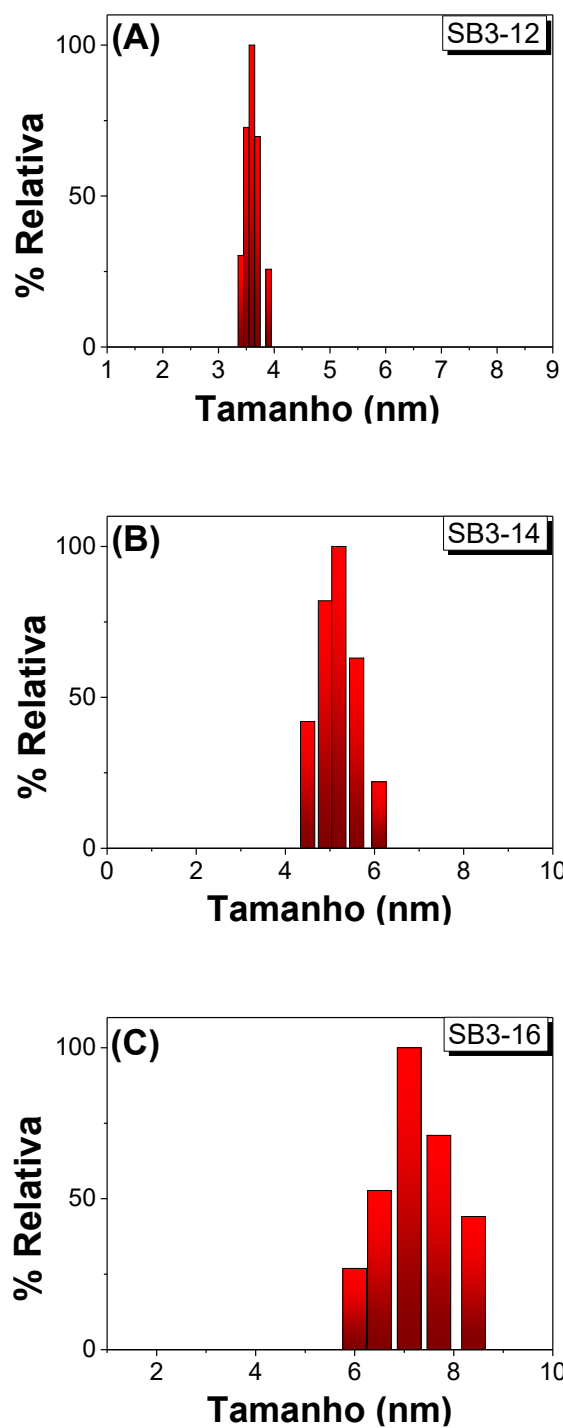
Os valores determinados de CMC para os surfactantes zwitteriônicos, apresentados na Tabela 3, via método PBF1 de análise direta, são altamente consistentes com os dados de tensão superficial para os mesmos surfactantes. Assim, tendo em vista que o método de tensão superficial é um método fortemente estabelecido para a determinação de CMC de surfactantes zwitteriônicos, pode-se afirmar que a sonda fluorescente supramolecular PBF1⁴ é altamente adequada para determinação de tais concentrações críticas. Ainda, é possível mostrar consistentemente que a sonda PBF1 apresenta sensibilidade muito maior do que o método de tensão superficial, baseado na diferença significativamente mais acentuada do coeficiente angular das retas projetadas para determinação das concentrações micelares críticas, assim como é possível notar

comparando a Figura A4 (dados de tensão superficial, apêndice) com as Figuras 60 e 61. Por exemplo, em SB3-14, o método utilizando o PBFI mostrou a razão entre o maior coeficiente angular em relação ao menor ($C_{ang. \text{ Maior}} / C_{ang. \text{ Menor}}$) de 90,7 enquanto que para o método de tensão superficial, a razão foi de 32,9. Portanto, é possível mostrar matematicamente que o método PBFI reportado neste trabalho é 2,75x mais sensível do que o método padrão por tensão superficial. Adicionalmente, é importante ressaltar que este é um incremento altamente significativo tendo em vista que a técnica de tensão superficial é altamente sensível para determinação de concentrações críticas, o que justifica sua grande popularização na ciência como método padrão para determinação de CMC de surfactantes zwitteriônicos.

Além disso, com objetivo de detalhar ainda mais o entendimento de interação e localização da sonda nos sistemas zwitteriônicos, foram explorados em conjunto os seguintes aspectos: cadeia alquílica do surfactante, tamanho micelar, grupo catiônico e rendimento quântico de fluorescência.

Medidas de espalhamento dinâmico de luz permitiram determinar os diâmetros hidrodinâmicos dos surfactantes SB3-n (SB3-12, SB3-14 e SB3-16), explorando os efeitos de tamanho micelar em função do tamanho da cadeia alquílica. Os histogramas obtidos para determinar os D_H são apresentados na Figura 62.

Figura 62. Histogramas das medidas de espalhamento dinâmico de luz na determinação dos diâmetros hidrodinâmicos das micelas de SB3-n: (A) SB3-12, (B) SB3-14, (C) SB3-16. Medidas realizadas em pH=7,0 (Tampão Bis-Tris) à 25,0°C. (A) [SB3-12]= 0,05 mol L⁻¹; (B) [SB3-14]= 0,01 mol L⁻¹; e (C) [SB3-16]= 5,0 x10⁻³ mol L⁻¹.



A partir dos histogramas apresentados na Figura 62, foi possível determinar os diâmetros hidrodinâmicos dos surfactantes SB3-12, SB3-14 e SB3-16. Os D_H obtidos foram: (A) $3,6 \pm 0,3$ para o SB3-12; (B) $5,2 \pm 0,8$ para o SB3-14; e (C) $7,1 \pm 1,1$ para o SB3-16. Na seguinte tendência de tamanho das micelas: SB3-16 > SB3-14 > SB3-12, sendo essa a mesma tendência do tamanho da cadeia alquílica dos surfactantes, logo, o aumento do tamanho micelar é relacionado com o aumento da cadeia alquílica, e, conseqüentemente, o aumento do núcleo micelar hidrofóbico.

Ainda, é possível notar na Figura 60 que as intensidades de emissão máximas obtidas apresentam os mesmos valores, sendo tal fato um indicativo de que a sonda está ligada e localizada em ambientes químicos similares nos diferentes surfactantes. Por outro lado, é possível observar na Figura 61 que o ImS3-14 apresenta perfil e intensidade máxima de fluorescência no patamar diferente do SB3-14, indicando que a mudança do grupo positivo afeta o ambiente químico no qual o surfactante está ligado. Esse fato é consistente com a ligação da sonda PBFI⁴ na interface micelar próximo a carga positiva do surfactante zwitteriônico. Para quantificar esse efeito com maior consistência, foram determinados os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) do PBFI⁴ em todos os surfactantes zwitteriônicos investigados. Nessa etapa, as medidas foram realizadas bem acima da CMC em concentrações garantindo a máxima fluorescência apresentadas nos patamares das Figuras 60 e 61. Os valores de rendimentos quânticos de fluorescência obtidos são listados na Tabela 4.

Tabela 4. Rendimentos quânticos de fluorescência da sonda PBFI em micelas dos surfactantes zwitteriônicos investigados (valores obtidos nas concentrações dos patamares de fluorescência máxima). $[PBFI]=1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $pH=7,00$ (Tampão Bis-Tris) em 25°C .

PBFI / Surfactante zwitteriônico	Φ_F PBFI
PBFI / SB3-12^a	0,026
PBFI / SB3-14^b	0,026
PBFI / SB3-16^c	0,026
PBFI / ImS3-14^d	0,028

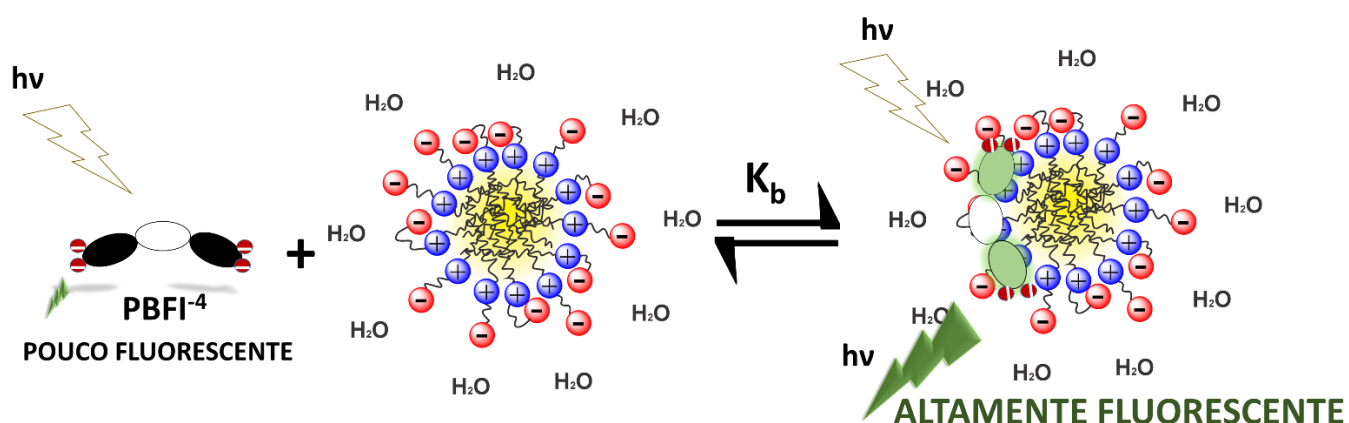
^a $[SB3-12]=8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; ^b $[SB3-14]=8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; ^c $[SB3-16]=8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; ^d $[ImS3-14]=8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$;

Os resultados de rendimento quântico de fluorescência em conjunto com os resultados de D_H mostram que o aumento da cadeia alquílica do surfactante, ou seja, o aumento do núcleo hidrofóbico micelar, não afeta os valores do rendimento quântico de fluorescência. Por outro lado, a alteração do grupo catiônico na interface hidrofílica da micela, ImS3-14 (com grupo imidazólio) e SB3-14 (com grupo tetra-alquil-amônio), afeta significativamente o rendimento quântico de fluorescência. Isto é, entre os surfactantes SB3-n e o ImS3-14 tem-se uma diferença significativa do ambiente químico em que a sonda $PBFI^{-4}$ está localizada.

Ainda, altos valores de constantes de ligação obtidos a partir da intensidade de emissão do $PBFI^{-4}$ em função da concentração dos surfactantes micelizados ($[Surfactante \text{ micelizados}] = [Surfactante]_{total} - CMC$), utilizando a equação da isoterma de ligação de Langmuir, foram obtidos. Tais valores de constantes de ligação obtidos foram: (A) $1,54 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ para o surfactante SB3-12 micelizado; (B) $1,52 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ para o surfactante SB3-14 micelizado; (C) $2,0 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ para o surfactante SB3-16 micelizado. Assim, os dados de K_b do entre $PBFI^{-4}$ e os surfactantes micelizados seguem a seguinte tendência: $SB3-12 \approx SB3-14 > SB3-16$. Tal tendência é contrária ao aumento do tamanho da cadeia alquílica, e, conseqüentemente, contrário ao aumento do núcleo micelar hidrofóbico baseado nos dados de diâmetro hidrodinâmico. Logo, os resultados

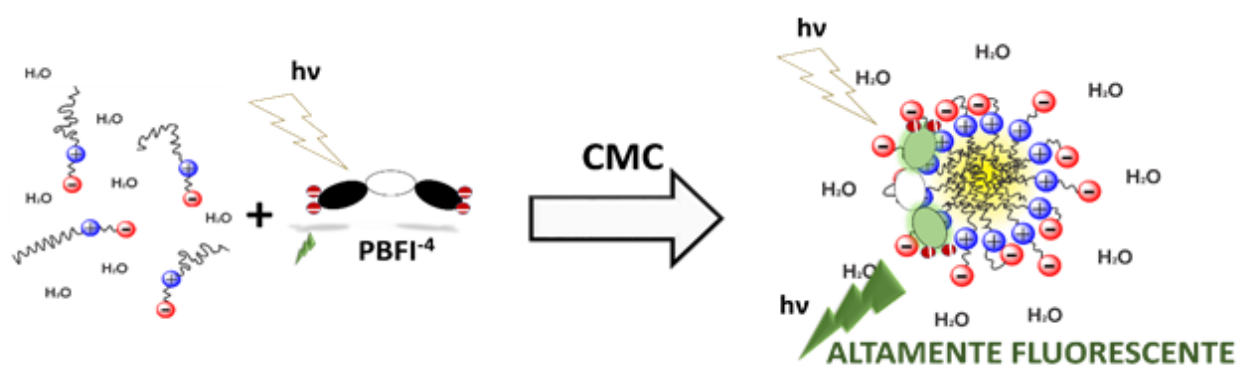
sugerem que o aumento da hidrofobicidade não afeta e pode até reduzir a magnitude de interação entre PBFI^{-4} e as micelas, e, ainda, não altera o ambiente químico quando completamente ligada na micela (dados de rendimento quântico de fluorescência). Portanto, baseado nas evidências experimentais obtidas por diâmetro hidrodinâmico, rendimento quântico de fluorescência e constantes de ligação aos surfactantes micelizados, é possível indicar consistentemente que a sonda PBFI^{-4} se liga fortemente na interface da micela, mais especificamente no grupo catiônico dos surfactantes zwitteriônicos micelizados. Tais resultados são consistentes com a série de artigos reportados na literatura que descreve a ligação específica de ânions em surfactantes zwitteriônicos. O resumo ilustrativo dos resultados de ligação e localização da sonda PBFI^{-4} nas micelas zwitteriônicas é apresentado no Esquema 8.

Esquema 8



Finalmente, os dados experimentais indicam que o mecanismo de determinação de concentrações micelares críticas pelo método PBFI^{-4} está baseado na não-interação (ou baixíssima interação) com surfactantes livres em solução, em condições pré-micelares, contra a impressionante e forte ligação da sonda aos surfactantes micelizados, em condições após a CMC, sendo que tal interação ocorre via incorporação aniônica específica no grupo catiônico na interface micelar. O Esquema 9 ilustra, em resumo, o mecanismo de determinação de concentrações micelares críticas através da sonda fluorescente supramolecular PBFI^{-4} .

Esquema 9

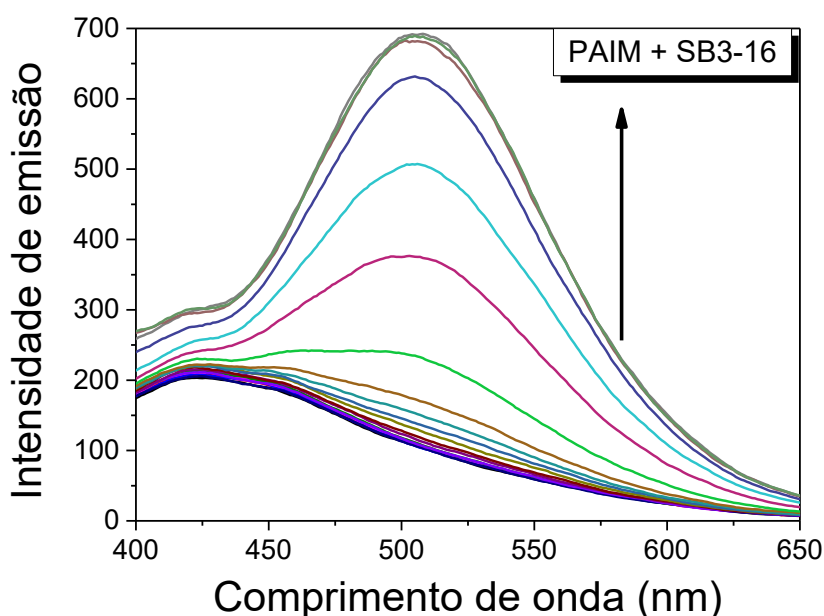


4.2.2. Complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico: Caracterização e aplicação em catálise de reações de desfosforilação

Para caracterizar complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico, visando aplicações catalíticas, a sonda PBFI⁴ foi empregada com objetivo de determinar concentrações críticas em tais complexos. Baseado nos dados experimentais obtidos para os complexos PAIM/C_nTAB, na Parte I desta tese, os quais mostraram que o polímero na forma aniônica PAIM⁻ associado ao surfactante C₁₆TAB apresentam os melhores efeitos catalíticos. Nesta seção serão investigados os complexos formados pela associação supramolecular entre o polímero PAIM⁻ e o surfactante SB3-16.

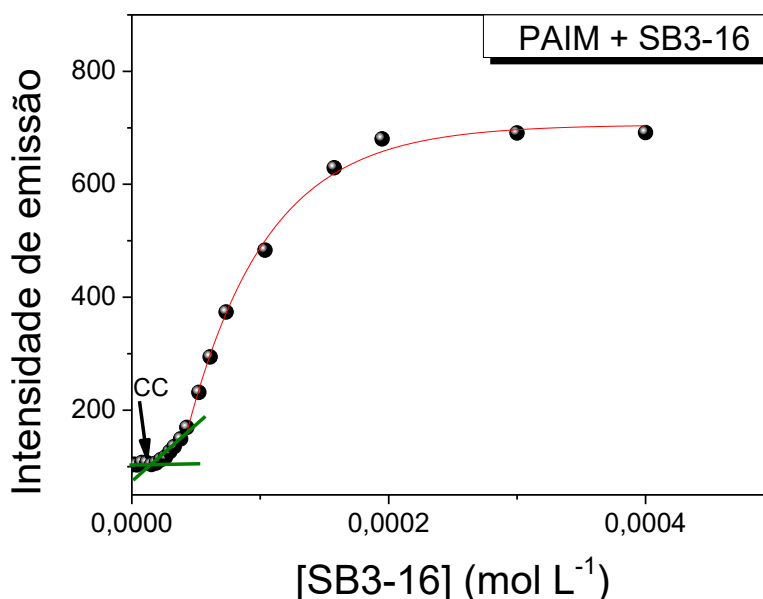
Medidas de fluorescência da sonda PBFI⁴ foram realizadas na presença de PAIM em solução em função da concentração do surfactante SB3-16. Os espectros de emissão de fluorescência da sonda PBFI⁴ na presença de PAIM em função da concentração do surfactante SB3-16 são apresentados na Figura 63.

Figura 63. Espectros de emissão de fluorescência da sonda PBFI⁴ na presença de PAIM em função da concentração do surfactante SB3-16. [PBFI]=1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹, [PAIM]=2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, pH=7,0 (Tampão Bis-Tris) e 25°C.



A partir dos espectros de emissão de fluorescência, foram obtidos os dados da intensidade de emissão máxima em função da concentração do surfactante SB3-16, os quais são apresentados na Figura 64.

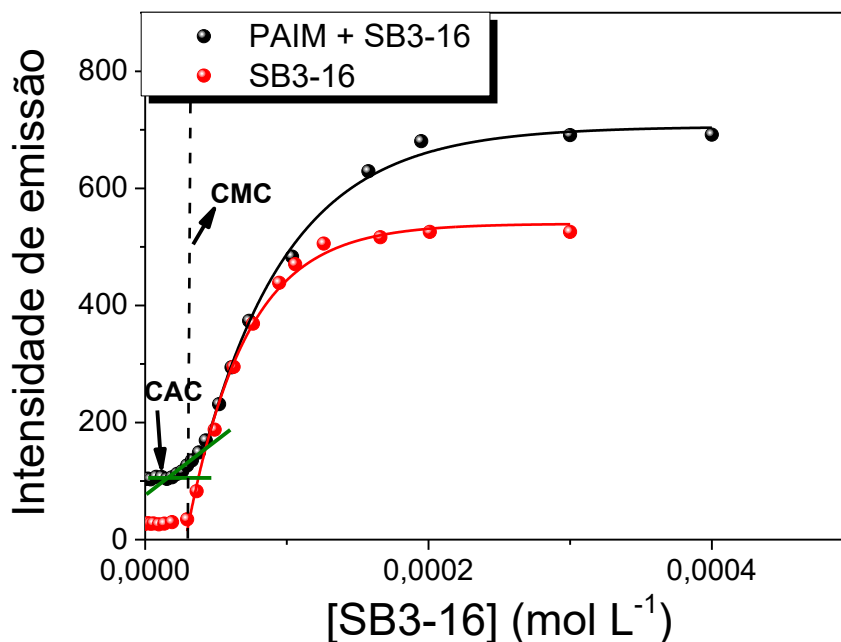
Figura 64. Intensidade de emissão do PBFI^4 , em 512 nm, em função da concentração do surfactante zwitteriônico SB3-16. $[\text{PBFI}] = 1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{PAIM}] = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$ (Tampão Tris) e 25°C .



Os dados experimentais obtidos a partir da intensidade de emissão de PBFI^4 na presença de PAIM em função da concentração de surfactante SB3-16 permitiram determinar uma concentração crítica (CC) de $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sendo que tal valor não é consistente com o valor obtido para o SB3-16 na ausência de PAIM ($\text{CMC SB3-16} = 2,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, método PBFI).

Assim, na Figura 65, é apresentada a sobreposição dos dados de intensidade de fluorescência do PBFI^4 em função da concentração de SB3-16, na presença e ausência do polímero PAIM.

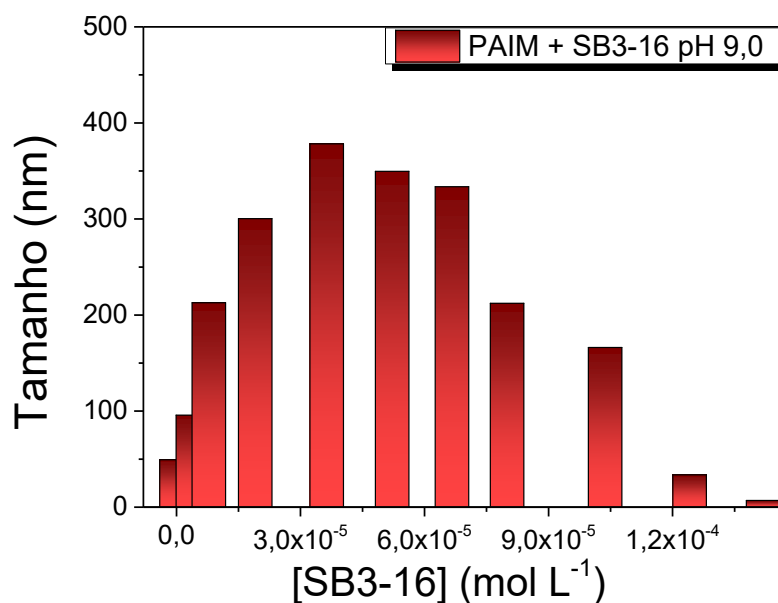
Figura 65. Sobreposição dos dados de intensidade de fluorescência do PBF⁴ em função da concentração de SB3-16, na presença e ausência do polímero PAIM. [PBF⁴]= $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, [PAIM]= $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) e 25°C.



A sobreposição dos dados experimentais na Figura 65 na presença e ausência de PAIM evidencia a diferença de concentrações críticas obtidas, logo, é possível inferir que tal concentração crítica obtida na presença PAIM ($1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) pode ser considerada como CAC de formação de complexos supramoleculares polímero/surfactante. Ainda, é possível notar a diferença do perfil das curvas e da intensidade de fluorescência, bem como que as diferenças das intensidades iniciais entre os dois sistemas investigados ($\Delta_{\text{inicial}} = 77$ unidades) são 88 unidades menor a diferença entre os patamares dos dois sistemas ($\Delta_{\text{patamar}} = 165$ unidades, entre SB3-16 e PAIM/SB3-16), o que indica um efeito de um ambiente químico específico, distinto do observado na presença de apenas SB3-16. Para obter dados mais quantitativos, o rendimento quântico de fluorescência foi obtido para a sonda PBF⁴ nas condições do patamar PAIM/SB3-16, sendo o valor obtido de 0,034. Assim, é possível notar que tal valor é significativamente diferente do valor obtido para micela de SB3-16 ($\Phi_F = 0,026$). Portanto, tal resultado indica consistentemente que o ambiente químico do sistema PAIM/SB3-16 difere do ambiente químico de micelas de SB3-16.

Medidas de espalhamento dinâmico de luz foram realizadas para determinação dos diâmetros hidrodinâmicos de agregados contendo PAIM em função da concentração do surfactante zwitteriônico SB3-16 (Figura 66). Os dados experimentais evidenciam a formação de complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico, PAIM⁻/SB3-16. Tal evidência está baseada no fato de que em pH 9,0 o polímero PAIM forma agregados de 50 nm, reportado na Parte I desta tese (Figura 41), enquanto que as micelas de SB3-16 apresentam tamanho de 7,1 nm (Figura 62C), portanto, os valores obtidos de até 300 nm antes da CMC, e de até 378 nm após a CMC são consistentes com a formação de complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16 pré-micelares, bem como, a formação de complexos PAIM⁻/SB3-16 micelares.

Figura 66. Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16 em função da concentração de SB3-16. [PAIM]= $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) e 25,0°C.

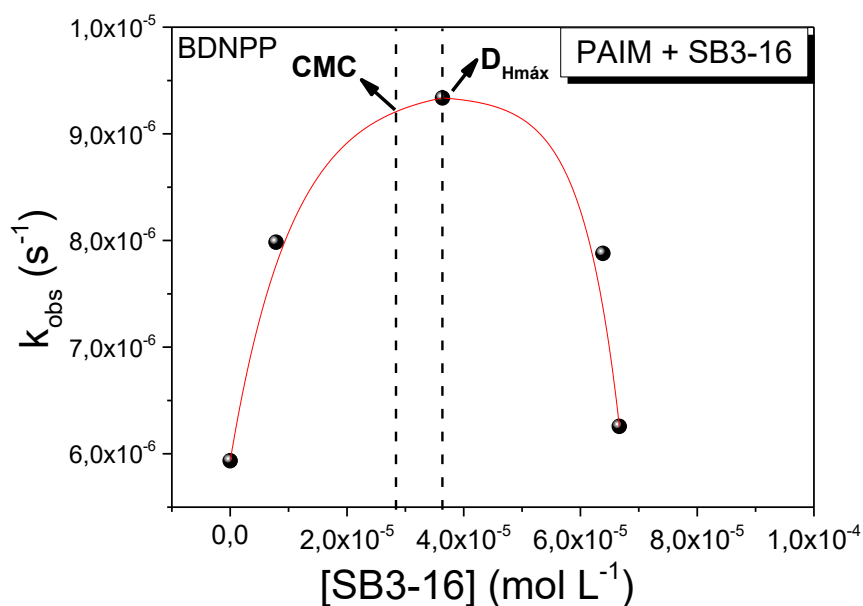


Ainda, é possível notar perfil similar aos obtidos para os complexos PAIM⁻/C_nTA⁺, reportados na parte I, ou seja, os diâmetros hidrodinâmicos passam por um valor de $D_{Hmáx}$, e, como supracitado, o $D_{Hmáx}$ foi 378 nm, na concentração de $3,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (concentração acima da CMC).

Reações de desfosforilação do diéster de fosfato BDNPP foram realizadas para avaliar o efeito catalítico dos complexos polímero/surfactante zwitteriônico (PAIM⁻/SB3-16) em função da concentração do surfactante em pH 9,0. Os resultados de k_{obs} obtidos

das reações de desfosforilação na presença de complexos PAIM⁻/SB3-16 em função da concentração de SB3-16 são apresentados na Figura 67.

Figura 67. Resultados de k_{obs} obtidos das reações de desfosforilação na presença de complexos PAIM⁻/SB3-16 em função da concentração de SB3-16. [BDNPP]= $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Reações realizadas em 25,0 °C; [PAIM⁻]= 2×10^{-4} mol L⁻¹ e pH 9,0 (Tampão Tris).



Os resultados apresentados na Figura 67 mostram significativo incremento catalítico das reações de desfosforilação do BDNPP catalisadas por complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16. Os dados mostram um perfil catalítico de sino, passando por uma concentração de máxima atividade catalítica. É possível notar que o valor de CMC é bem próximo do topo do sino, o que indica que complexos supramoleculares pré-micelares são eficientes na clivagem da estável ligação P-O, superando o polímero PAIM⁻ para tal proposição. Supreendentemente, o topo do sino é exatamente o mesmo valor de diâmetro hidrodinâmico máximo ($D_{Hmáx}$), e, assim, o complexo de melhor atividade catalítica possui diâmetro hidrodinâmico de 378 nm, e é possível classificar que tal catalisador é um complexo supramolecular do tipo micelar (após a CMC). Pouco depois do máximo do sino, a constante de velocidade volta a decrescer chegando novamente ao valor de k_{obs} similar ao PAIM⁻ em solução, seguido pelo mesmo efeito de decréscimo do diâmetro hidrodinâmico dos complexos supramoleculares (Figura 66). Ainda, a partir dos dados de k_{obs} foi obtida a constante de

velocidade de segunda ordem de máxima atividade catalítica dos complexos PAIM⁻/SB3-16 ($k_{\text{PAIM}^-/\text{SB3-16}}$). O valor de $k_{\text{PAIM}^-/\text{SB3-16}}$ foi $4,2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, que por sua vez representa um incremento, $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$, de $2,1 \times 10^7$ vezes em relação a constante de velocidade da reação desfosforilação com água (Tabela 2). O incremento catalítico apresentado ainda é menos significativo do que para os complexos PAIM⁻/ C_n TAB, mesmo para os surfactantes com menores cadeias alquílicas. Os resultados apresentados se enquadram da seguinte maneira na tendência previamente obtida na Parte I: PAIM⁻/ C_{16} TA⁺ > PAIM⁻/ C_{14} TA⁺ > PAIM⁻/ C_{12} TA⁺ > PAIM⁻/ C_{10} TA⁺ > PAIM⁻/SB3-16 > PAIM⁻. A posição do catalisador PAIM⁻/SB3-16 na tendência supracitada sugere que o mecanismo de atuação é via catálise básica-geral, bem como os catalisadores PAIM⁻/ C_{10} TA⁺ e PAIM⁻. Ainda, tal tendência mostra consistentemente a inegável e grande importância da cadeia hidrofóbica do surfactante, mas também revela a grande relevância do grupo polar do surfactante no design de catalisadores supramolecular baseados em complexos polímero/surfactante.

4.2.3. CONCLUSÕES PARCIAIS

Em conclusão, os resultados obtidos permitiram identificar a molécula fluorescente supramolecular PBFI⁻⁴ como uma sonda altamente sensível frente à determinação das concentrações micelares críticas de surfactantes zwitteriônicos. Os resultados de CMC obtidos são consistentes com os resultados obtidos pelo método padrão de tensão superficial e também consistentes com os valores obtidos pelo ajuste matemático de ligação multiparamétrico que inclui a CMC. Baseado nos resultados de diâmetro hidrodinâmico, rendimento quântico de fluorescência, perfil de interação e constantes de ligação do PBFI⁻⁴ em surfactantes micelizados de SB3-n e ImS3-14, analisados em conjunto, foi possível sugerir com consistência o tipo de interação, localização e o mecanismo de determinação de concentração micelar crítica através da sonda PBFI⁻⁴. Nesse sentido, propõe-se que a sonda PBFI⁻⁴ se liga fortemente na interface micelar, mais especificamente próxima ao grupo catiônico, consistente com a ligação específica de ânions na interface de surfactantes zwitteriônicos. Ainda, os resultados identificam que o mecanismo de determinação da CMC está baseado na fraca ou na não interação da sonda PBFI⁻⁴ aos surfactantes zwitteriônicos não micelizados em contrapartida à fortíssima ligação da sonda nas micelas zwitteriônicas.

Resultados obtidos através da sonda fluorescente PBFI⁻⁴ permitiram também determinar a concentração agregacional crítica (CAC) na associação supramolecular entre o polímero PAIM⁻ e o surfactante zwitteriônico SB3-16. Além disso, os dados de diâmetro hidrodinâmico do polímero PAIM⁻ em função da concentração de SB3-16, em conjunto com os dados de D_H de agregados de somente PAIM⁻ e micelas de SB3-16, evidenciam consistentemente a formação de complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16. Na sequência, os complexos PAIM⁻/SB3-16 apresentaram significativo incremento catalítico nas reações de desfosforilação BDNPP em relação à reação em PAIM⁻ e o notável incremento de $2,1 \times 10^7$ em relação à reação com moléculas de água. Ainda, ao relacionar o incremento catalítico obtido para o PAIM⁻/SB3-16 com os obtidos para os complexos PAIM⁻/ C_nTA^+ foi possível notar a seguinte tendência: PAIM⁻/ $C_{16}TA^+$ > PAIM⁻/ $C_{14}TA^+$ > PAIM⁻/ $C_{12}TA^+$ > PAIM⁻/ $C_{10}TA^+$ > PAIM⁻/SB3-16 > PAIM⁻. Finalmente, é possível concluir que além dos efeitos hidrofóbicos que são, de fato, centrais na modulação da atividade catalítica, os resultados mostram que a cabeça polar do surfactante apresenta grande impacto tanto na formação quanto na atividade catalítica frente a reações de

desfosforilação, ressaltando a grande relevância dos efeitos cooperativos hidrofóbicos e eletrostáticos, e, assim, um aspecto a ser fortemente considerado no design de catalisadores supramoleculares polímero/surfactante visando a catálise de reações desta natureza.

PARTE III

Parte III: Caracterização de clorofilas b em sistemas modelo; caracterização e fotocatalise em complexos supramoleculares polímero/surfactante

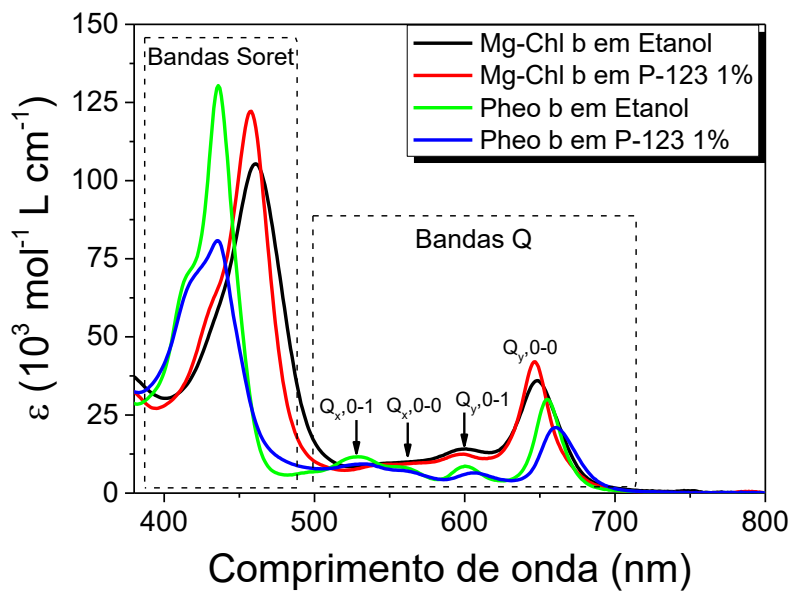
4.3. PARTE III: Caracterização de clorofilas *b* em sistemas modelo; caracterização e fotocatalise em complexos supramoleculares polímero/surfactante

Visão geral - Parte III: Nesta parte são apresentados estudos de caracterização de clorofilas tipo *b* em sistemas micelares nanoestruturados não-iônicos modelo (F-127, P-123, Tween 20, Tween 80), como sistemas-modelo para melhor compreensão da clorofila *b* sistemas coloidais, e, na sequência, foram realizados estudos de caracterização e aplicação em fotocatalise de clorofilas *b* incorporadas em complexos supramoleculares polímero/ surfactante previamente investigados na Parte I e II (sistema de interesse principal dessa Tese de Doutorado). Para caracterização da clorofila *b* foram realizados estudos espectroscópicos por espectrofotometria UV-Vis e coeficiente de partição 1-octanol /água, e, nos sistemas coloidais modelo, foram realizados estudos de constante de ligação por fluorescência, diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta, supressão de fluorescência com iodeto de potássio para avaliar localização relativa, fotodegradação e rendimento quântico de oxigênio singlete. As clorofilas em complexos supramoleculares foram investigadas por estudos de constante de ligação por fluorescência, rendimento quântico de fluorescência, estabilidade no escuro, fotodegradação, e, por fim, aplicação em fotocatalise reações de foto-oxidação da Vitamina C e Trans-estilbeno via oxigênio singlete.

4.3.1. *Propriedades espectroscópicas e rendimentos quânticos de fluorescência*

A Figura 68 mostra os espectros de absorção eletrônica da Mg-Chl *b* e Pheo *b* em etanol puro e em soluções aquosas de P-123. Para ambos os compostos, os espectros podem ser divididos nas regiões referentes às bandas Soret e Q. Para Mg-Chl *b*, duas bandas Q principais, em torno de 646 nm (Q_y, 0–0) e 598 nm (Q_y, 0–1), são observadas, enquanto a Pheo *b* de base livre tem quatro bandas Q de absorção distintas ao redor de 655 nm (Q_y, 0–0), 600 nm (Q_y, 0–1), 560 nm (Q_x, 0–0) e 528 nm (Q_x, 0–1) como resultado da perda da simetria molecular (Figura 68).³⁰

Figura 68. Espectros de absorção eletrônica da Mg-Chl *b* e Pheo *b* em etanol e em soluções aquosas de micelas P-123. $[Mg-Chl\ b] = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[Pheo\ b] = 5,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e P-123 = 1%, $m/v = 1,79 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.



O espectro de absorção da Mg-Chl *b* em etanol é muito similar ao obtido em soluções micelares de P-123, F-127, Tween 80 e Tween 20 (Figura 68), com variações muito pequenas no comprimento de onda de absorção máximo e coeficiente de absorção molar nas bandas Soret e Q. Por outro lado, as propriedades eletrônicas do Pheo *b* são muito mais dependentes do microambiente. Comparado à absorção em etanol, observa-se um pequeno efeito batocrômico da banda Q e uma diminuição do coeficiente de absorvidade molar da Pheo *b*. As propriedades espectrofotométricas de Mg-Chl *b* e Pheo *b* em etanol e nos sistemas coloidais investigados estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5. Propriedades espectrofotométricas e fotofísicas de Mg-Chl *b* e Pheo *b* nos sistemas investigados. Comprimentos de onda máximos de absorção (λ), comprimentos de onda máximos de emissão (λ_{emis}), coeficientes de absorção molar (ϵ) e rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).

		Etanol	P-123^a	F-127^b	Tween 20^c	Tween 80^d
Mg-Chl b, Soret	(λ , nm); $\epsilon(10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	(461); 104	(458); 123	(458); 105	(462); 109	(461); 89
Mg-Chl b, Q_v,0-0	(λ , nm); $\epsilon(10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	(648); 36	(646); 42	(648); 38	(650); 40	(650); 33
Pheo b, Soret	(λ , nm); $\epsilon(10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	(436); 130	(435); 83	(427); 64	(436); 67	(430); 64
Pheo b, Q	(λ , nm); $\epsilon(10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	(655); 30	(661); 21	(664); 19	(664); 20	(664); 20
Fluoresc Mg-Chl b	λ_{emis} (nm)	657	651	651	656	655
Fluoresc Pheo b	λ_{emis} (nm)	659	660	662	662	662
Mg-Chl b	Φ_F	0,06	0,09	0,02	0,09	0,05
Pheo b	Φ_F	0,12	0,07	0,02	0,03	0,02

[Surfactante] = 1% (m / v) ou ^a[P-123] = $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ^b[F-127] = $7,94 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ^c[Tween 20] = $8,96 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ^d[Tween 80] = $8,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Todas as concentrações de surfactantes estão bem acima das CMC. Todos os valores de ϵ foram determinados usando um ϵ de referência em 80% de acetona em água¹⁵⁸. Para a Mg-Chl *b* λ_{exc} = 461 nm e para a Pheo *b* λ_{exc} = 435 nm.

Os valores na Tabela 5 caracterizam as formulações que permitem quantificação espectroscópica das clorofilas *b* por coeficiente de absorvidade molar e comprimento de onda de absorção máxima. Os altos coeficientes de absorvidade molar observados na região de 600 a 700nm (janela terapêutica) são uma característica fundamental para a aplicação de um fotossensibilizador em terapia fotodinâmica e para outras aplicações fotoquímicas empregando a banda Q como alvo de irradiação. Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) também são apresentados na Tabela 5. Apesar de essas clorofilas *b*

apresentarem significativa fluorescência, que possibilitam utilizar essa propriedade para caracterização dos sistemas empregados neste trabalho, os baixos valores de Φ_F obtidos indicam alto rendimento quântico da formação do estado tripleto. Tal correlação é consistente devido ao fato de que a fluorescência e a conversão intersistema, processo que leva ao estado tripleto excitado, são processos competitivos (conceitos fundamentais do diagrama de Jablonski). Portanto, o resultado obtido é um relevante indício de que tais clorofilas *b* possam apresentar altos rendimentos quânticos de geração de oxigênio singleto.

4.3.2. Coeficiente de partição 1-octanol / água e interação com sistemas micelares não-iônicos

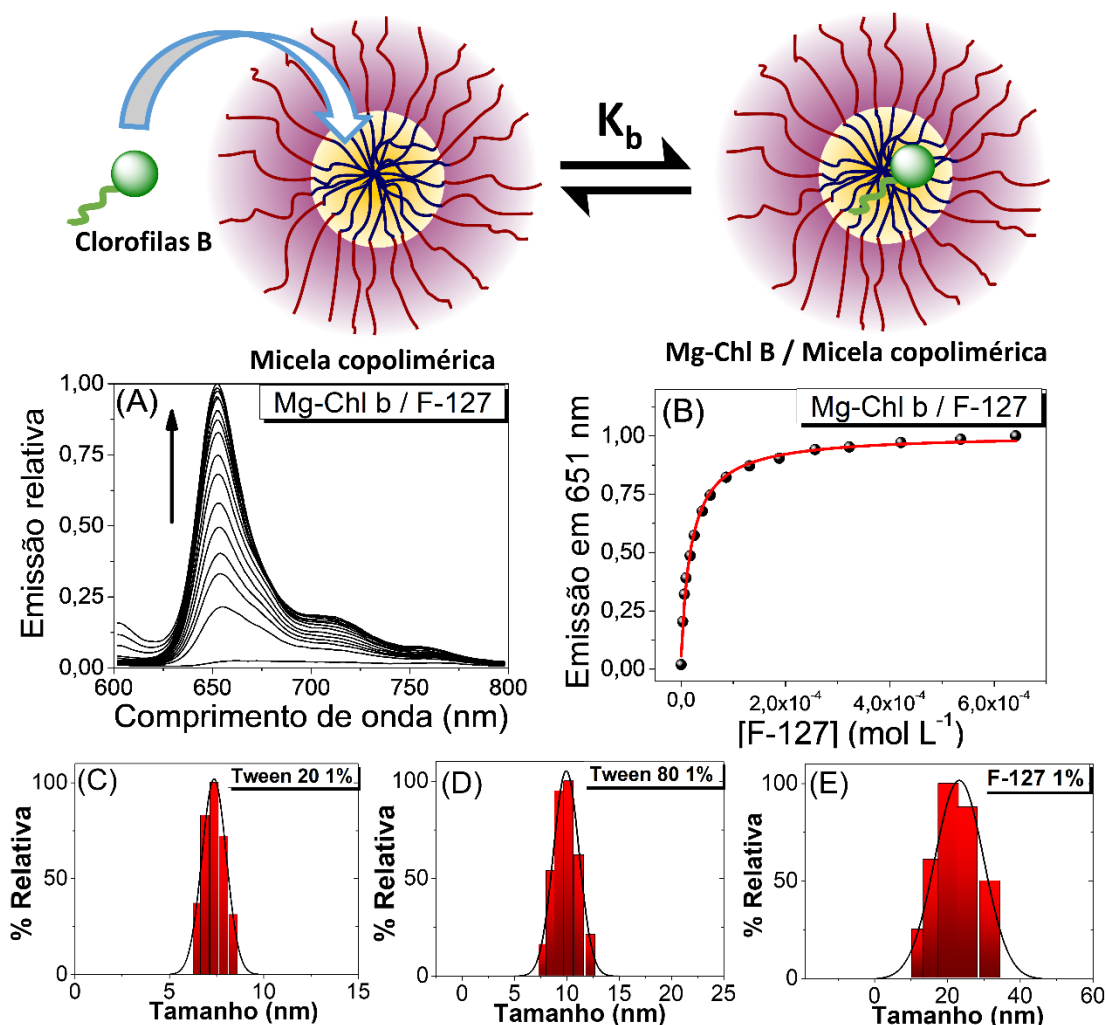
Os estudos de partição 1-octanol / água são utilizados como um modelo simples para avaliação da interação de moléculas de interesse, tal como as clorofilas, com as membranas por natureza hidrofílica / hidrofóbica. Assim, os coeficientes de partição octanol / água (K_P) foram determinados para Mg-Chl *b* e Pheo *b*. Os valores de K_P obtidos são 106 para Mg-Chl *b* ($\log P = 2,03$) e 198 para Pheo *b* ($\log P = 2,30$), onde $\log P$ é $\log K_P$. Nesse método, as moléculas são classificadas pelos valores de $\log P$ da seguinte forma: abaixo de 0 como hidrofílico, entre 0 e 1,5 como anfifílico e acima de 1,5 como lipofílico (hidrofóbico)¹⁷⁶, portanto, ambas as moléculas foram classificadas como lipofílicas, sendo tal resultado altamente consistente com o fato de que clorofilas são moléculas apreciavelmente grandes e que apresentam uma longa cadeia fitílica apolar. Além disso, os valores de K_P dessas Chls indicam que a Mg-Chl *b* é menos lipofílica do que a Pheo *b*, o que é justificado pela presença de um átomo de Mg^{2+} coordenado no anel clorínico. Além disso, os valores reportados também são consistentes com os valores reportados para as clorofilas *a*,¹⁷⁷ porém menores, justificado pela presença do grupo aldeído nas clorofilas *b*.

É bem reportado que a alta hidrofobicidade das Chls A leva à auto-agregação em meios aquosos¹⁷⁸⁻¹⁸⁰, alterando as suas propriedades, como o tempo de vida dos estados excitados e os rendimentos quânticos, diminuindo a eficiência dos processos fotoquímicos após a absorção de luz^{178,181,182}. Portanto, a preparação de formulações contendo esses pigmentos que permitem a estabilização dos compostos monoméricos é

de suma importância para aplicações fotoquímicas. Ainda, a utilização de sistemas estabilizadores não-iônicos permite futuras aplicações médicas.

A interação de Mg-Chl *b* com o surfactante copolimérico F-127, como exemplo, foi investigada através da intensidade de emissão em função da concentração do surfactante (Figura 69). Dados experimentais mostraram que a intensidade de emissão é praticamente inexistente na ausência de surfactante, sendo tal fato consistente com o efeito de auto-supressão dos estados excitados,^{177,183} devido à auto-agregação de clorofilas em meio aquoso. À medida que a concentração de surfactante aumenta, a intensidade da fluorescência também aumenta (Figura 69A), o que indica solubilização / interação de Chls com surfactantes, mesmo em concentrações abaixo da CMC nessas condições experimentais.

Figura 69. Ilustração de ligação de Mg-Chl *b* com micelas copoliméricas. Resultados da emissão de fluorescência de Mg-Chl *b* por titulação de F-127: (A) sobreposição de espectros e (B) ajuste da curva da intensidade de emissão em função da adição de surfactante. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico dos sistemas micelares (C) Tween 20, (D) Tween 80 e (E) F-127. $T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10\text{ molL}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 461\text{ nm}$.



Conforme reportado,^{183,184} a presença de compostos altamente hidrofóbicos em solução aquosa pode induzir a formação de agregados pré-micelares de surfactantes, levando a valores de CMC aparentes. As curvas de emissão relativa em função da concentração de surfactante foram ajustadas usando a Eq. (1) (Figura 69B), permitindo a determinação das constantes de ligação (K_b) e, concomitantemente, os valores aparentes de CMC, conforme listado na Tabela 6.

Tabela 6. Constantes de ligação, CMC aparente, diâmetro micelar (D_H) e potencial zeta (ζ) para Mg-Chl *b* e Pheo *b* em sistemas surfactantes aquosos. $[Chl] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Para a Mg-Chl $\lambda_{\text{Exc}} = 461 \text{ nm}$ e para a Pheo *b* $\lambda_{\text{Exc}} = 435 \text{ nm}$. Todos os ajustes foram realizados usando a Eq. (1) com $N = 1$.

Sistema	<i>Mg-Chl b</i>		<i>Pheo b</i>		Sistemas micelares	
	K_b ($10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$)	CMC_{App} ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	K_b ($10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$)	CMC_{App} ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	D_H (nm)	ζ (mV)
F-127	$47,7 \pm 2,7$	$1,0 \pm 0,3$	$58,6 \pm 2,6$	$0,9 \pm 0,01$	20,4	-0,7 ($\pm 0,3$)
P-123	$18,8 \pm 2,0$	$1,2 \pm 0,4$	$21,7 \pm 1,9$	$0,9 \pm 0,04$	21,3 ^a	-
Tween 80	$2,6 \pm 0,3$	$10,0 \pm 0,4$	$11,8 \pm 0,4$	$9,8 \pm 0,2$	10,2	+1,6 ($\pm 0,2$)
Tween 20	$1,6 \pm 0,1$	$36,5 \pm 5,4$	$7,7 \pm 0,3$	$20,0 \pm 5,0$	7,4	+2,5 ($\pm 0,2$)

^a Ref.¹⁸⁵

Medidas de fluorescência permitiram a obtenção de altos valores de constantes de ligação para as Chls *b* em todos os sistemas micelares avaliados, seguindo a tendência geral: F-127 > P-123 > Tween 80 > Tween 20, em todos os casos os valores de Pheo *b* foram superiores aos de Mg-Chl *b*. A mesma tendência é consistente com os resultados de Pheo *a* e Mg-Chl *a* reportados na literatura.¹⁷⁷ Isso se justifica devido à maior hidrofobicidade da Pheo *b* em relação a Mg-Chl *b*, conforme indicado pelos valores de $\log K_p$, uma vez que os compostos hidrofóbicos tendem a interagir mais fortemente com os microambientes hidrofóbicos da micela. É possível notar que os valores de K_b são significativamente mais altos nos sistemas de surfactantes Pluronic em comparação aos sistemas de Tween.

Medidas de diâmetros hidrodinâmicos dos sistemas micelares possibilitaram determinar o tamanho de 20 nm para micelas de F-127, 10,2 nm para Tween 80 e 7,4 nm

para Tween 20 (Figura 69 C, D e E e Tabela 6); logo, todos os sistemas micelares aqui apresentados são classificados como sistemas coloidais nanoestruturados. Os tamanhos micelares seguem a tendência F-127 > Tween 80 > Tween 20, que é a mesma tendência observada para os valores de K_b . Os tamanhos relativamente pequenos das micelas de Tween tornam esses colóides menos adequados para acomodar grandes moléculas hidrofóbicas, explicando assim a menor magnitude das interações com as duas Chls em comparação com as micelas de Pluronic. As medidas de potencial zeta de surfactantes são consistentes com micelas do tipo não iônico.

4.3.3. Localização relativa em micelas não iônicas: estudos de supressão de fluorescência

Medidas de supressão de fluorescência permitiram estimar a localização relativa dessas Chls B em sistemas micelares, sendo a localização outro fator altamente significativo frente às interações específicas, estabilização e liberação molecular. A posição da Chl dentro da micela foi estimada por supressão do estado excitado Chl* promovido por supressores específicos, neste caso, o íon iodeto foi empregado como um supressor aquossolúvel que não pode penetrar profundamente nas regiões hidrofóbicas de surfactantes não-iônicos. O perfil espectral de Mg-Chl *b* em função da concentração de iodeto nas soluções F-127 e Tween 20 é mostrado na Figura 70 e o gráfico Stern-Volmer correspondente para todos os sistemas investigados é apresentado na Figura 71. Os valores de K_{SV} determinados usando a Eq. (4) estão listados na Tabela 7.

Figura 70. Espectros de fluorescência de Mg-Chl *b* formulados em (A) F-127 e (B) Tween 20, em função da mesma concentração de íons iodeto. $[\text{Chl}] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Para a Mg-Chl *b* $\lambda_{\text{exc}} = 461 \text{ nm}$ e para a Pheo *b* $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$. A seta indica a diminuição da intensidade à medida que o iodeto é adicionado.

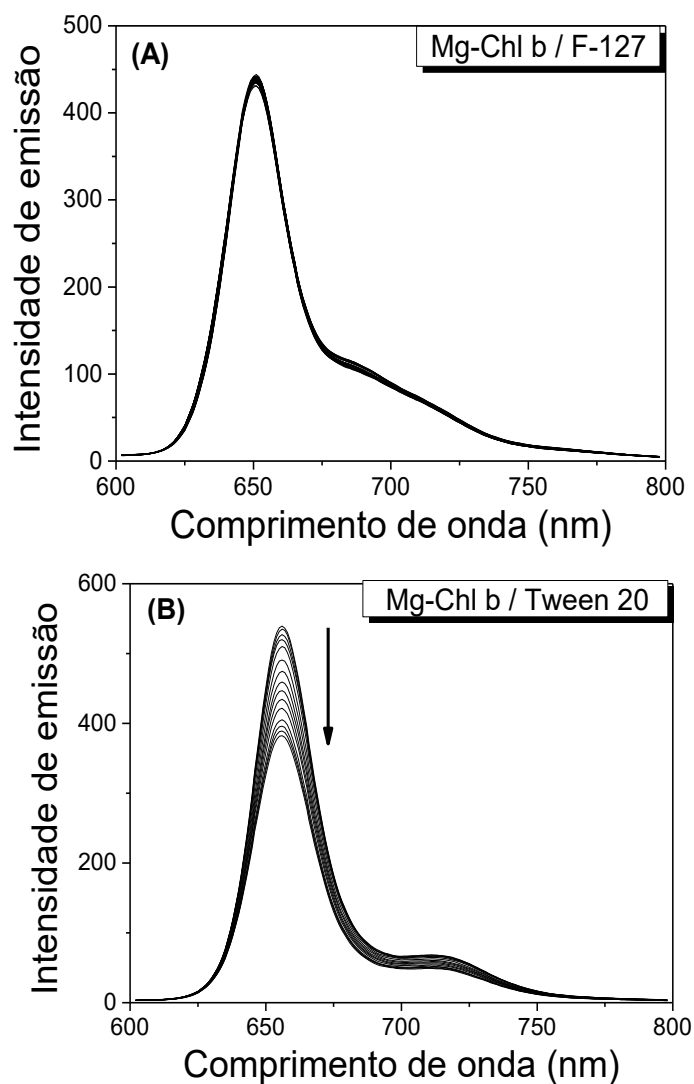


Figura 71. Gráficos de Stern-Volmer de supressão de fluorescência para: (A) Mg-Chl *b* (B) Pheo *b* nos sistemas investigados de micelas não iônicas (1% m / v). [Chl] = $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, T = 25,0 ° C, pH = 7,25 e [NaCl] = 0,10 mol L⁻¹.

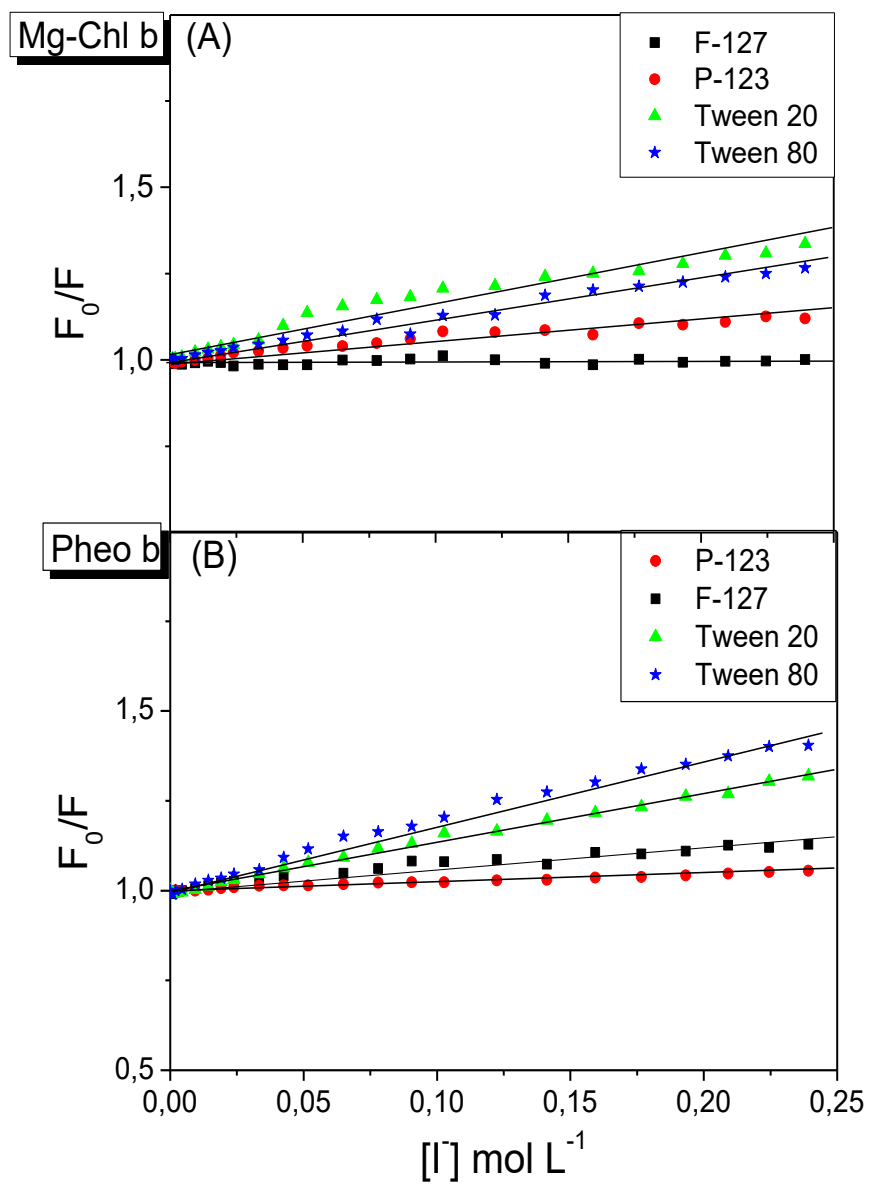


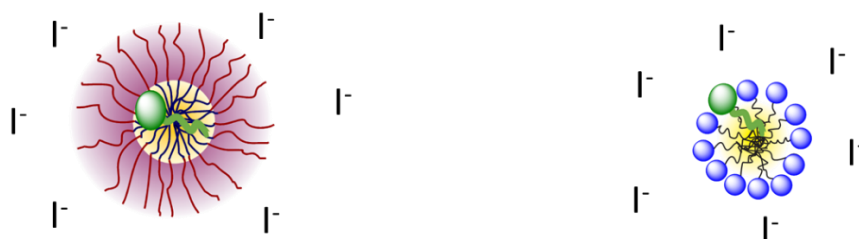
Tabela 7. Constantes de Stern-Volmer para Mg-Chl *b* e Pheo *b* em sistemas micelares. [Chl] = $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25,0 \text{ }^\circ \text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Para a Mg-Chl *b* $\lambda_{\text{exc}} = 461 \text{ nm}$ e para a Pheo *b* $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$.

Micela	K _{sv} (10 ³ L mol ⁻¹)	
	Mg-Chl <i>b</i>	Pheo <i>b</i>
F-127 ^a	0,03 ± 0,01	0,53 ± 0,02
P-123 ^b	0,53 ± 0,02	0,22 ± 0,01
Tween 80 ^c	1,06 ± 0,02	1,64 ± 0,04
Tween 20 ^d	1,23 ± 0,05	1,30 ± 0,02

[Surfactante]=1% (w/v), ou seja, ^a[F-127]= $7,94 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ^b[P-123]= $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ^c[Tween 80]= $8,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ^d[Tween 20]= $8,96 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

As constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) foram maiores nas micelas de Tween do que nas micelas de Pluronic, para as duas Chls, indicando que as Chls são mais acessíveis ao supressor solúvel em água nos sistemas de Tween do que nos de Pluronic. Portanto, as Chls estão localizadas mais internamente em Pluronic do que em Tween, com uma notável diferença entre essas micelas. Os sistemas Pluronic dificultam o acesso do íon iodeto às moléculas de Chl, uma vez que as mesmas estão protegidas dentro da micela. Para as micelas de Tween, as moléculas de água e iodeto podem atingir o tamanho menor do núcleo das micelas, especialmente para o Tween 20 (ilustração na Figura 72). Além disso, o tamanho de 3,5 nm da clorofila sugere uma localização do tipo co-surfactante, ou seja, a clorofila se localiza como um surfactante no sistema micelar. Para Pheo *b*, o menor K_{sv} do P-123 em comparação ao F-127 é reflexo do ambiente mais hidrofóbico do P-123 com localização mais interna do FS dentro da micela devido aos segmentos menores de óxido de etileno (EO₂₀ para P-123 enquanto EO₁₀₆ para F-127, conforme ilustrado na Figura 32).

Figura 72. Representação ilustrativa da localização de clorofilas *b* em sistemas modelo de micelas não-iônicas.



Um comportamento inverso foi observado para Mg-Chl *b*, com menor valor de K_{SV} encontrado no F-127. Uma explicação possível para a diferença é que o Mg-Chl *b* sofre alterações de orientação nas micelas de F-127, o que leva a uma menor supressão de energia por íons iodeto.

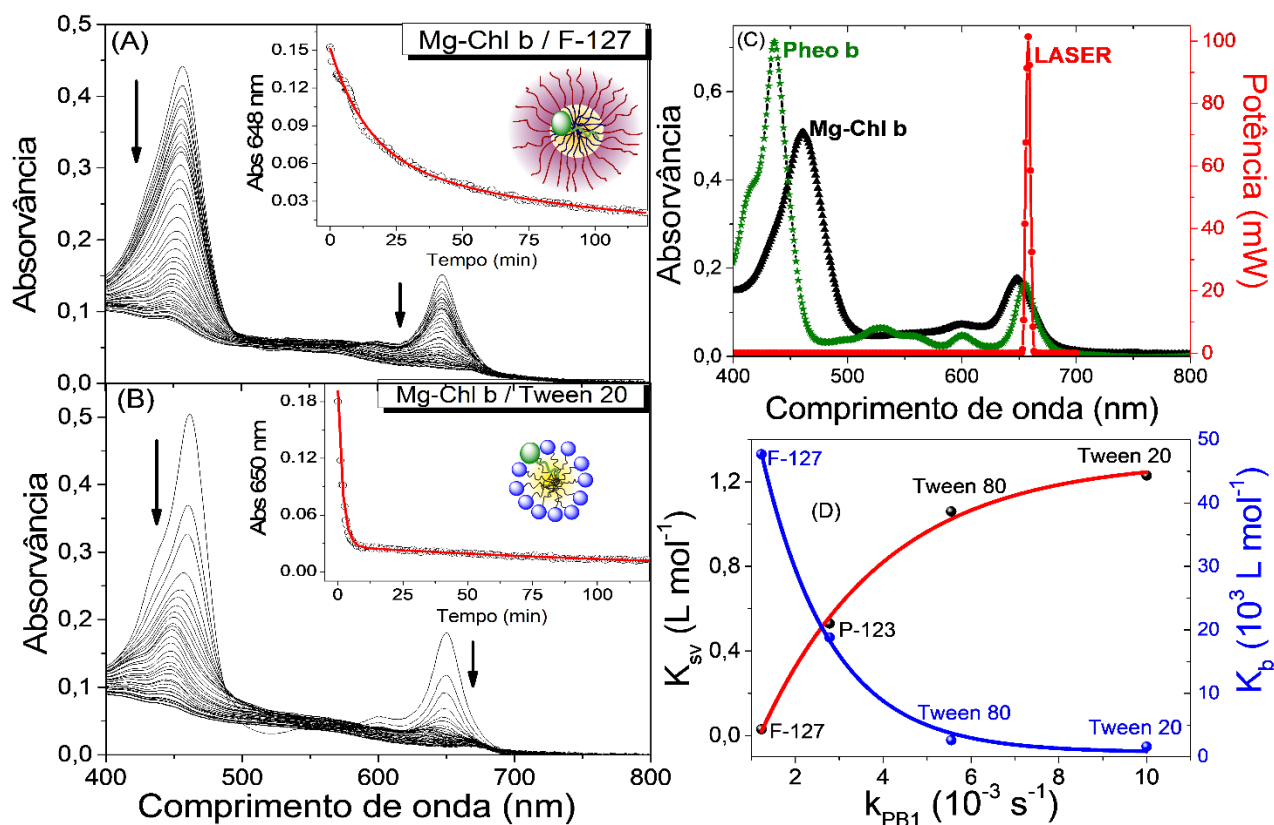
Finalmente, baseado nos dados obtidos de K_b (estudos de ligação) e K_{sv} (estudos de supressão de fluorescência) é possível inferir consistentemente que tais Chls interagem e estão localizadas diferencialmente nesses sistemas. Tais fatos reportados aumentam substancialmente a possibilidade de que uma dessas formulações possa ter as condições de magnitude de interação e localização ideais para aplicações fotodinâmicas e fotoquímicas.

4.3.4. Fotoestabilidade em micelas não iônicas

Para investigar a fotoestabilidade das clorofilas nos sistemas nanoestruturados baseados em surfactantes Pluronic e Tween, foram realizados estudos de monitoramento do fotobranqueamento, ou seja, a fotodegradação das clorofilas frente à radiação luminosa em 658 nm. A cinética de fotodegradação das Mg-Chl *b* e Pheo *b* foi monitorada por espectrofotometria de absorção visível em sistemas micelares não iônicos sob irradiação contínua por LASER (Figura 73). Além disso, a Figura 73 mostra a sobreposição de absorção espectral e a cinética de fotodegradação da Mg-Chl *b* nos sistemas F-127 e Tween 20. A Mg-Chl *b* apresenta fotodegradação em todos os meios avaliados, enquanto a Pheo *b* é totalmente fotoestável (resultados não mostrado), consistente com os resultados encontrados para as clorofilas *a*.¹⁷⁷ Esses dados demonstram um enorme efeito do magnésio na fotoestabilidade de Chls. Tal notável

efeito provavelmente vem do aumento da rigidez da estrutura molecular conferida pela presença do metal. Além disso, a posição axial lábil no átomo de magnésio favorece a interação / coordenação com o oxigênio molecular, que ao receber energia ou elétrons das clorofilas para geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), incluindo o oxigênio singlete, pode tornar as clorofilas mais suscetíveis aos ataques oxidativos devido à maior proximidade EROS-Chls por efeito espaço-temporal^{131,186,187}.

Figura 73. Sobreposição espectral de absorção do fotobranqueamento de Mg-Chl *b* em: (A) F-127 e (B) Tween 20. A cinética é ilustrada nas respectivas inserções. (C) Espectro do LASER a 658 nm sobreposto aos espectros de absorção de Mg-Chl *b* e Pheo *b*. (D) Relação entre a constante cinética de fotodegradação e as constantes de Stern-Volmer e as constantes de ligação para Mg-Chl *b* em sistemas micelares não iônicos. [Mg-Chl *b*] = $4,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, T = 25,0 ° C, pH = 7,25 e [NaCl] = 0,10 mol L⁻¹.



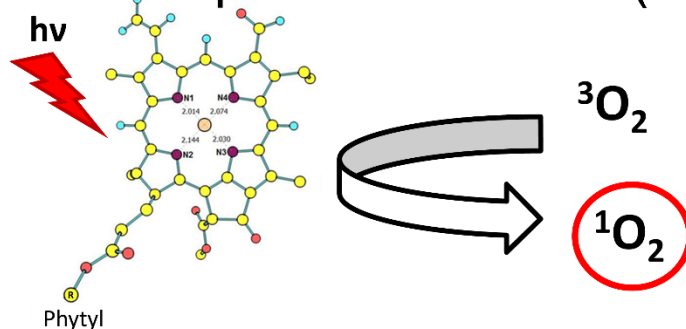
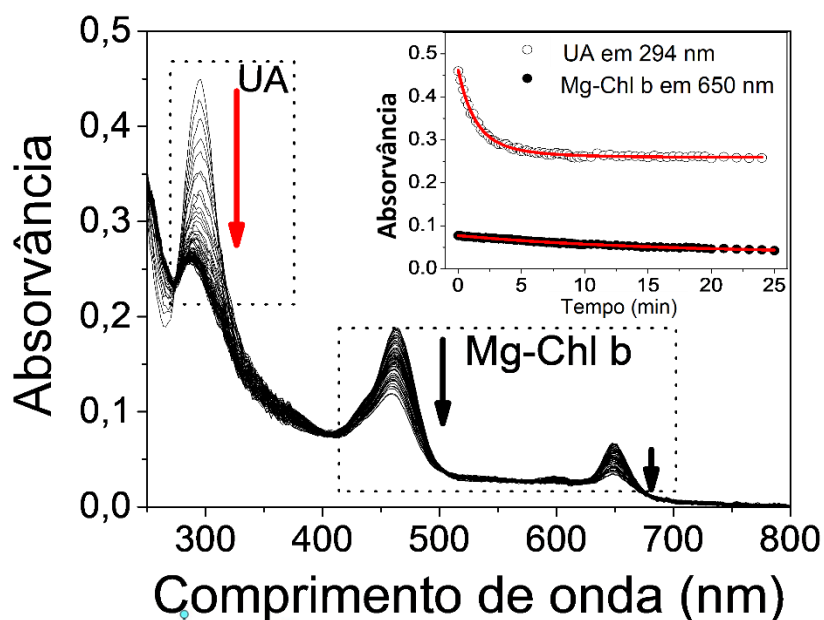
A cinética de fotodegradação da Mg-Chl *b* apresenta perfil do tipo bi-exponencial, permitindo o cálculo das constantes de velocidade para a primeira etapa (k_{PB1}) em direção a um intermediário, seguido de uma segunda etapa (k_{PB2}) para uma reação de duas etapas consecutivas. A análise de Mg-Chl *b* foi centrada na primeira etapa de fotobranqueamento, k_{PB1} , que mostrou a seguinte tendência: Tween 20 > Tween 80 > P-123 > F-127. Os valores de k_{PB1} estão diretamente correlacionados aos valores de K_{sv} nos sistemas micelares (Tabela 7), ou seja, o processo de fotodegradação é atenuado à medida que a Mg-Chl *b* é posicionada mais profundamente dentro do núcleo da micela. Tal impressionante efeito de fotoestabilização e/ou fotoproteção pode ser justificado por dois caminhos principais: (1) os agentes oxidativos não conseguem alcançar facilmente

as moléculas de Chl dentro da micela e (2) o microambiente hidrofóbico pode causar um efeito estabilizante inibindo na fotodegradação das clorofilas. Uma análise semelhante pode ser realizada para k_{PB1} e as constantes de ligação para Mg-Chl *b* nas micelas, uma vez que os efeitos de ligação (K_b) também podem refletir na localização das Chls. Quanto maior a interação e mais internamente localizada, maior a fotoestabilidade do Mg-Chl *b*. Em resumo, esses resultados evidenciam a elevada significância da localização e da ligação da Mg-Chl *b* aos surfactantes não iônicos como sistemas eficientes para controlar os processos de fotodegradação, assim, permitindo a fotoestabilização / fotoproteção das clorofilas possibilitando a manutenção da forma ativa para aplicações fotoquímicas.

4.3.5. *Mg-Chl b e Pheo b como geradores de oxigênio singleto*

Embora já bem reportado que as Chls *a* apresentem um apreciável rendimento quântico de oxigênio singleto ($\Phi_{\Delta}^1O_2$)^{153,164,188} pouco se sabe sobre as clorofilas do tipo *b*. Nesse sentido, foram determinados $\Phi_{\Delta}^1O_2$ das clorofilas Mg-Chl *b* e Pheo *b* usando o ácido úrico (UA) como sonda química para quantificação de oxigênio singleto sob iluminação constante dos Chls^{164,165}. A Figura 74 mostra um exemplo da degradação do UA devido à formação de 1O_2 .

Figura 74. Variações de absorvância de UA e Mg-Chl *b* sob iluminação com clorofila (LASER, 658 nm) em etanol, a 25 °C. As setas mostram o comportamento da absorvância durante a irradiação. Inserção: cinética da degradação da UA a 294 nm e fotodegradação de Mg-Chl *b* a 650 nm.



Clorofilas B como potentes geradores de oxigênio singlete

Mg-Chl b $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2 = 0,80$	Pheo b $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2 = 0,40$
em etanol	em etanol

As eficiências fotodinâmicas química (γ_{Δ}) foram obtidas (através Eq. 19 e 20)¹⁶⁴ e foram relacionadas a um $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ padrão (bem definido pela literatura: Pheid *a*) possibilitando a obtenção dos $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ (através da Eq. 21)¹⁶⁴ da clorofila *b*.

$$N_{Abs} = \frac{1}{Na \cdot h \cdot c} \int_0^t \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P(\lambda) \cdot I_0 (1 - 10^{-bc\varepsilon}) e^{-k_{FB}t} d\lambda dt \quad Eq. 19$$

na qual, Na: número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$); h: constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$); c: velocidade da luz no vácuo ($2,997 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$); $P(\lambda)$: potência do LED em cada frequência do espectro eletromagnético; b: caminho ótico (1,00 cm); c: concentração molar do FS; ε : coeficiente de absorvidade molar do FS; k_{FB} : constante de velocidade de fotobranqueamento do FS; e t: tempo.

$$\gamma_{\Delta} = \frac{k_1}{N_{abs}} \quad Eq. 20$$

$$\phi_{\Delta} = \frac{\phi_{\Delta}^{Pheid(a)}}{\gamma_{\Delta}^{Pheid(a)}} \gamma_{\Delta} \quad Eq. 21$$

onde, γ_{Δ} : Eficiência fotodinâmica química; k_1 : Primeira constante de velocidade obtida por ajuste de decaimento biexponencial; $\phi_{\Delta}^1 O_2^{Pheid(a)}$: Rendimento quântico de geração de oxigênio singleto do padrão Pheid *a* (Feoforbídeo *a*).

Foram obtidos altos valores de rendimento quântico de oxigênio singleto para Mg-Chl *b* ($\Phi_{\Delta}^1 O_2 = 0,80$) e Pheo *b* ($\Phi_{\Delta}^1 O_2 = 0,40$) em etanol. Esse resultado é o oposto aos obtidos para as Chls *a* em etanol, que mostraram um maior rendimento quântico para a clorofila desmetalada (Mg-Chl, $\Phi_{\Delta}^1 O_2 = 0,47$ e Pheo *a*, $\Phi_{\Delta}^1 O_2 = 0,73$)¹⁶⁴. Kupper et al. encontraram a mesma inversão entre Chls *a* e Chls *b*, analisando a eficiência da formação de oxigênio singleto em acetona, usando Mg-Chl *a* como referência e medidas da fosforescência de oxigênio singleto a 1270 nm.¹⁸⁹ Os valores de $\Phi_{\Delta}^1 O_2$ para Chls *a* já são bem conhecidos e o maior $\Phi_{\Delta}^1 O_2$ para Pheo *a* está relacionado à diminuição no cruzamento intersistema (ISC) para Mg-Chl *a*, o que leva a uma diminuição na geração de oxigênio singleto.¹⁸⁰ Por outro lado, a substituição do grupo metil pelo grupo formil na clorofila metalalada possibilita o aumento do rendimento quântico do cruzamento entre sistemas (CIS). No etanol, os valores de Φ_{ISC} são 0,6 para Mg-Chl *a* e 0,85 para Mg-Chl *b*.¹⁹⁰ Assim, a presença do grupo formil na Mg-Chl *b* deve favorecer o acoplamento spin-órbita, aumentando o ISC, que aumenta o tempo de vida no estado tripleto excitado, e, portanto, consistente com os valores de rendimento quântico de oxigênio singleto obtidos. Em resumo, as propriedades fotofísicas das clorofilas dependem da presença do metal central e do substituinte no anel clorínico. Esse ponto interessante reforça a necessidade de uma avaliação detalhada das propriedades fotofísicas de Chls *b*.

É importante destacar que o presente estudo, publicado em 2019, já motivou a comunidade científica a investigar os motivos pelos quais as clorofilas *b* apresentam maior rendimento quântico de oxigênio singleto do que as clorofilas *a*. Assim, baseado em estudos computacionais, foi reportado que, de fato, a presença do grupo formil na clorofila *b* aumenta o tempo de vida do estado tripleto excitado, e, por isso, causa grande impacto na geração de oxigênio singleto.¹⁹¹ Dessa forma, os dados de cálculos computacionais do estado tripleto excitado fornecem ainda mais consistência aos dados reportados nesse trabalho.

4.3.6. Clorofila b em complexos supramoleculares polímero/surfactante: Potentes enzimas artificiais fotocatalisadoras

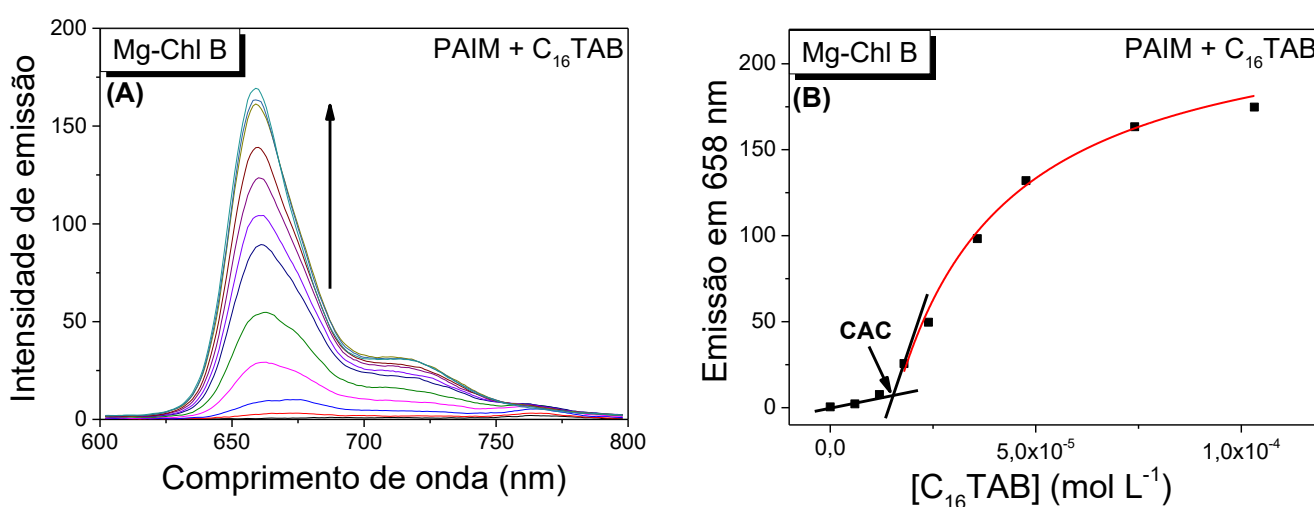
Baseado na caracterização detalhada de interação, localização, propriedades fotofísicas e fotoestabilizantes das Clorofilas *b* em meio homogêneo e nanoestruturado de micelas não-iônicas, teve-se grande interesse em estudar a Mg-Chl *b* em complexos supramoleculares polímero/surfactante, visando obter enzimas artificiais que possam atuar simultaneamente como catalisadores nucleofílicos ou básicos-gerais, e também como potentes fotocatalisadores frente a reações de oxidação de moléculas orgânicas contendo grupos nucleofílicos. Tal interesse está baseado no altíssimo $\phi_{\Delta^1O_2}$, altamente eletrofílico, obtido para essa clorofila (0,80, isto é, 80% de toda energia luminosa absorvida é convertida em oxigênio singleto). Assim, permitindo desenvolver um sistema catalítico avançado que possa atuar simultaneamente em múltiplas reações, como na degradação de poluentes, pesticidas e corantes (moléculas altamente insaturadas).

Nesse sentido, foram realizados estudos de ligação da Mg-Chl *b* em complexos supramoleculares polímero/surfactante, PAIM⁻/C₁₆TAB e PAIM⁻/SB3-16 representando os complexos baseados em surfactantes catiônicos e zwitteriônicos, respectivamente. Na sequência, explorando tais sistemas, foram realizados estudos de rendimentos quânticos de fluorescência, estabilidade no escuro, fotoestabilidade, e ainda a aplicação na fotocatalise de reações de oxidação frente a dois substratos-modelo, a vitamina C (substrato hidrofílico) e o trans-estilbeno (substrato altamente hidrofóbico).

Medidas de fluorescência foram realizadas monitorando a luminescência da Mg-Chl *b* na presença de PAIM⁻ em função da concentração do surfactante catiônico C₁₆TAB.

A sobreposição dos espectros de fluorescência obtidos da Mg-Chl *b* na presença de PAIM⁻, bem como a curva de ligação em 658nm em função da concentração do surfactante catiônico C₁₆TAB são apresentadas na Figura 75.

Figura 75. Sobreposição dos espectros de fluorescência obtidos da Mg-Chl *b* na presença de PAIM⁻, bem como a curva de ligação em 658nm em função da concentração do surfactante catiônico C₁₆TAB. [Mg-Chl *b*]= $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, [PAIM]= $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) e 25,0°C.

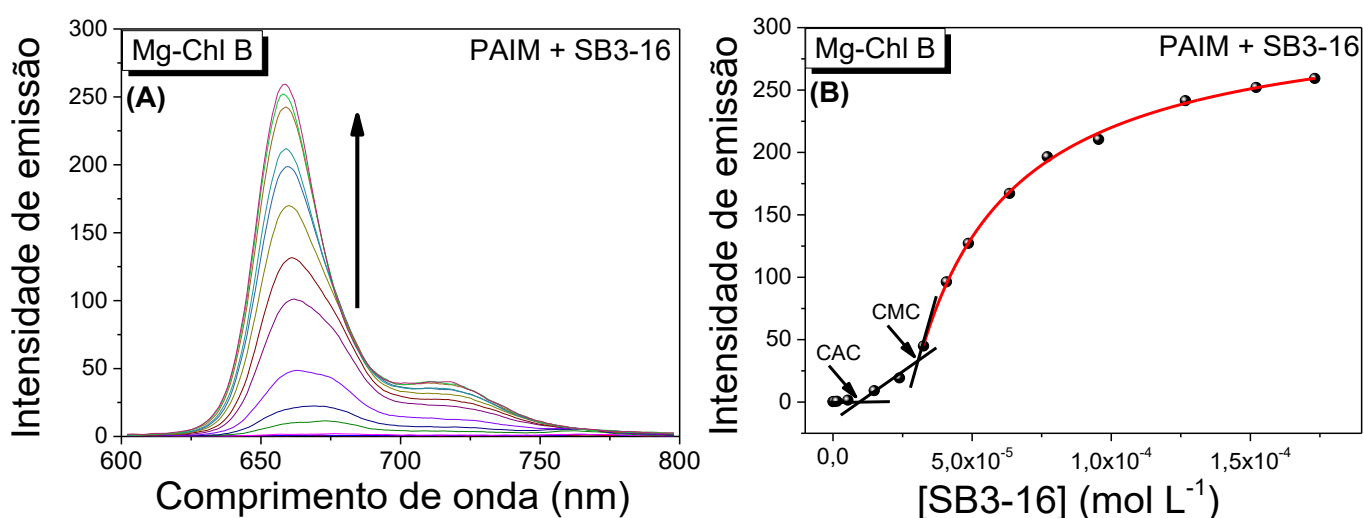


Os resultados obtidos mostram significativo incremento da fluorescência em função da concentração do surfactante C₁₆TAB. É possível notar que a Mg-Chl *b* em solução de PAIM⁻ não apresenta fluorescência, o que indica fortemente a auto-agregação das moléculas de clorofilas em tal sistema, devido ao processo de autossupressão do estado excitado. Ainda, tal resultado é consistente com os resultados prévios obtidos através da sonda Pireno que mostram que os agregados formados por PAIM⁻ são sistemas altamente hidratados.

É possível notar na Figura 75B que a medida que a concentração do surfactante aumenta, tem-se um modesto incremento da fluorescência e depois de uma concentração crítica (atribuída como a CAC), tem-se o aumento intenso da fluorescência que representa a ligação da Mg-Chl *b* na sua forma monomérica nos complexos supramoleculares polímero/surfactante.

Na sequência, a sobreposição dos espectros de fluorescência obtidos da Mg-Chl *b* na presença de PAIM⁻, bem como a curva de ligação em 658nm em função da concentração do surfactante catiônico SB3-16 são apresentadas na Figura 76.

Figura 76. Sobreposição dos espectros de fluorescência obtidos da Mg-Chl *b* na presença de PAIM⁻, bem como a curva de ligação em 658nm em função da concentração do surfactante catiônico C₁₆TAB. [Mg-Chl *b*]=5,0x10⁻⁷ mol L⁻¹, [PAIM]=2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) e 25,0°C.



Similarmente ao sistema em PAIM⁻/C₁₆TA⁺, a medida com que a concentração do surfactante aumenta, tem-se um modesto incremento da fluorescência, contudo, depois de uma concentração crítica (atribuída como a CAC), tem-se um moderado aumento (Figura 76B), e, somente após a CMC, apresenta um intenso incremento da fluorescência. É importante destacar que o valor de CAC obtido a partir destes foi 1,1x10⁻⁵ mol L⁻¹, sendo consistente com o valor obtido pelo método PBFI⁴ (1,2x10⁻⁵ mol L⁻¹).

Os dados apresentados na Figura 75B e 76B permitiram determinar a constante de ligação (K_b) pelo ajuste da isoterma de Langmuir. Os resultados de K_b obtidos foram: $K_b = 8,7 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ para a ligação da Mg-Chl *b* aos complexos PAIM⁻/C₁₆TA⁺; e $K_b = 21,9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ para a ligação da Mg-Chl *b* aos complexos PAIM⁻/SB3-16. Tais altíssimas constantes de ligação mostram em termos quantitativos a magnitude energética de interação entre a Mg-Chl *b* e os complexos supramoleculares polímero/surfactante. Em particular, é importante destacar a maior constante de ligação da Mg-Chl *b* aos

complexos PAIM⁻/SB3-16, em relação aos complexos PAIM⁻/C₁₆TAB. Em resumo: K_b PAIM⁻/SB3-16 > K_b PAIM⁻/C₁₆TAB⁺.

Os resultados dos rendimentos de fluorescência obtidos para a Mg-Chl B nos sistemas investigados são listados na Tabela 8.

Tabela 8. Rendimentos quânticos de fluorescência da Mg-Chl B nos complexos supramoleculares PAIM/SB3-16, PAIM/C₁₆TAB. Os valores foram obtidos nas concentrações dos patamares de fluorescência máxima. [Mg-Chl *b*]=5,0x10⁻⁷ mol L⁻¹, [PAIM]=2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) e 25,0°C.

Mg-Chl <i>b</i>	Φ_F
PAIM / SB3-16 ^a	0,06
PAIM / C ₁₆ TAB ^b	0,05
PAIM	~0
Tampão Tris	~0

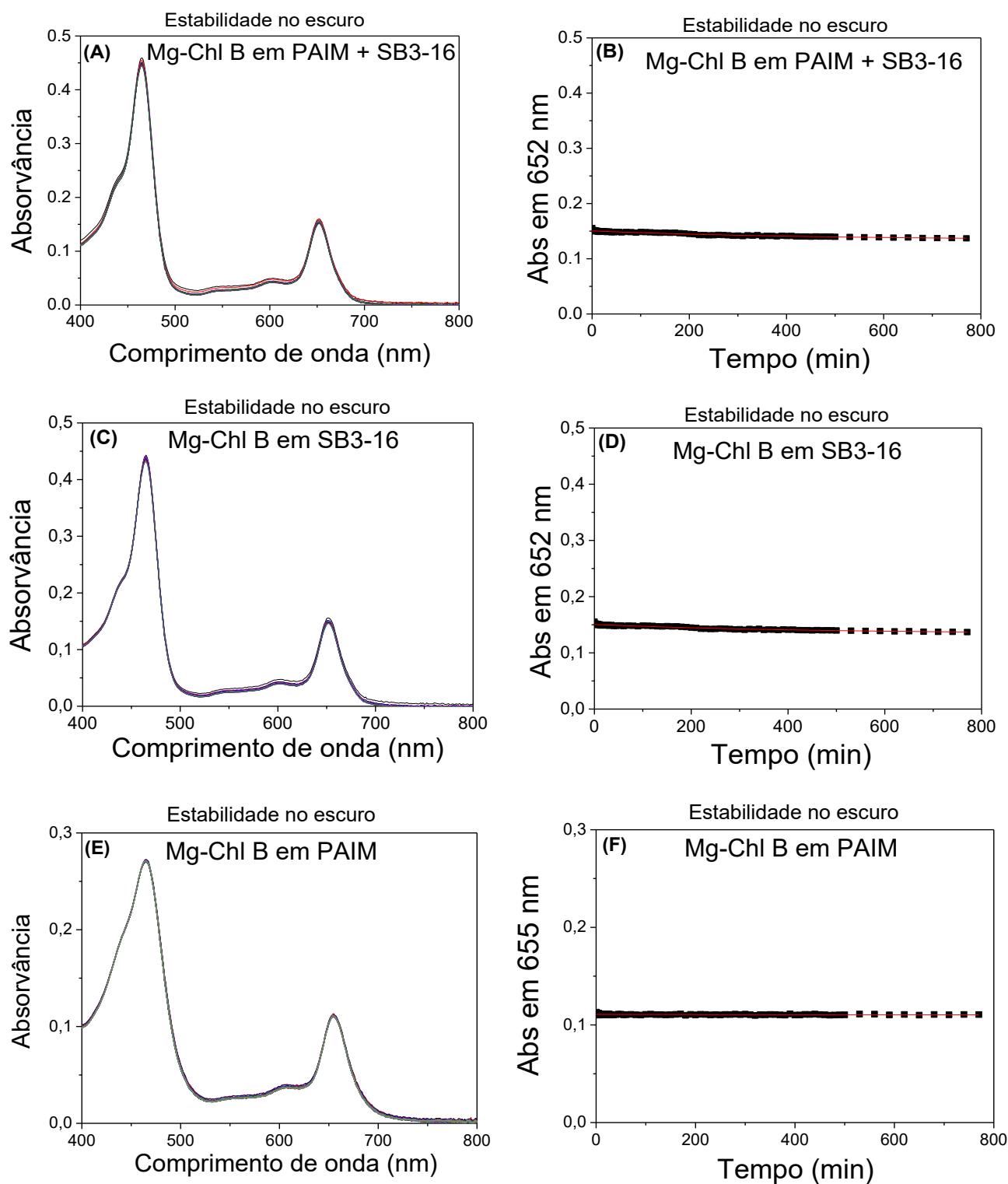
^a[SB3-16]= 1,0x10⁻⁴; e ^b[C₁₆TAB]=1,2x10⁻³ mol L⁻¹,

Os rendimentos quânticos de fluorescência expressam em termos quantitativos o aumento de fluorescência da Mg-Chl *b* nos complexos supramoleculares polímero/surfactante em relação ao PAIM⁻ ou Tampão Tris. Ainda, os valores obtidos são consistentes como os valores obtidos em etanol (Φ_F EtOH = 0,06). Nesse sentido, considerando que é bem reportado que o etanol é um solvente que monomeriza clorofilas,^{177,181} não permitindo a auto-agregação, pode-se inferir que valores de rendimentos quânticos de fluorescência similares aumentam a confiabilidade da monomerização da clorofila *b* nos complexos supramoleculares polímero/surfactante.

Para estudar em detalhe a estabilidade das clorofilas e a manutenção da monomerização foram realizadas cinéticas de estabilidade no escuro da Mg-Chl *b* incorporada em complexos PAIM⁻/SB3-16 e PAIM⁻/C₁₆TAB (nas condições do patamar de ligação), bem como em agregados de PAIM e micelas de SB3-16 e C₁₆TAB como

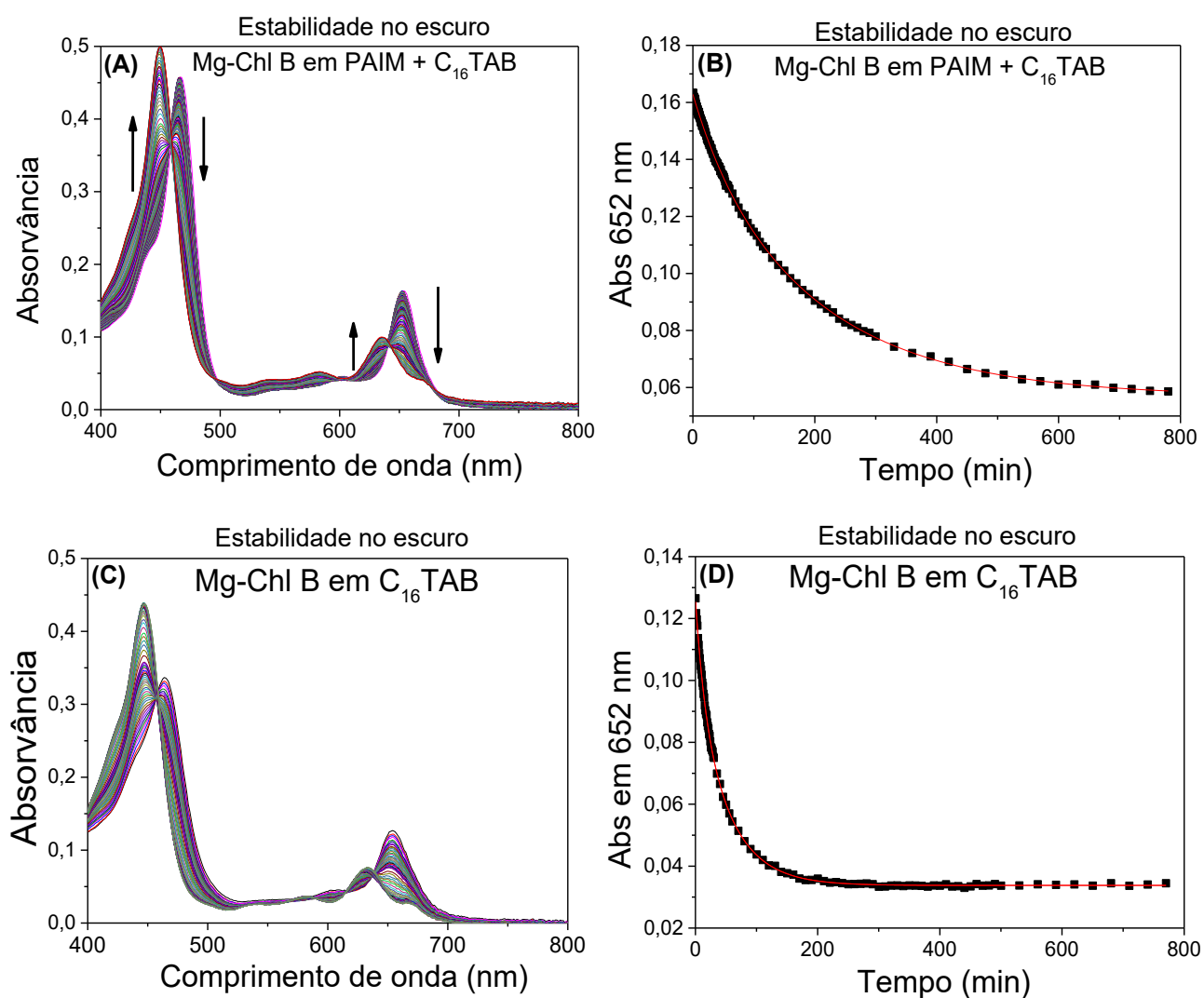
comparativo. Primeiramente, a sobreposição espectral cinética de absorção e as cinéticas de estabilidade no escuro da Mg-Chl *b* em PAIM/SB3-16, SB3-16 e PAIM^r são apresentadas na Figura 77.

Figura 77. Sobreposição espectral cinética de absorção Mg-Chl *b* em (A) PAIM/SB3-16, (C) SB3-16 e (E) PAIM. Cinéticas de estabilidade no escuro da Mg-Chl *b* em (B) PAIM/SB3-16, (D) PAIM e (F) SB3-16. $[Mg-Chl\ b]=5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, $[SB3-16]=1,0 \times 10^{-4}$, $[PAIM]=2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) em 25,0°C.



Os resultados apresentados na Figura 77 mostram completa estabilidade da Mg-Chl *b* monomerizada em complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16 e micelas de SB3-16, e, também, completa estabilidade da clorofila *b* auto agregada em PAIM⁻ (constatação da auto-agregação se baseia na ausência de fluorescência, espectro alargado e menor absorvidade molar). Por outro lado, as cinéticas de estabilidade da clorofila *b* em complexos supramoleculares PAIM⁻/C₁₆TAB e micelas de C₁₆TAB mostram perfil completamente distinto, demonstrando alta instabilidade no escuro (Figura 78).

Figura 78. Sobreposição espectral cinética de absorção Mg-Chl *b* em (A) PAIM⁻/C₁₆TA⁺, (C) C₁₆TAB. Cinéticas de estabilidade no escuro da Mg-Chl *b* em (B) PAIM⁻/SB3-16, (D) PAIM⁻. [Mg-Chl *b*]= $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ [C₁₆TAB]= $1,2 \times 10^{-3}$, [PAIM]= $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) em 25,0°C.

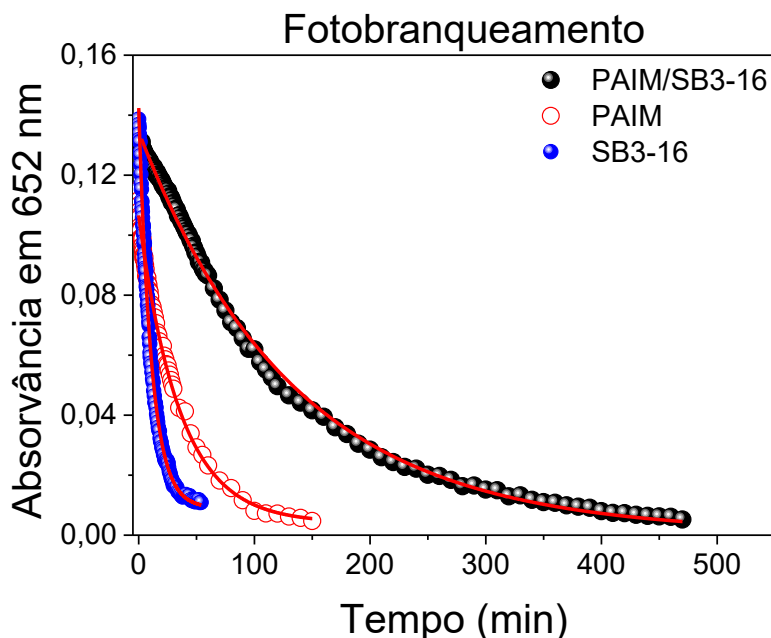


O processo de instabilidade no escuro, para este caso, pode ser atribuído ao processo de auto-agregação, formando um auto-agregado específico. Tal atribuição é consistente por ser um processo comum reportado na literatura quando o sistema não é eficiente para estabilizar e monomerizar porfirinas.^{178,192-194} Ainda, tal proposição se fortalece devido à intensa redução da fluorescência após o final da cinética de estabilidade no escuro, e, também, ao fato de que o processo acontece em micelas de C₁₆TAB, sendo conhecido que as micelas de C₁₆TAB são pequenas, 2-4 nm, potencialmente ineficientes para acomodar clorofilas *b* (tamanho 3,5 nm). Contudo, é relevante notar para tal processo em complexos supramoleculares PAIM⁻/C₁₆TAB foi obtida a constante de velocidade de $1,03 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ enquanto que em micelas de C₁₆TAB foi obtida constante de velocidade de $4,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, ou seja, apesar de também instável, o complexo supramolecular PAIM⁻/C₁₆TA⁺ inibe tal processo indesejado em aproximadamente 4x, demonstrando seus efeitos específicos supramoleculares. De qualquer modo, sistemas instáveis ou ineficientes na estabilização da clorofila *b* no escuro não são interessantes para aplicações fotocatalíticas. Portanto, na sequência deste trabalho, serão investigados apenas os complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16, em conjunto com os sistemas em PAIM⁻ e SB3-16 para comparação e validação dos efeitos supramoleculares.

Reações de fotobranqueamento em complexos polímero/surfactante

Cinéticas das reações de fotobranqueamento da Mg-Chl *b* em complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16, bem como em PAIM⁻ e SB3-16 como comparação, foram monitoradas por espectrofotometria de absorção eletrônica sob iluminação constante por laser em 658nm (na banda de absorção da Mg-Chl *b*). As cinéticas obtidas para tais reações são apresentadas na Figura 79.

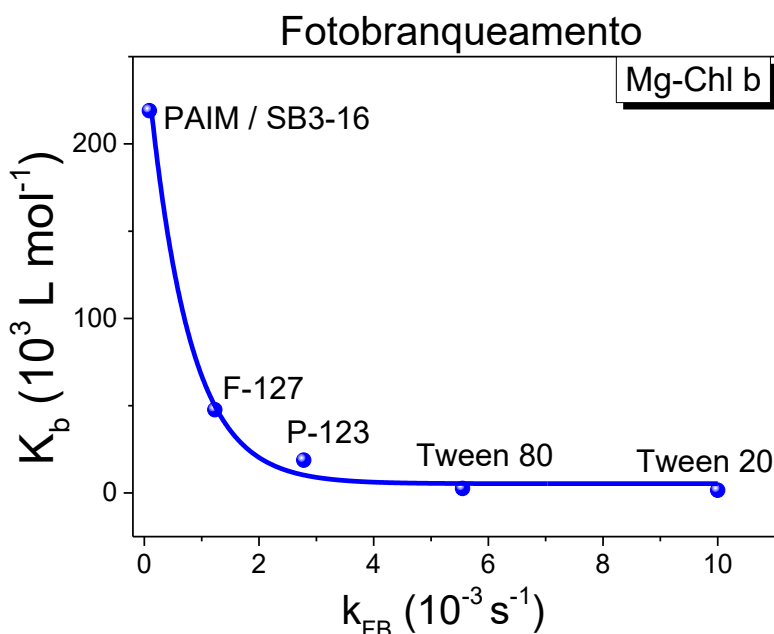
Figura 79. Cinéticas das reações de fotobranqueamento da Mg-Chl *b* em complexos supramoleculares PAIM/SB3-16, PAIM⁻ e SB3-16. [Mg-Chl *b*]= $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, [SB3-16]= $1,0 \times 10^{-4}$, [PAIM]= $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) em 25,0°C.



É possível notar, na Figura 79, que foi obtida a seguinte tendência de fotodegradação da Mg-Chl *b*: SB3-16 > PAIM⁻ > PAIM/SB3-16. Os valores de $t_{1/2}$ obtidos para tais reações foram: 7,6 min em SB3-16; 24,5 min em PAIM; e 133,2 min. Assim, é possível concluir que as reações de fotobranqueamento apresentaram efeitos supramoleculares extraordinários, demonstrando a alta significância da interação supramolecular entre polímero e surfactante frente a fotoestabilização / fotoproteção da Mg-Chl *b*, sendo tal processo altamente almejado para aplicações fotocatalíticas.

Ainda, para comparar os efeitos supramoleculares dos complexos polímero/surfactante com os sistemas modelos de micelas não-iônicas investigados anteriormente, a constante de velocidade observada para a reação de fotobranqueamento da Mg-Chl *b* em função da constante de ligação foi plotada em conjunto com os dados prévios. Assim, na Figura 80, são apresentadas as constantes de ligação da Mg-Chl *b* aos sistemas investigados em função da constante de velocidade observada de fotobranqueamento.

Figura 80. Constantes de ligação da Mg-Chl *b* em complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16 e micelas não-iônicas em função da constante de velocidade observada de fotobranqueamento.



Os dados experimentais mostraram consistentemente que a Mg-Chl *b* apresentou as maiores constantes de ligação frente aos complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16, bem como as menores constantes de velocidade de fotodegradação obtidas. Tais resultados também são consistentes com os valores de diâmetros hidrodinâmicos obtidos, que apresentam a seguinte tendência: PAIM/SB3-16 \gg F-127 > Tween 80 > Tween 20. Baseado nos dados de supressão de fluorescência obtidos para as micelas não-iônicas como modelo, em consistência com os dados de diâmetro hidrodinâmico dos complexos PAIM⁻/SB3-16, é possível inferir que a Mg-Chl *b* possui uma localização ainda mais profunda e nos complexos supramoleculares. Além disso, é importante destacar que tais fatos são reportados neste trabalho como um achado pioneiro que descreve efeitos de localização, ligação e tamanho na fotoestabilização e/ou fotoproteção de clorofilas.

Adicionalmente, tendo em vista que as clorofilas estão ligadas em membranas complexas dos tilacóides nas plantas, e nas plantas tais moléculas são altamente estáveis, esses resultados ilustram em primeira mão a existência de um mecanismo específico que envolve efeitos supramoleculares de sistemas auto-organizados frente a inibição da fotodegradação de clorofilas, e, portanto, abrindo caminhos não trilhados rumo à compreensão dos mecanismos de fotoestabilidade destas moléculas nas plantas.

4.3.7. Aplicação em fotocatalise de reações modelo de oxidação

Na sequência, a alta fotoestabilidade da Mg-Chl *b* em complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico torna tal sistema altamente promissor para aplicações fotocatalíticas via oxigênio singlete. Nesse sentido, para ilustrar a potencialidade catalítica de tais sistemas foram escolhidas duas reações modelos de foto-oxidação, as quais são bem estudadas na literatura, que, reconhecidamente, apresentam alta reatividade frente ao oxigênio singlete. Os substratos empregados foram o ácido ascórbico (Vitamina C) como substrato hidrofílico e o Trans-Estilbeno como substrato hidrofóbico.

Cinéticas das reações de foto-oxidação da Vitamina C (VitC) foram monitoradas através do decréscimo da banda do espectro de absorção eletrônica em 267 nm (referente à Vitamina C). O mecanismo de oxidação da Vitamina C com oxigênio singlete reportado na literatura é apresentado no Esquema 10.¹⁵⁰ Os espectros de absorção eletrônica das cinéticas da reação de foto-oxidação da VitC através da Mg-Chl *b* em PAIM⁻/SB3-16, bem como a curva cinética de decaimento em 267 nm são apresentados na Figura 81 (exemplo).

Esquema 10

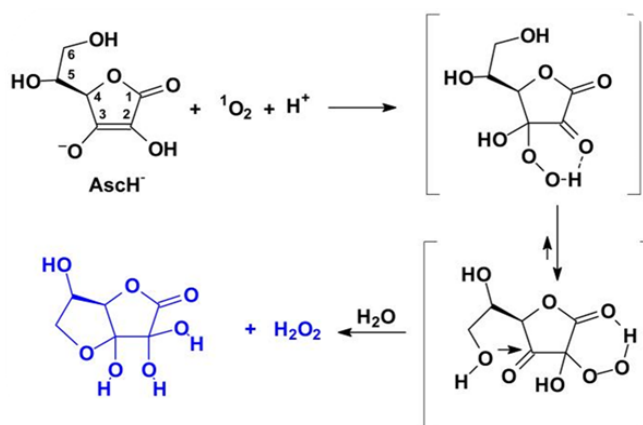
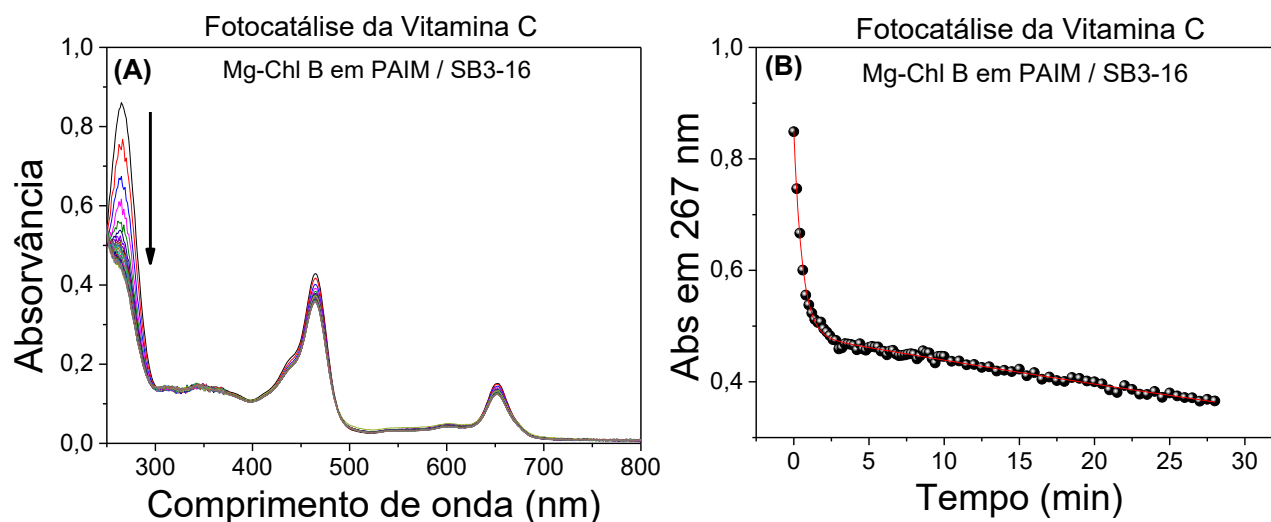


Figura 81. (A) Espectros de absorção eletrônica das cinéticas da reação de foto-oxidação da Vitamina C através da Mg-Chl *b* em PAIM/SB3-16. (B) Curva cinética de decaimento em 267 nm. [Mg-Chl *b*]= $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, [SB3-16]= $1,0 \times 10^{-4}$, [PAIM]= $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) em 25,0°C.

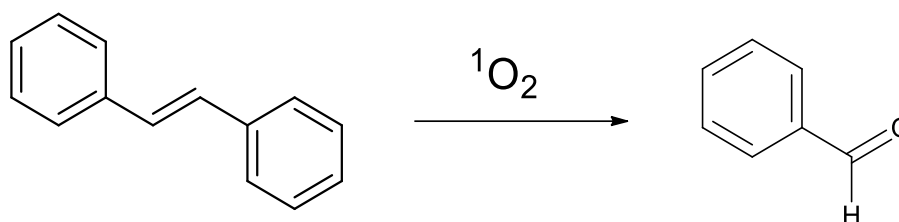


A partir da curva cinética da Figura 81B, foram realizados ajustes de decaimento bi-exponencial. Nesse sentido, as análises foram centradas na primeira constante de velocidade observada (k_1). Foram obtidas constantes de velocidade maiores para as reações fotocatalisadas por Mg-Chl *b* em PAIM/SB3-16 em relação ao sistema em micelas de SB3-16. Os valores de k_1 obtidos foram muito expressivos, sendo: $0,030 \text{ s}^{-1}$ para o sistema em PAIM/SB3-16 e $0,026 \text{ s}^{-1}$ para o sistema em micelas de SB3-16. Logo, os $t_{1/2}$ obtidos foram bem expressivos: 23s para o sistema PAIM/SB3-16 e 26s para o sistema em SB3-16, tais $t_{1/2}$ mostram altíssima atividade fotocatalítica uma vez que a oxidação espontânea em água apresentou $t_{1/2}=837\text{min}$. Assim, foi obtido um incremento de $2,2 \times 10^3$ vezes para o sistema em PAIM/SB3-16 e $1,9 \times 10^3$ para o sistema SB3-16 em relação a oxidação espontânea em água. Pode-se observar na Figura 81A que a Mg-Chl *b* se manteve praticamente fotoestável durante toda a cinética, resultado altamente desejado para as aplicações fotocatalíticas. Ainda, é possível notar que nem todo o substrato foi consumido na Figura 81A, o que não aconteceu no sistema de SB3-16. Tal resultado indica fortemente que apenas parte do substrato hidrofílico é particionado para regiões próximas da clorofila *b*, e, portanto, apenas porcentagem é consumida mais rapidamente.

Para explorar os efeitos de localização da clorofila *b* nos complexos polímero/surfactante zwitteriônico frente às reações de foto-oxidação, foi também

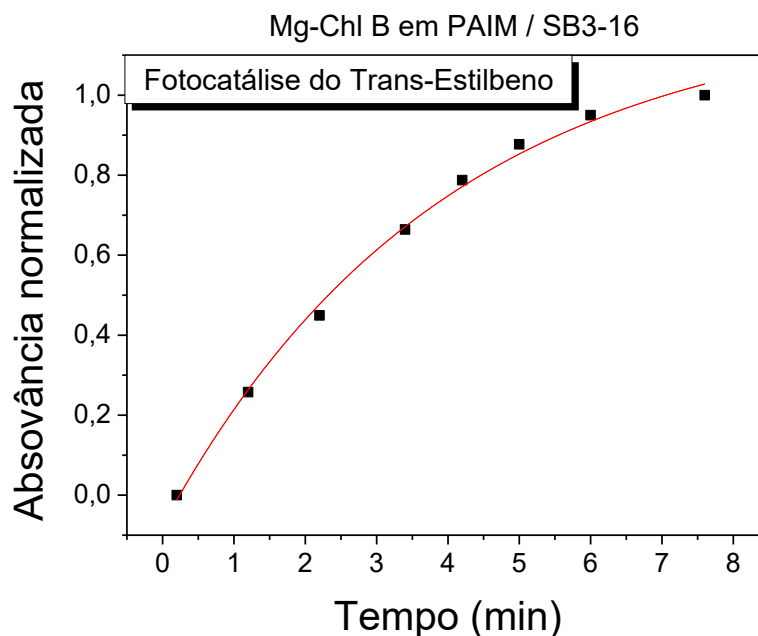
investigada a reação modelo de foto-oxidação do trans-estilbeno, tal reação é bem reportada na literatura, passando por intermediários após o ataque da dupla ligação ao oxigênio singlete, e, finalmente, chegando ao benzaldeído como produto final.¹⁴⁹ O Esquema 11 ilustra a reação global do trans-estilbeno com oxigênio singlete formando benzaldeído.

Esquema 11



Os resultados obtidos da fotocatalise de reações de oxidação do tran-estilbeno foram impressionantes, apesar do substrato ter sido bem solubilizado em micelas de SB3-16 nenhuma variação espectral na banda referente ao benzaldeído foi observada neste sistema. Ou seja, tal reação não se processa em micelas de SB3-16. Por outro lado, as reações são rapidamente observadas na presença de complexos supramoleculares PAIM⁻/SB3-16. A cinética observada de formação do benzaldeído é apresentada na Figura 82.

Figura 82. Cinética de fotocatalise do trans-estilbeno por Mg-Chl *b* em complexos supramoleculares PAIM/SB3-16. [Mg-Chl *b*]= $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, [SB3-16]= $1,0 \times 10^{-4}$, [PAIM]= $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, pH=9,0 (Tampão Tris) em 25,0°C.



A partir da curva cinética da Figura 82 foi possível obter a constante de velocidade observada (k_{obs}) da reação de fotocatalise do trans-estilbeno por Mg-Chl *b* em PAIM/SB3-16. Assim, foi obtido $k_{obs} = 4,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para tal reação e $t_{1/2} = 2,8$ min. Enquanto que nenhuma reação foi obtida no sistema em SB3-16. Assim, os resultados indicam que a clorofila está localizada em regiões profundas e hidrofóbicas do complexo, próximas à localização do trans-estilbeno (molécula altamente hidrofóbica), justificando tal expressiva seletividade frente à reação de foto-oxidação desse substrato. Tal resultado também é consistente com a teoria espaço-temporal mostrando que o tempo e a proximidade entre o oxigênio singlete e o substrato são a essência de tal seletividade catalítica.

É importante destacar que tal reação fotocatalítica é do tipo não-canônica, ou seja, nas presentes condições experimentais, as reações de oxidação espontâneas não são observadas. Ou seja, nesse tipo de reação, não se pode calcular um incremento catalítico, porém, tais reações são ainda mais impactantes tendo em vista que se obtém produtos reacionais em condições adversas e em tempo de obtenção muito curto, nesse caso, com $t_{1/2}$ de apenas 2,8min. Assim, tais resultados são altamente significativos, especialmente

no que se refere às aplicações fotocatalíticas para síntese orgânica, química assimétrica e química fina.

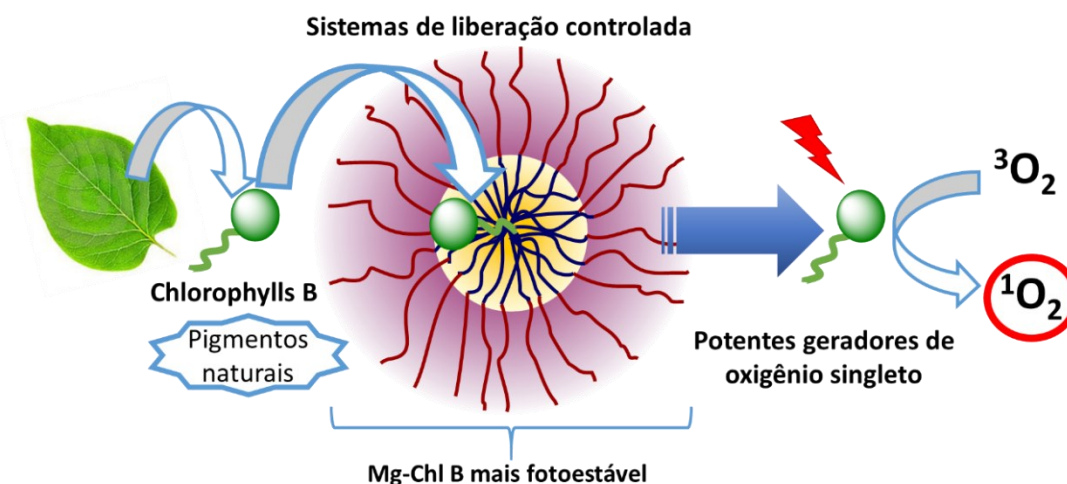
Finalmente, os resultados das reações de desfosforilação do BDNPP catalisadas por complexos PAIM/SB3-16 mantiveram as mesmas constantes de velocidade na presença das clorofilas com simultânea iluminação, logo, os resultados sugerem que os sistemas baseados na associação entre clorofila e complexos supramoleculares polímero/surfactante são altamente promissores frente às múltiplas reações por meio dos mecanismos de catálise nucleofílica ou básica-geral, bem como em reações eletrofílicas fotocatalisadas via oxigênio singleto.

4.3.8. CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados reportados neste trabalho são consistentes e possibilitam identificar a Mg-Chl *b* e a Pheo *b*, pigmentos naturais, em micelas não-iônicas, zwitteriônicas e, principalmente, complexos supramoleculares polímeros/surfactantes zwitteriônico como sistemas altamente promissores em aplicações fotoquímicas.

A Mg-Chl *b* e Pheo *b* se ligam fortemente às micelas de Pluronic e Tweens, com maiores constantes de ligação frente às micelas de Pluronic, justificado pelo seu maior tamanho micelar. Nos meios micelares, a Mg-Chl *b* exibe fotodegradação intensa, enquanto a Pheo *b* é completamente fotoestável. No entanto, para Mg-Chl *b*, o processo de fotodegradação é menos intenso quando o composto é posicionado no interior da micela, processo descrito como fotoestabilização / fotoproteção. Esse fato é demonstrado pela correlação com os valores de K_{SV} e K_b . Com base nos altos valores de $\Phi_{\Delta}^1O_2$ e coeficiente de absorvidade molar, é possível indicar que Chls do tipo B são potentes geradores de oxigênio singleto podendo atuar como fotossensibilizadores via mecanismo fotoquímico Tipo II. A Mg-Chl *b*, em particular, é quase duas vezes mais eficiente que a Mg-Chl *a*. Por isso, tal extraordinário resultado torna essa molécula um dos geradores de oxigênio singleto mais potentes até então encontrados na natureza, sendo estimado que 80% de toda a energia luminosa absorvida pela Mg-Chl *b* é convertida em oxigênio singleto. No esquema 12 é apresentada uma ilustração esquemática resumo da primeira seção da Parte II.

Esquema 12



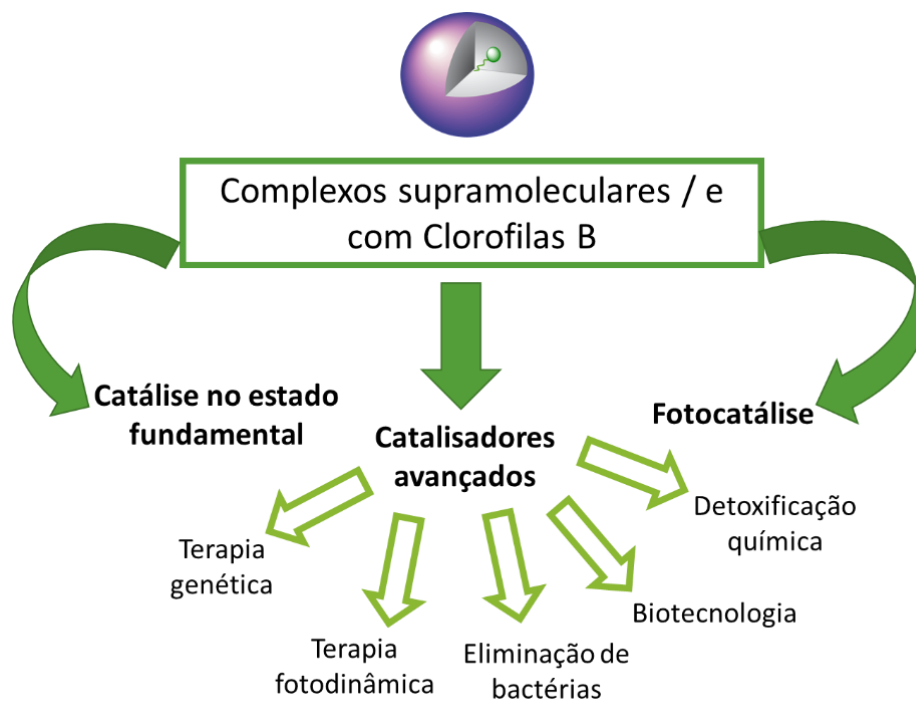
A clorofila *b* apresentou alta estabilidade no escuro em complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico. Por outro lado, não foram estáveis em complexos polímero/surfactante catiônico. Complexos PAIM⁻/SB3-16 foram sistemas altamente eficientes na inibição da fotodegradação da Mg-Chl *b*, revelando expressivamente os efeitos supramoleculares intrínsecos de tais complexos, sendo este o sistema mais eficiente dentre todos os investigados. Aplicação desse sistema na fotocatalise dos substratos Vitamina C e Trans-Estilbeno demonstrou a alta relevância e potencialidade da Mg-Chl *b* em complexos polímero/surfactante zwitteriônicos atuando como um exímio catalisador fotoquímico. Ainda, ressaltando que a eficiência e seletividade fotocatalítica dependem da localização, proximidade e tempo. Em particular, tais sistemas são altamente promissores como (foto)catalisadores avançados que podem atuar frente a múltiplas reações orgânicas, apresentando potencialidades multifuncionais.

Finalmente, os resultados apresentados fundamentam conceitos que abrem novos caminhos para o design de novos fotocatalisadores e sistemas de estabilização, liberação, fotoestabilização e fotoproteção, bem como evidências que direcionam a uma nova perspectiva rumo à compreensão da fotoestabilidade de clorofilas em plantas, além de fornecer sistemas altamente promissores para estudos aplicados em fotoquímica via oxigênio singleto: fotocatalise de biomoléculas alvo, tal como na terapia fotodinâmica no tratamento de doenças como o câncer, na eliminação de bactérias multirresistentes, bem como na fotocatalise para oxidação de substratos orgânicos visando a síntese orgânica, química fina e assimétrica.

5. CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados reportados neste trabalho fornecem caracterização consistente e detalhada de complexos supramoleculares bioinspirados, incluindo o desenvolvimento de novo método de caracterização específico, possibilitando a compreensão e design racional de enzimas artificiais multifuncionais baseadas em complexos polímero/surfactante. Além disso, tais resultados possibilitam o desenvolvimento sólido da ciência de base fornecendo um modelo refinado e compreensível que demonstra que os efeitos hidrofóbicos são centrais em catálise enzimática, os quais causam grande impacto tanto na atividade quanto no mecanismo catalítico, partindo de um mecanismo de catálise básica-geral para um mecanismo de catálise nucleofílica com o aumento da hidrofobicidade. Os catalisadores bioinspirados desenvolvidos demonstraram atividade similar às enzimas naturais, além da significância da cooperatividade entre os efeitos eletrostáticos e hidrofóbicos, e relevância espaço-temporal em catálise. Ainda, os resultados identificaram a clorofila *b*, pigmento natural, como um dos mais poderosos geradores de oxigênio singleto encontrados na natureza, sendo estimado que 80% de toda energia luminosa, absorvida por esta molécula, é convertida nesta espécie reativa. A fotoestabilidade de clorofilas *b* está fortemente relacionada ao microambiente e sua localização. Os complexos supramoleculares polímero/surfactante zwitteriônico foram os sistemas mais eficientes na inibição de fotodegradação da clorofila *b*, expressando seus efeitos supramoleculares intrínsecos. Sistemas baseados em clorofila *b* e complexos supramoleculares se mostraram altamente promissores como fotocatalisadores em reações de oxidação. Tais sistemas investigados se demonstraram altamente promissores frente a múltiplas reações podendo atuar via mecanismos de catálise nucleofílica, básica geral e/ou fotoquímica, e, assim, possibilitando resolver diversos problemas do mundo moderno através da terapia genética, terapia fotodinâmica, eliminação de bactérias multirresistentes, biotecnologia, detoxificação química de poluentes, pesticidas e armas químicas (Esquema 13).

Esquema 13



6. REFERÊNCIAS

- (1) Lin, Y.; Ren, J.; Qu, X. Catalytically Active Nanomaterials: A Promising Candidate for Artificial Enzymes. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (4), 1097–1105. <https://doi.org/10.1021/ar400250z>.
- (2) Lu, A.; O'Reilly, R. K. Advances in Nanoreactor Technology Using Polymeric Nanostructures. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24* (4), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.11.013>.
- (3) Orth, E. S.; Fonsaca, J. E. S.; Almeida, T. G.; Domingues, S. H.; Ferreira, J. G. L.; Zarbin, A. J. G. Functionalized Graphene Oxide as a Nanocatalyst in Dephosphorylation Reactions: Pursuing Artificial Enzymes. *Chem Commun* **2014**, *50* (69), 9891–9894. <https://doi.org/10.1039/C4CC03262D>.
- (4) Polshettiwar, V.; Varma, R. S. Green Chemistry by Nano-Catalysis. *Green Chem.* **2010**, *12* (5), 743. <https://doi.org/10.1039/b921171c>.
- (5) Sanlés-Sobrido, M.; Pérez-Lorenzo, M.; Rodríguez-González, B.; Salgueiriño, V.; Correa-Duarte, M. A. Highly Active Nanoreactors: Nanomaterial Encapsulation Based on Confined Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (16), 3877–3882. <https://doi.org/10.1002/anie.201105283>.
- (6) Polshettiwar, V.; Asefa, T. *Nanocatalysis: Synthesis and Applications*; 2013.
- (7) The Importance of Industrial Publications. *Nat. Catal.* **2018**, *1* (7), 479–480. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0119-0>.
- (8) *Nanostructured Materials for Engineering Applications*; Bergmann, C. P., Ed.; Springer: Berlin, 2011.
- (9) Catlow, C. R.; Davidson, M.; Hardacre, C.; Hutchings, G. J. Catalysis Making the World a Better Place. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2016**, *374* (2061), 20150089. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0089>.
- (10) Anastas, P. T.; Kirchoff, M. M.; Williamson, T. C. Catalysis as a Foundational Pillar of Green Chemistry. *Appl. Catal. Gen.* **2001**, *221* (1–2), 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(01\)00793-1](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(01)00793-1).
- (11) Hagen, J. *Industrial Catalysis: A Practical Approach*, 3rd completely revised and enlarged edition.; Wiley-VCH: Weinheim, 2015.
- (12) de Vries, J. G.; Jackson, S. D. Homogeneous and Heterogeneous Catalysis in Industry. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2* (10), 2009. <https://doi.org/10.1039/c2cy90039d>.
- (13) Cui, X.; Li, H.; Wang, Y.; Hu, Y.; Hua, L.; Li, H.; Han, X.; Liu, Q.; Yang, F.; He, L.; Chen, X.; Li, Q.; Xiao, J.; Deng, D.; Bao, X. Room-Temperature Methane Conversion by Graphene-Confined Single Iron Atoms. *Chem* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.05.006>.
- (14) Liu, C.; Wang, M.; Zhang, T.; Sun, H. DNA Hydrolysis Promoted by Di- and Multi-Nuclear Metal Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248* (1–2), 147–168. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2003.11.002>.
- (15) Meyer, T. J. The Art of Splitting Water: Catalysis. *Nature* **2008**, *451* (7180), 778–779. <https://doi.org/10.1038/451778a>.
- (16) Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger, A. L.; Termignoni, C. *Principios de bioquímica de Lehninger*; 2014.
- (17) Damjanović, J.; Iwasaki, Y. Phospholipase D as a Catalyst: Application in Phospholipid Synthesis, Molecular Structure and Protein Engineering. *J.*

- Biosci. Bioeng.* **2013**, *116* (3), 271–280.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.03.008>.
- (18) Tsubogo, T.; Oyamada, H.; Kobayashi, S. Multistep Continuous-Flow Synthesis of (R)- and (S)-Rolipram Using Heterogeneous Catalysts. *Nature* **2015**, *520* (7547), 329–332. <https://doi.org/10.1038/nature14343>.
- (19) Ingram, L. O.; Aldrich, H. C.; Borges, A. C. C.; Causey, T. B.; Martinez, A.; Morales, F.; Saleh, A.; Underwood, S. A.; Yomano, L. P.; York, S. W.; Zaldivar, J.; Zhou, S. Enteric Bacterial Catalysts for Fuel Ethanol Production. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15* (5), 855–866.
<https://doi.org/10.1021/bp9901062>.
- (20) Pan, X.; Fan, Z.; Chen, W.; Ding, Y.; Luo, H.; Bao, X. Enhanced Ethanol Production inside Carbon-Nanotube Reactors Containing Catalytic Particles. *Nat. Mater.* **2007**, *6* (7), 507–511. <https://doi.org/10.1038/nmat1916>.
- (21) Shah, M.; Ali, S.; Tariq, M.; Khalid, N.; Ahmad, F.; Khan, M. A. Catalytic Conversion of Jojoba Oil into Biodiesel by Organotin Catalysts, Spectroscopic and Chromatographic Characterization. *Fuel* **2014**, *118*, 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.11.010>.
- (22) Naldini, L. Gene Therapy Returns to Centre Stage. *Nature* **2015**, *526* (7573), 351–360. <https://doi.org/10.1038/nature15818>.
- (23) Silva, G.; Poirot, L.; Galetto, R.; Smith, J.; Montoya, G.; Duchateau, P.; Paques, F. Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* **2011**, *11* (1), 11–27. <https://doi.org/10.2174/156652311794520111>.
- (24) Su, Y.-C.; Chuang, K.-H.; Wang, Y.-M.; Cheng, C.-M.; Lin, S.-R.; Wang, J.-Y.; Hwang, J.-J.; Chen, B.-M.; Chen, K.-C.; Roffler, S.; Cheng, T.-L. Gene Expression Imaging by Enzymatic Catalysis of a Fluorescent Probe via Membrane-Anchored β -Glucuronidase. *Gene Ther.* **2007**, *14* (7), 565–574.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302896>.
- (25) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. Nanomedicine: Current Status and Future Prospects. *FASEB J.* **2005**, *19* (3), 311–330.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-2747rev>.
- (26) Boisselier, E.; Astruc, D. Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Preparations, Imaging, Diagnostics, Therapies and Toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759. <https://doi.org/10.1039/b806051g>.
- (27) López, T.; Figueras, F.; Manjarrez, J.; Bustos, J.; Alvarez, M.; Silvestre-Albero, J.; Rodríguez-Reinoso, F.; Martínez-Ferre, A.; Martínez, E. Catalytic Nanomedicine: A New Field in Antitumor Treatment Using Supported Platinum Nanoparticles. In Vitro DNA Degradation and in Vivo Tests with C6 Animal Model on Wistar Rats. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (5), 1982–1990.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.043>.
- (28) Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy and Anti-Tumour Immunity. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (7), 535–545.
<https://doi.org/10.1038/nrc1894>.
- (29) Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbańska, K.; Stochel, G.; Brett, C. M. A. Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (18), 5346–5357.
<https://doi.org/10.1002/chem.201304202>.

- (30) Li, Y.; Zhang, F.; Wang, X.-F.; Chen, G.; Fu, X.; Tian, W.; Kitao, O.; Tamiaki, H.; Sasaki, S. Pluronic Micelle-Encapsulated Red-Photoluminescent Chlorophyll Derivative for Biocompatible Cancer Cell Imaging. *Dyes Pigments* **2017**, *136*, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.08.018>.
- (31) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380.
- (32) Berkessel, A.; Gröger, H. *Asymmetric Organocatalysis from Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005.
- (33) Ojima, I. *Catalytic Asymmetric Synthesis*; Wiley: Hoboken, N.J., 2010.
- (34) Blaser, H. U.; Spindler, F.; Studer, M. Enantioselective Catalysis in Fine Chemicals Production. *Appl. Catal. Gen.* **2001**, *221* (1–2), 119–143. [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(01\)00801-8](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(01)00801-8).
- (35) *Fine Chemicals through Heterogenous Catalysis*; Sheldon, R. A., Bekkum, H. van, Eds.; Wiley-VCH: Weinheim; New York, 2001.
- (36) Ferreira, J.; Orth, E. Degrading Pesticides with Waste Product: Imidazole-Functionalized Rice Husk Catalyst for Organophosphate Detoxification. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170027>.
- (37) Wanderlind, E. H.; Medeiros, M.; Souza, B. S.; Fiedler, H. D.; Nome, F. Recent Advances on the Decomposition of Neurotoxic Phosphorous Triesters. *Rev. Virtual Quím.* **2014**, *6* (3). <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140040>.
- (38) Johnson, M. K.; Jacobsen, D.; Meredith, T. J.; Eyer, P.; Heath, A. J.; Ligtenstein, D. A.; Marrs, T. C.; Szinicz, L.; Vale, J. A.; Haines, J. A. Evaluation of Antidotes for Poisoning by Organophosphorus Pesticides. *Emerg. Med. Australas.* **2000**, *12* (1), 22–37. <https://doi.org/10.1046/j.1442-2026.2000.00087.x>.
- (39) Horváth, I. T.; Anastas, P. T. Innovations and Green Chemistry. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (6), 2169–2173. <https://doi.org/10.1021/cr078380v>.
- (40) Clark, J. H. Catalysis for Green Chemistry. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73* (1), 103–111. <https://doi.org/10.1351/pac200173010103>.
- (41) Liang, C.; Fréchet, J. M. J. Applying Key Concepts from Nature: Transition State Stabilization, Pre-Concentration and Cooperativity Effects in Dendritic Biomimetics. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30* (3–4), 385–402. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.01.004>.
- (42) Kirby, A. J.; Hollfelder, F. *From Enzyme Models to Model Enzymes*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2009.
- (43) Giusti, L. A.; Medeiros, M.; Ferreira, N. L.; Mora, J. R.; Fiedler, H. D. Polymers Containing Imidazole Groups as Nanoreactors for Hydrolysis of Esters: POLYMERS CONTAINING IMIDAZOLE GROUPS AS NANOREACTORS FOR HYDROLYSIS OF ESTERS. *J. Phys. Org. Chem.* **2014**, *27* (4), 297–302. <https://doi.org/10.1002/poc.3263>.
- (44) Kraut, D. A.; Carroll, K. S.; Herschlag, D. Challenges in Enzyme Mechanism and Energetics. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72* (1), 517–571. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161617>.
- (45) Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; 1984.
- (46) Orth, E. S.; Brandão, T. A. S.; Souza, B. S.; Pliego, J. R.; Vaz, B. G.; Eberlin, M. N.; Kirby, A. J.; Nome, F. Intramolecular Catalysis of Phosphodiester Hydrolysis by Two Imidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (24), 8513–8523. <https://doi.org/10.1021/ja1034733>.

- (47) Orth, E. S.; Campos, R. B. Multifunctional Imidazole-Derived Polymeric Catalyst for Dephosphorylation Reactions Potentiated by Cationic and Anionic Micelles. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150228>.
- (48) Marchetti, L.; Levine, M. Biomimetic Catalysis. *ACS Catal.* **2011**, *1* (9), 1090–1118. <https://doi.org/10.1021/cs200171u>.
- (49) Breslow, R. Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes: Catalysis by Design. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28* (3), 146–153. <https://doi.org/10.1021/ar00051a008>.
- (50) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, 1995. <https://doi.org/10.1002/3527607439>.
- (51) Ward, T. R. Artificial Enzymes Made to Order: Combination of Computational Design and Directed Evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (41), 7802–7803. <https://doi.org/10.1002/anie.200802865>.
- (52) Raynal, M.; Ballester, P.; Vidal-Ferran, A.; van Leeuwen, P. W. N. M. Supramolecular Catalysis. Part 2: Artificial Enzyme Mimics. *Chem Soc Rev* **2014**, *43* (5), 1734–1787. <https://doi.org/10.1039/C3CS60037H>.
- (53) Dong, Z.; Luo, Q.; Liu, J. Artificial Enzymes Based on Supramolecular Scaffolds. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (23), 7890. <https://doi.org/10.1039/c2cs35207a>.
- (54) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P. Progress in Artificial Metallonucleases. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (45), 5545. <https://doi.org/10.1039/c2cc30952a>.
- (55) Wulff, G.; Liu, J. Design of Biomimetic Catalysts by Molecular Imprinting in Synthetic Polymers: The Role of Transition State Stabilization. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (2), 239–247. <https://doi.org/10.1021/ar200146m>.
- (56) Sun, Q.; Dai, Z.; Meng, X.; Wang, L.; Xiao, F.-S. Task-Specific Design of Porous Polymer Heterogeneous Catalysts beyond Homogeneous Counterparts. *ACS Catal.* **2015**, *5* (8), 4556–4567. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00757>.
- (57) Xu, S.; Minteer, S. D. Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Enzymatic Bioanode: Incorporation of the Substituted Polyaniline Conducting Polymer as a Mediator. *ACS Catal.* **2014**, *4* (7), 2241–2248. <https://doi.org/10.1021/cs500442b>.
- (58) Xu, L.; Xu, Z. Molecularly Imprinted Polymer Based on Multiwalled Carbon Nanotubes for Ribavirin Recognition. *J. Polym. Res.* **2012**, *19* (8). <https://doi.org/10.1007/s10965-012-9942-1>.
- (59) Liu, F.; Kong, W.; Qi, C.; Zhu, L.; Xiao, F.-S. Design and Synthesis of Mesoporous Polymer-Based Solid Acid Catalysts with Excellent Hydrophobicity and Extraordinary Catalytic Activity. *ACS Catal.* **2012**, *2* (4), 565–572. <https://doi.org/10.1021/cs200613p>.
- (60) Kirkorian, K.; Ellis, A.; Twyman, L. J. Catalytic Hyperbranched Polymers as Enzyme Mimics; Exploiting the Principles of Encapsulation and Supramolecular Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (18), 6138. <https://doi.org/10.1039/c2cs35238a>.
- (61) Berlamino, A. T. N.; Orth, E. S.; Mello, R. S.; Medeiros, M.; Nome, F. Catalytic Nanoreactors for Ester Hydrolysis. *J. Mol. Catal. Chem.* **2010**, *332* (1–2), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2010.09.002>.

- (62) Cotanda, P.; Petzetakis, N.; O'Reilly, R. K. Catalytic Polymeric Nanoreactors: More than a Solid Supported Catalyst. *MRS Commun.* **2012**, *2* (04), 119–126. <https://doi.org/10.1557/mrc.2012.26>.
- (63) Zakharova, L. Ya.; Ibragimova, A. R.; Valeeva, F. G.; Zakharov, A. V.; Mustafina, A. R.; Kudryavtseva, L. A.; Harlampidi, H. E.; Konovalov, A. I. Nanosized Reactors Based on Polyethyleneimines: From Microheterogeneous Systems to Immobilized Catalysts. *Langmuir* **2007**, *23* (6), 3214–3224. <https://doi.org/10.1021/la0629633>.
- (64) Zakharova, L. Ya.; Semenov, V. E.; Voronin, M. A.; Valeeva, F. G.; Ibragimova, A. R.; Giniatullin, R. Kh.; Chernova, A. V.; Kharlamov, S. V.; Kudryavtseva, L. A.; Latypov, S. K.; Reznik, V. S.; Konovalov, A. I. Nanoreactors Based on Amphiphilic Uracilophanes: Self-Organization and Reactivity Study. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (51), 14152–14162. <https://doi.org/10.1021/jp076592q>.
- (65) Lee, K. S.; Parquette, J. R. A Self-Assembled Nanotube for the Direct Aldol Reaction in Water. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (86), 15653–15656. <https://doi.org/10.1039/C5CC06142C>.
- (66) Zhang, Q.; He, X.; Han, A.; Tu, Q.; Fang, G.; Liu, J.; Wang, S.; Li, H. Artificial Hydrolase Based on Carbon Nanotubes Conjugated with Peptides. *Nanoscale* **2016**, *8* (38), 16851–16856. <https://doi.org/10.1039/C6NR05015H>.
- (67) Duncan, K. L.; Ulijn, R. V. Short Peptides in Minimalistic Biocatalyst Design. *Biocatalysis* **2015**, *1* (1). <https://doi.org/10.1515/boca-2015-0005>.
- (68) Wang, M.; Lv, Y.; Liu, X.; Qi, W.; Su, R.; He, Z. Enhancing the Activity of Peptide-Based Artificial Hydrolase with Catalytic Ser/His/Asp Triad and Molecular Imprinting. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (22), 14133–14141. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b04670>.
- (69) Makhlynets, O. V.; Gosavi, P. M.; Korendovych, I. V. Short Self-Assembling Peptides Are Able to Bind to Copper and Activate Oxygen. *Angew. Chem.* **2016**, *128* (31), 9163–9166. <https://doi.org/10.1002/ange.201602480>.
- (70) Gulseren, G.; Khalily, M. A.; Tekinay, A. B.; Guler, M. O. Catalytic Supramolecular Self-Assembled Peptide Nanostructures for Ester Hydrolysis. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (26), 4605–4611. <https://doi.org/10.1039/C6TB00795C>.
- (71) Bélières, M.; Déjugnat, C.; Chouini-Lalanne, N. Histidine-Based Lipopeptides Enhance Cleavage of Nucleic Acids: Interactions with DNA and Hydrolytic Properties. *Bioconj. Chem.* **2015**, *26* (12), 2520–2529. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00542>.
- (72) Wanderlind, E. H.; Liz, D. G.; Gerola, A. P.; Affeldt, R. F.; Nascimento, V.; Bretanha, L. C.; Montecinos, R.; Garcia-Rio, L.; Fiedler, H. D.; Nome, F. Imidazole-Functionalized Pillar[5]Arenes: Highly Reactive and Selective Supramolecular Artificial Enzymes. *ACS Catal.* **2018**, *8* (4), 3343–3347. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b00901>.
- (73) Liz, D. G.; Manfredi, A. M.; Medeiros, M.; Montecinos, R.; Gómez-González, B.; Garcia-Rio, L.; Nome, F. Supramolecular Phosphate Transfer Catalysis by Pillar[5]Arene. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (15), 3167–3170. <https://doi.org/10.1039/C5CC10214F>.
- (74) Breslow, R.; Schmuck, C. Goodness of Fit in Complexes between Substrates and Ribonuclease Mimics: Effects on Binding, Catalytic Rate

- Constants, and Regiochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (28), 6601–6605. <https://doi.org/10.1021/ja954307n>.
- (75) Zhang, C.; Xue, X.; Luo, Q.; Li, Y.; Yang, K.; Zhuang, X.; Jiang, Y.; Zhang, J.; Liu, J.; Zou, G.; Liang, X.-J. Self-Assembled Peptide Nanofibers Designed as Biological Enzymes for Catalyzing Ester Hydrolysis. *ACS Nano* **2014**, *8* (11), 11715–11723. <https://doi.org/10.1021/nn5051344>.
- (76) Engström, K.; Johnston, E. V.; Verho, O.; Gustafson, K. P. J.; Shakeri, M.; Tai, C.-W.; Bäckvall, J.-E. Co-Immobilization of an Enzyme and a Metal into the Compartments of Mesoporous Silica for Cooperative Tandem Catalysis: An Artificial Metalloenzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (52), 14006–14010. <https://doi.org/10.1002/anie.201306487>.
- (77) Muxel, A. A.; Neves, A.; Camargo, M. A.; Bortoluzzi, A. J.; Szpoganicz, B.; Castellano, E. E.; Castilho, N.; Bortolotto, T.; Terenzi, H. New La(III) Complex Immobilized on 3-Aminopropyl-Functionalized Silica as an Efficient and Reusable Catalyst for Hydrolysis of Phosphate Ester Bonds. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (6), 2943–2952. <https://doi.org/10.1021/ic402705r>.
- (78) Hostert, L.; Blaskiewicz, S. F.; Fonsaca, J. E. S.; Domingues, S. H.; Zarbin, A. J. G.; Orth, E. S. Imidazole-Derived Graphene Nanocatalysts for Organophosphate Destruction: Powder and Thin Film Heterogeneous Reactions. *J. Catal.* **2017**, *356*, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2017.10.008>.
- (79) Fonsaca, J. E. S.; Hostert, L.; Orth, E. S.; Zarbin, A. J. G. Tailoring Multifunctional Graphene-Based Thin Films: From Nanocatalysts to SERS Substrates. *J. Mater. Chem. A* **2017**, *5* (20), 9591–9603. <https://doi.org/10.1039/C7TA01967J>.
- (80) Gerola, A. P.; Wanderlind, E. H.; Gomes, Y. S.; Giusti, L. A.; García-Río, L.; Nome, R. A.; Kirby, A. J.; Fiedler, H. D.; Nome, F. Supramolecular Polymer/Surfactant Complexes as Catalysts for Phosphate Transfer Reactions. *ACS Catal.* **2017**, *7* (3), 2230–2239. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b00097>.
- (81) Neumann, L. N.; Baker, M. B.; Leenders, C. M. A.; Voets, I. K.; Lafleur, R. P. M.; Palmans, A. R. A.; Meijer, E. W. Supramolecular Polymers for Organocatalysis in Water. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (28), 7711–7719. <https://doi.org/10.1039/C5OB00937E>.
- (82) Mandal, H. K.; Majumdar, T.; Mahapatra, A. Kinetics of the Basic Hydrolysis of Tris(1,10-Phenanthroline)Fe(II): Influence of Polymer–Surfactant Interactions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *380* (1–3), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.03.001>.
- (83) Zhang, Y.; Patil, A. J.; Perriman, A. W.; Mann, S. Enhanced Catalytic Activity in Organic Solvents Using Molecularly Dispersed Haemoglobin–Polymer Surfactant Constructs. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (83), 9561. <https://doi.org/10.1039/c3cc46101g>.
- (84) Majumdar, T.; Mandal, H. K.; Kamila, P.; Mahapatra, A. Influence of Polymer–Surfactant Interactions on the Reactivity of the Co(III)–Fe(II) Redox Couple. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *350* (1), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.06.049>.
- (85) Zakharova, L. Ya.; Ibragimova, A. R.; Valeeva, F. G.; Kudryavtseva, L. A.; Konovalov, A. I.; Zakharov, A. V.; Selivanova, N. M.; Osipova, V. V.; Strelkov, M. V.; Galyametdinov, Y. G. Self-Organization and Catalytic Activity of the Poly(Ethylene Glycol)(10) Monododecyl

- Ether/Poly(Ethyleneimine)/Lanthanum Nitrate System. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (37), 13839–13845. <https://doi.org/10.1021/jp0716536>.
- (86) Zakharova, L. Y.; Valeeva, F. G.; Kudryavtsev, D. B.; Bilalov, A. V.; Tretyakova, A. Y.; Kudryavtseva, L. A.; Konovalov, A. I.; Barabanov, V. P. Sodium Dodecyl Sulfate—Polyethyleneimine—Water System. Self Organization and Catalytic Activity. **2005**, *54* (3), 9.
- (87) Zhao, H. Highlights of Biocatalysis and Biomimetic Catalysis. *ACS Catal.* **2011**, *1* (9), 1119–1120. <https://doi.org/10.1021/cs200425r>.
- (88) Tonks, N. K. Protein Tyrosine Phosphatases: From Genes, to Function, to Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7* (11), 833–846. <https://doi.org/10.1038/nrm2039>.
- (89) Doyagüez, E. G.; Rodríguez-Hernández, J.; Corrales, G.; Fernández-Mayoralas, A.; Gallardo, A. Water-Soluble Pendant Copolymers Bearing Proline and Permethylated β -Cyclodextrin: PH-Dependent Catalytic Nanoreactors. *Macromolecules* **2012**, *45* (19), 7676–7683. <https://doi.org/10.1021/ma301615a>.
- (90) Frohman, M. A. The Phospholipase D Superfamily as Therapeutic Targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36* (3), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.01.001>.
- (91) Hostert, L.; Campos, R. B.; Fonsaca, J. E. S.; Silva, V. B.; Blaskiewicz, S. F.; Ferreira, J. G. L.; Takarada, W.; Naidek, N.; Santos, Y. H.; Nascimento, L. L. Q.; Zarbin, A. J. G.; Orth, E. S. Targeted Catalytic Degradation of Organophosphates: Pursuing Sensors. *Pure Appl. Chem.* **2018**, *0* (0). <https://doi.org/10.1515/pac-2018-0104>.
- (92) Mello, R. S.; Orth, E. S.; Loh, W.; Fiedler, H. D.; Nome, F. Polymers Containing Hydroxamate Groups: Nanoreactors for Hydrolysis of Phosphoryl Esters. *Langmuir* **2011**, *27* (24), 15112–15119. <https://doi.org/10.1021/la203437j>.
- (93) Oliveira, N. B. de. Inovação e produção na química fina. *Quím. Nova* **2005**, *28*, S79–S85. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000700015>.
- (94) Dong, Z.; Zhu, J.; Luo, Q.; Liu, J. Understanding Enzyme Catalysis by Means of Supramolecular Artificial Enzymes. *Sci. China Chem.* **2013**, *56* (8), 1067–1074. <https://doi.org/10.1007/s11426-013-4871-3>.
- (95) Cheng, L.; Abhilash, K. G.; Breslow, R. Binding and Biomimetic Cleavage of the RNA Poly(U) by Synthetic Polyimidazoles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (32), 12884–12887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210846109>.
- (96) Zhang, X.; Houk, K. N. Why Enzymes Are Proficient Catalysts: Beyond the Pauling Paradigm. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38* (5), 379–385. <https://doi.org/10.1021/ar040257s>.
- (97) Benner, S. A. Enzyme Kinetics and Molecular Evolution. *Chem. Rev.* **1989**, *89* (4), 789–806. <https://doi.org/10.1021/cr00094a004>.
- (98) Lienhard, G. E. Enzymatic Catalysis and Transition-State Theory. *Science* **1973**, *180* (4082), 149–154. <https://doi.org/10.1126/science.180.4082.149>.
- (99) Souza, B. S.; Mora, J. R.; Wanderlind, E. H.; Clementin, R. M.; Gesser, J. C.; Fiedler, H. D.; Nome, F.; Menger, F. M. Transforming a Stable Amide into a Highly Reactive One: Capturing the Essence of Enzymatic Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (19), 5345–5348. <https://doi.org/10.1002/anie.201701306>.

- (100) Cleland, W. W.; Hengge, A. C. Enzymatic Mechanisms of Phosphate and Sulfate Transfer. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (8), 3252–3278. <https://doi.org/10.1021/cr050287o>.
- (101) Camargo, T. P.; Neves, A.; Peralta, R. A.; Chaves, C.; Maia, E. C. P.; Lizarazo-Jaimes, E. H.; Gomes, D. A.; Bortolotto, T.; Norberto, D. R.; Terenzi, H.; Tierney, D. L.; Schenk, G. Second-Sphere Effects in Dinuclear Fe^{III}Zn^{II} Hydrolase Biomimetics: Tuning Binding and Reactivity Properties. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (1), 187–203. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02384>.
- (102) Neves, A.; Lanznaster, M.; Bortoluzzi, A. J.; Peralta, R. A.; Casellato, A.; Castellano, E. E.; Herral, P.; Riley, M. J.; Schenk, G. An Unprecedented Fe^{III}(μ -OH)Zn^{II} Complex That Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (24), 7486–7487. <https://doi.org/10.1021/ja071184l>.
- (103) Silva, G. A. dos S.; Amorim, A. L.; Souza, B. de; Gabriel, P.; Terenzi, H.; Nordlander, E.; Neves, A.; Peralta, R. A. Synthesis and Characterization of Fe^{III}(μ -OH)Zn^{II} Complexes: Effects of a Second Coordination Sphere and Increase in the Chelate Ring Size on the Hydrolysis of a Phosphate Diester and DNA. *Dalton Trans.* **2017**, *46* (34), 11380–11394. <https://doi.org/10.1039/C7DT02035J>.
- (104) Rey, N. A.; Neves, A.; de Almeida, W. B.; Dos Santos, H. F.; Costa, L. A. S. A Promiscuous Dicopper(II) System Promoting the Hydrolysis of Bis(2,4-Dinitrophenyl)Phosphate: Gaining Mechanistic Insight by Means of Structural and Spectroscopic DFT Studies. *Int. J. Quantum Chem.* **2009**, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/qua.22334>.
- (105) Tripathi, R.; Glaves, R.; Marx, D. The GTPase HGBP1 Converts GTP to GMP in Two Steps via Proton Shuttle Mechanisms. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (1), 371–380. <https://doi.org/10.1039/C6SC02045C>.
- (106) Feng, X.; Jia, Y.; Cai, P.; Fei, J.; Li, J. Coassembly of Photosystem II and ATPase as Artificial Chloroplast for Light-Driven ATP Synthesis. *ACS Nano* **2016**, *10* (1), 556–561. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b05579>.
- (107) DeYonker, N. J.; Webster, C. E. Phosphoryl Transfers of the Phospholipase D Superfamily: A Quantum Mechanical Theoretical Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (37), 13764–13774. <https://doi.org/10.1021/ja4042753>.
- (108) Anslyn, E.; Breslow, R. Geometric Evidence on the Ribonuclease Model Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (15), 5972–5973. <https://doi.org/10.1021/ja00197a085>.
- (109) Orth, E. S.; Wanderlind, E. H.; Medeiros, M.; Oliveira, P. S. M.; Vaz, B. G.; Eberlin, M. N.; Kirby, A. J.; Nome, F. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (19), 8003–8008. <https://doi.org/10.1021/jo2017394>.
- (110) Kuca, K.; Cabal, J.; Jun, D.; Kassa, J.; Bartosova, L.; Kunesova, G.; Dohnal, V. Strategy for the Development of New Acetylcholinesterase Reactivators - Antidotes Used for Treatment of Nerve Agent Poisonings. *Biomed. Pap.* **2005**, *149* (2), 429–431. <https://doi.org/10.5507/bp.2005.074>.
- (111) Giusti, L. A. Ácido poli(acrílico) funcionalizado como nanoreator na degradação de ésteres, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

- (112) Westheimer, F. H. The Role of Phosphorus in Chemistry and Biochemistry: An Overview. In *Phosphorus Chemistry*; Walsh, E. N., Griffith, E. J., Parry, R. W., Quin, L. D., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1992; Vol. 486, pp 1–17. <https://doi.org/10.1021/bk-1992-0486.ch001>.
- (113) Westheimer, F. Why Nature Chose Phosphates. *Science* **1987**, *235* (4793), 1173–1178. <https://doi.org/10.1126/science.2434996>.
- (114) Machado, V. G.; Nome, F. Compostos fosfatados ricos em energia. *Quím. Nova* **1999**, *22* (3), 351–357. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000300013>.
- (115) Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Machado, V. G.; Nome, F. A química dos ésteres de fosfato. *Quím. Nova* **2003**, *26* (5), 745–753. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500019>.
- (116) Orth, E. S.; Almeida, T. G.; Silva, V. B.; Oliveira, A. R. M.; Ocampos, F. M. M.; Barison, A. Mechanistic Insight on the Catalytic Detoxification of Paraoxon Mediated by Imidazole: Furnishing Optimum Scaffolds for Scavenging Organophosphorus Agents. *J. Mol. Catal. Chem.* **2015**, *403*, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2015.03.020>.
- (117) Kirby, A. J.; Nome, F. Fundamentals of Phosphate Transfer. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (7), 1806–1814. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00072>.
- (118) Kamerlin, S. C. L.; Sharma, P. K.; Prasad, R. B.; Warshel, A. Why Nature Really Chose Phosphate. *Q. Rev. Biophys.* **2013**, *46* (01), 1–132. <https://doi.org/10.1017/S0033583512000157>.
- (119) Wanderlind, E. H.; Medeiros, M.; Souza, B. S.; Fiedler, H. D.; Nome, F. Recent Advances on the Decomposition of Neurotoxic Phosphorous Triesters. *Rev. Virtual Quím.* **2014**, *6* (3). <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140040>.
- (120) Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Bunton, C. A.; Nome, F. Reactions of Bis(2,4-Dinitrophenyl) Phosphate with Hydroxylamine. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (18), 7051–7058. <https://doi.org/10.1021/jo034348z>.
- (121) Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Brandão, T. A. S.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Bunton, C. A.; Nome, F. Reaction of Bis(2,4-Dinitrophenyl) Phosphate with Hydrazine and Hydrogen Peroxide. Comparison of O - and N - Phosphorylation. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (23), 7898–7905. <https://doi.org/10.1021/jo048737k>.
- (122) Brandão, T. A. S.; Orth, E. S.; Rocha, W. R.; Bortoluzzi, A. J.; Bunton, C. A.; Nome, F. Intramolecular General Acid Catalysis of the Hydrolysis of 2-(2'-Imidazolium)Phenyl Phosphate, and Bond Length–Reactivity Correlations for Reactions of Phosphate Monoester Monoanions. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (10), 3800–3807. <https://doi.org/10.1021/jo070090r>.
- (123) Kirby, A. J.; Tondo, D. W.; Medeiros, M.; Souza, B. S.; Priebe, J. P.; Lima, M. F.; Nome, F. Efficient Intramolecular General-Acid Catalysis of the Reactions of α -Effect Nucleophiles and Ammonia Oxide with a Phosphate Triester. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (5), 2023–2028. <https://doi.org/10.1021/ja808746f>.
- (124) Kirby, A. J.; Dutta-Roy, N.; da Silva, D.; Goodman, J. M.; Lima, M. F.; Roussev, C. D.; Nome, F. Intramolecular General Acid Catalysis of Phosphate Transfer. Nucleophilic Attack by Oxyanions on the PO_3^{2-} Group.

- J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (19), 7033–7040. <https://doi.org/10.1021/ja0502876>.
- (125) Liu, L.; Breslow, R. A Potent Polymer/Pyridoxamine Enzyme Mimic. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (18), 4978–4979. <https://doi.org/10.1021/ja025895p>.
- (126) Cox, J. R.; Ramsay, O. B. Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters. *Chem. Rev.* **1964**, *64* (4), 317–352. <https://doi.org/10.1021/cr60230a001>.
- (127) Allen, K. N.; Dunaway-Mariano, D. Phosphoryl Group Transfer: Evolution of a Catalytic Scaffold. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29* (9), 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.07.008>.
- (128) Grzyska, P. K.; Czyryca, P. G.; Purcell, J.; Hengge, A. C. Transition State Differences in Hydrolysis Reactions of Alkyl versus Aryl Phosphate Monoester Monoanions. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (43), 13106–13111. <https://doi.org/10.1021/ja036571j>.
- (129) Guthrie, R. D.; Jencks, W. P. IUPAC Recommendations for the Representation of Reaction Mechanisms. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22* (10), 343–349. <https://doi.org/10.1021/ar00166a001>.
- (130) Souza, B. S.; Nome, F. Importance of Equilibrium Fluctuations between Most Stable Conformers in the Control of the Reaction Mechanism. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (21), 7186–7193. <https://doi.org/10.1021/jo101366m>.
- (131) Menger, F. M. An Alternative View of Enzyme Catalysis. *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77* (11), 1873–1886. <https://doi.org/10.1351/pac200577111873>.
- (132) Orth, E. S.; Brandão, T. A. S.; Milagre; Eberlin, M. N.; Nome, F. Intramolecular Acid–Base Catalysis of a Phosphate Diester: Modeling the Ribonuclease Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (8), 2436–2437. <https://doi.org/10.1021/ja710693x>.
- (133) Kirby, A. J. *Stereoelectronic Effects*; Oxford chemistry primers; Oxford University Press: Oxford ; New York, 1996.
- (134) Pilling, M. J.; Seakins, P. W. *Reaction Kinetics*; Oxford science publications; Oxford University Press: Oxford ; New York, 1995.
- (135) Logan, S. R. *Fundamentals of Chemical Kinetics*; Longman: Harlow, Essex, 1996.
- (136) Desiraju, G. R. Chemistry beyond the Molecule. *Nature* **2001**, *412* (6845), 397–400. <https://doi.org/10.1038/35086640>.
- (137) Mattia, E.; Otto, S. Supramolecular Systems Chemistry. *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10* (2), 111–119. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.337>.
- (138) Zayed, J. M.; Nouvel, N.; Rauwald, U.; Scherman, O. A. Chemical Complexity—Supramolecular Self-Assembly of Synthetic and Biological Building Blocks in Water. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 2806. <https://doi.org/10.1039/b922348g>.
- (139) Ma, X.; Zhao, Y. Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host–Guest Interactions. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7794–7839. <https://doi.org/10.1021/cr500392w>.
- (140) Lehn, J.-M. Supramolecular Chemistry: Receptors, Catalysts, and Carriers. *Science* **1985**, *227* (4689), 849–856. <https://doi.org/10.1126/science.227.4689.849>.
- (141) Lehn, J. Supramolecular Chemistry. *Science* **1993**, *260* (5115), 1762–1763. <https://doi.org/10.1126/science.8511582>.

- (142) Araki, K.; Toma, H. E. Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos metálicos. *Quím. Nova* **2002**, *25* (6a), 962–975. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000600014>.
- (143) Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*; University Science: Sausalito, CA, 2006.
- (144) Zhu, S.; Wang, D. Photocatalysis: Basic Principles, Diverse Forms of Implementations and Emerging Scientific Opportunities. *Adv. Energy Mater.* **2017**, *7* (23), 1700841. <https://doi.org/10.1002/aenm.201700841>.
- (145) Buzzetti, L.; Crisenza, G. E. M.; Melchiorre, P. Mechanistic Studies in Photocatalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (12), 3730–3747. <https://doi.org/10.1002/anie.201809984>.
- (146) Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Second edition.; Wiley-VCH; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany; [Chichester, England], 2012.
- (147) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 2006.
- (148) DeRosa, M. Photosensitized Singlet Oxygen and Its Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233–234*, 351–371. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).
- (149) Kwon, B. M.; Foote, C. S.; Khan, S. I. Chemistry of Singlet Oxygen. 52. Reaction with Trans-Stilbene. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (14), 3378–3382. <https://doi.org/10.1021/jo00275a024>.
- (150) Kramarenko, G. G.; Hummel, S. G.; Martin, S. M.; Buettner, G. R. Ascorbate Reacts with Singlet Oxygen to Produce Hydrogen Peroxide. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82* (6), 1634. <https://doi.org/10.1562/2006-01-12-RN-774>.
- (151) Klaper, M.; Fudickar, W.; Linker, T. Role of Distance in Singlet Oxygen Applications: A Model System. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (22), 7024–7029. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b01555>.
- (152) Politzer, I. R.; Griffin, G. W.; Laseter, J. L. Singlet Oxygen and Biological Systems. *Chem. Biol. Interact.* **1971**, *3* (2), 73–93. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(71\)90088-3](https://doi.org/10.1016/0009-2797(71)90088-3).
- (153) Gerola, A. P.; Santana, A.; França, P. B.; Tsubone, T. M.; de Oliveira, H. P. M.; Caetano, W.; Kimura, E.; Hioka, N. Effects of Metal and the Phytol Chain on Chlorophyll Derivatives: Physicochemical Evaluation for Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87* (4), 884–894. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00935.x>.
- (154) Gerola, A. P.; Costa, P. F. A.; de Moraes, F. A. P.; Tsubone, T. M.; Caleare, A. O.; Nakamura, C. V.; Brunaldi, K.; Caetano, W.; Kimura, E.; Hioka, N. Liposome and Polymeric Micelle-Based Delivery Systems for Chlorophylls: Photodamage Effects on *Staphylococcus Aureus*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *177*, 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.032>.
- (155) Moore, C. M.; Pendse, D.; Emberton, M. Photodynamic Therapy for Prostate Cancer—a Review of Current Status and Future Promise. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **2009**, *6* (1), 18–30. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1274>.
- (156) Meng, Z.; Yu, B.; Han, G.; Liu, M.; Shan, B.; Dong, G.; Miao, Z.; Jia, N.; Tan, Z.; Li, B.; Zhang, W.; Zhu, H.; Sheng, C.; Yao, J. Chlorin p₆-Based Water-Soluble Amino Acid Derivatives as Potent Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (10), 4999–5010. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00352>.

- (157) Strain, H. H.; Svec, W. A. Extraction, Separation, Estimation, and Isolation of the Chlorophylls**Based on Work Carried out under the Auspices of the U. S. Atomic Energy Commission. In *The Chlorophylls*; Elsevier, 1966; pp 21–66. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3289-8.50008-4>.
- (158) Inskeep, W. P.; Bloom, P. R. Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone. *PLANT Physiol.* **1985**, *77* (2), 483–485. <https://doi.org/10.1104/pp.77.2.483>.
- (159) Wintermans, J. F. G. M.; De Mots, A. Spectrophotometric Characteristics of Chlorophylls a and b and Their Phenophytins in Ethanol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biophys. Photosynth.* **1965**, *109* (2), 448–453. [https://doi.org/10.1016/0926-6585\(65\)90170-6](https://doi.org/10.1016/0926-6585(65)90170-6).
- (160) Sun, L. Spectral and Nonlinear Optical Properties of Chlorophyll b Depends on Distortion of Two-Dimensional Electron Configuration along One Axis. *Dyes Pigments* **2004**, *61* (3), 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2003.10.017>.
- (161) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (7), 2039–2044. <https://doi.org/10.1021/ja00449a004>.
- (162) Caetano, W.; Tabak, M. Interaction of Chlorpromazine and Trifluoperazine with Anionic Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Micelles: Electronic Absorption and Fluorescence Studies. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *225* (1), 69–81. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6720>.
- (163) Meuwis, K.; Boens, N.; De Schryver, F. C.; Gallay, J.; Vincent, M. Photophysics of the Fluorescent K⁺ Indicator PBF1. *Biophys. J.* **1995**, *68* (6), 2469–2473. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80428-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80428-5).
- (164) Gerola, A. P.; Semensato, J.; Pellosi, D. S.; Batistela, V. R.; Rabello, B. R.; Hioka, N.; Caetano, W. Chemical Determination of Singlet Oxygen from Photosensitizers Illuminated with LED: New Calculation Methodology Considering the Influence of Photobleaching. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2012**, *232*, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.01.018>.
- (165) Rabello, B. R.; Gerola, A. P.; Pellosi, D. S.; Tessaro, A. L.; Aparício, J. L.; Caetano, W.; Hioka, N. Singlet Oxygen Dosimetry Using Uric Acid as a Chemical Probe: Systematic Evaluation. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2012**, *238*, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.04.012>.
- (166) Pérez-Rodríguez, M.; Prieto, G.; Rega, C.; Varela, L. M.; Sarmiento, F.; Mosquera, V. A Comparative Study of the Determination of the Critical Micelle Concentration by Conductivity and Dielectric Constant Measurements. *Langmuir* **1998**, *14* (16), 4422–4426. <https://doi.org/10.1021/la980296a>.
- (167) Al-Soufi, W.; Piñeiro, L.; Novo, M. A Model for Monomer and Micellar Concentrations in Surfactant Solutions: Application to Conductivity, NMR, Diffusion, and Surface Tension Data. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *370* (1), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.037>.
- (168) Mysels, K. J.; Otter, R. J. Conductivity of Mixed Sodium Decyl and Dodecyl Sulfates—the Composition of Mixed Micelles. *J. Colloid Sci.* **1961**, *16* (5), 462–473. [https://doi.org/10.1016/0095-8522\(61\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0095-8522(61)90023-X).
- (169) Garcia-Mateos, I.; Mercedes Velazquez, M.; Rodriguez, L. J. Critical Micelle Concentration Determination in Binary Mixtures of Ionic Surfactants

- by Deconvolution of Conductivity/Concentration Curves. *Langmuir* **1990**, *6* (6), 1078–1083. <https://doi.org/10.1021/la00096a009>.
- (170) Bielawska, M.; Chodzińska, A.; Jańczuk, B.; Zdziennicka, A. Determination of CTAB CMC in Mixed Water+short-Chain Alcohol Solvent by Surface Tension, Conductivity, Density and Viscosity Measurements. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *424*, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.017>.
- (171) Maskill, H. *Structure and Reactivity in Organic Chemistry*; Oxford chemistry primers; Oxford University Press: Oxford ; New York, 1999.
- (172) Bunton, C. A.; Farber, S. J. Hydrolysis of Bis(2,4-Dinitrophenyl) Phosphate. *J. Org. Chem.* **1969**, *34* (4), 767–772. <https://doi.org/10.1021/jo01256a001>.
- (173) Orth, E. S.; Wanderlind, E. H.; Medeiros, M.; Oliveira, P. S. M.; Vaz, B. G.; Eberlin, M. N.; Kirby, A. J.; Nome, F. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (19), 8003–8008. <https://doi.org/10.1021/jo2017394>.
- (174) Skoog, D. A. *Fundamentos de química analítica.*; Cengage Learnin: São Paulo, 2009.
- (175) Frescura, V. L. A.; Marconi, D. M. O.; Zanette, D.; Nome, F.; Blasko, A.; Bunton, C. A. Effects of Sulfobetaine-Sodium Dodecanoate Micelles on Deacylation and Indicator Equilibrium. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99* (29), 11494–11500. <https://doi.org/10.1021/j100029a030>.
- (176) *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design*, 3rd, rev.updated ed ed.; Smith, D. A., Ed.; Methods and principles in medicinal chemistry; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2012.
- (177) Gerola, A. P.; Tsubone, T. M.; Santana, A.; de Oliveira, H. P. M.; Hioka, N.; Caetano, W. Properties of Chlorophyll and Derivatives in Homogeneous and Microheterogeneous Systems. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (22), 7364–7373. <https://doi.org/10.1021/jp201278b>.
- (178) Agostiano, A.; Catucci, L.; Cosma, P.; Fini, P. Aggregation Processes and Photophysical Properties of Chlorophyll a in Aqueous Solutions Modulated by the Presence of Cyclodextrins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5* (10), 2122. <https://doi.org/10.1039/b211903j>.
- (179) Moreira, L. M.; Lima, A.; Soares, R. R. S.; Batistela, V. R.; Gerola, A. P.; Hioka, N.; Bonacin, J. A.; Severino, D.; Baptista, M. S.; Machado, A. E. da H.; Rodrigues, M. R.; Codognoto, L.; Oliveira, H. P. M. de. Metallochlorophylls of Magnesium, Copper and Zinc: Evaluation of the Influence of the First Coordination Sphere on Their Solvatochromism and Aggregation Properties. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20* (9), 1653–1658. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000900013>.
- (180) Fiedor, L.; Stasiek, M.; Mysliwa-Kurdziel, B.; Strzałka, K. Phytol as One of the Determinants of Chlorophyll Interactions in Solution. 11.
- (181) Gerola, A. P.; de Moraes, F. A. P.; Costa, P. F. A.; Kimura, E.; Caetano, W.; Hioka, N. Characterization of Chlorophyll Derivatives in Micelles of Polymeric Surfactants Aiming Photodynamic Applications. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *173*, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.019>.
- (182) Dhamsi, S.; Phillips, D. Comparison of the Photophysics of an Aggregating and Non-Aggregating Aluminium Phthalocyanine System Incorporated into

- Unilamellar Vesicles. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **1996**, *100* (1–3), 77–84. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(96\)04438-3](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(96)04438-3).
- (183) Pellosi, D. S.; Estevão, B. M.; Freitas, C. F.; Tsubone, T. M.; Caetano, W.; Hioka, N. Photophysical Properties of Erythrosin Ester Derivatives in Ionic and Non-Ionic Micelles. *Dyes Pigments* **2013**, *99* (3), 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.06.026>.
- (184) Pereira, P. C. de S.; Costa, P. F. do A.; Pellosi, D. S.; Calori, I. R.; Vilsinski, B. H.; Estevão, B. M.; Hioka, N.; Caetano, W. Photophysical Properties and Interaction Studies of Rose Bengal Derivatives with Biomimetic Systems Based in Micellar Aqueous Solutions. *J. Mol. Liq.* **2017**, *230*, 674–685. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.01.055>.
- (185) de Freitas, C. F.; Pellosi, D. S.; Estevão, B. M.; Calori, I. R.; Tsubone, T. M.; Politi, M. J.; Caetano, W.; Hioka, N. Nanostructured Polymeric Micelles Carrying Xanthene Dyes for Photodynamic Evaluation. *Photochem. Photobiol.* **2016**, *92* (6), 790–799. <https://doi.org/10.1111/php.12645>.
- (186) Fujiwara, M.; Tasumi, M. Resonance Raman and Infrared Studies on Axial Coordination to Chlorophylls a and b in Vitro. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90* (2), 250–255. <https://doi.org/10.1021/j100274a009>.
- (187) Menger, F. M.; Nome, F. Interaction vs Preorganization in Enzyme Catalysis. A Dispute That Calls for Resolution. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14* (7), 1386–1392. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b01029>.
- (188) Ormond, A.; Freeman, H. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials* **2013**, *6* (3), 817–840. <https://doi.org/10.3390/ma6030817>.
- (189) Küpper, H.; Dedic, R.; Svoboda, A.; Hála, J.; Kroneck, P. M. H. Kinetics and Efficiency of Excitation Energy Transfer from Chlorophylls, Their Heavy Metal-Substituted Derivatives, and Pheophytins to Singlet Oxygen. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2002**, *1572* (1), 107–113. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00284-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00284-2).
- (190) Jabben, M.; Garcia, N. A.; Braslavsky, S. E.; Schaffner, K. PHOTOPHYSICAL PARAMETERS OF CHLOROPHYLLS a AND b FLUORESCENCE AND LASER-INDUCED OPTOACOUSTIC MEASUREMENTS. *Photochem. Photobiol.* **1986**, *43* (2), 127–131. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1986.tb09503.x>.
- (191) Agostini, A.; Dal Farra, M. G.; Paulsen, H.; Polimeno, A.; Orian, L.; Di Valentin, M.; Carbonera, D. Similarity and Specificity of Chlorophyll b Triplet State in Comparison to Chlorophyll a as Revealed by EPR/ENDOR and DFT Calculations. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123* (39), 8232–8239. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07912>.
- (192) de Paula, J. C.; Robblee, J. H.; Pasternack, R. F. Aggregation of Chlorophyll a Probed by Resonance Light Scattering Spectroscopy. *Biophys. J.* **1995**, *68* (1), 335–341. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80192-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80192-X).
- (193) Delmarre, D.; Hioka, N.; Boch, R.; Sternberg, E.; Dolphin, D. Aggregation Studies of Benzoporphyrin Derivative. *Can. J. Chem.* **2001**, *79* (5–6), 1068–1074. <https://doi.org/10.1139/v01-043>.
- (194) Tessaro, A. L.; Batistela, V. R.; Gracetto, A. C.; Moisés de Oliveira, H. P.; Sernaglia, R. L.; de Souza, V. R.; Caetano, W.; Hioka, N. Stability of Benzoporphyrin Photosensitizers in Water/Ethanol Mixtures: PKa Determination and Self-Aggregation Processes. *J. Phys. Org. Chem.* **2011**, *24* (2), 155–161. <https://doi.org/10.1002/poc.1721>.

APÊNDICES

APÊNDICES

TABELAS

- Tabela A 1.** Concentrações críticas dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₄TAB e C₁₄TAB em água por condutividade e fluorescência. Medidas realizadas em 25,0 °C, [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹; [Py]=5,0x10⁻⁷mol L⁻¹ (para medidas de fluorescência). 211
- Tabela A 2.** Concentrações críticas dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₂TAB e C₁₂TAB em água por condutividade e fluorescência. Medidas realizadas em 25,0 °C, [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹; [Py]=5,0x10⁻⁷mol L⁻¹ (para medidas de fluorescência). 211
- Tabela A 3.** Concentrações críticas dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₀TAB e C₁₀TAB em água por condutividade e fluorescência. Medidas realizadas em 25,0 °C, [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹; [Py]=5,0x10⁻⁷mol L⁻¹ (para medidas de fluorescência). 211

FIGURAS

- Figura A 1.** Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₂TAB em função da concentração de C₁₂TAB em diferentes valores de pH: (A) pH 9,0, (B) pH 7,0 e (C) pH 6,0. As medidas foram realizadas em 25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹. 212
- Figura A 2.** Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₂TAB em função da concentração de C₁₂TAB em diferentes valores de pH: (A) pH 9,0, (B) pH 7,0 e (C) pH 6,0. As medidas foram realizadas em 25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹. 213
- Figura A 3.** Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₀TAB em função da concentração de C₁₀TAB em diferentes valores de pH: (A) pH 9,0 e (B) pH 7,0. As medidas foram realizadas em 25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹. 214
- Figura A 4.** Medidas de tensão superficial para determinação da concentração micelar crítica de surfactantes zwitteriônicos. Dados retirados da dissertação de mestrado do autor. 214

Tabela A 1. Concentrações críticas dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₄TAB e C₁₄TAB em água por condutividade e fluorescência. Medidas realizadas em 25,0 °C, [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹; [Py]=5,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ (para medidas de fluorescência).

PAIM + C ₁₄ TAB	Condutividade	Fluorescência
	CMC (mol L ⁻¹)	Concentração Crítica (mol L ⁻¹)
pH 9,0	3.8x10 ⁻³	1.4x10 ⁻⁴ (CAC)
pH 7,0	3.6x10 ⁻³	2.6x10 ⁻⁴ (CAC)
pH 6,0	3.6x10 ⁻³	2.6x10 ⁻⁴ (CAC) / 2.8x10 ⁻³ (CMC)
pH 3,0	3.6x10 ⁻³	3.0x10 ⁻³ (CMC)
C ₁₄ TAB	3.6x10 ⁻³	3.0x10 ⁻³ (CMC)

Tabela A 2. Concentrações críticas dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₂TAB e C₁₂TAB em água por condutividade e fluorescência. Medidas realizadas em 25,0 °C, [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹; [Py]=5,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ (para medidas de fluorescência).

PAIM + C ₁₂ TAB	Conductivity	Fluorescence
	CMC (mol L ⁻¹)	Critical concentration (mol L ⁻¹)
pH 9,0	1.6x10 ⁻²	2.0x10 ⁻³ (CAC)
pH 7,0	1.6x10 ⁻²	9.0x10 ⁻³ (CAC)
pH 6,0	1.6x10 ⁻²	1.3x10 ⁻² (CMC)
pH 3,0	1.5x10 ⁻²	1.3x10 ⁻² (CMC)
C ₁₂ TAB	1.6x10 ⁻²	1.3x10 ⁻² (CMC)

Tabela A 3. Concentrações críticas dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₀TAB e C₁₀TAB em água por condutividade e fluorescência. Medidas realizadas em 25,0 °C, [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹; [Py]=5,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ (para medidas de fluorescência).

PAIM + C ₁₀ TAB	Conductivity	Fluorescence
	CMC (mol L ⁻¹)	Critical concentration (mol L ⁻¹)
pH 9,0	7.8x10 ⁻²	1.5x10 ⁻² (CAC)
pH 7,0	7.8x10 ⁻²	-
pH 6,0	7.8x10 ⁻²	-
pH 3,0	7.7x10 ⁻²	5.5x10 ⁻² (CMC)
C ₁₀ TAB	7.8x10 ⁻²	5.5x10 ⁻² (CMC)

Figura A 1. Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₂TAB em função da concentração de C₁₂TAB em diferentes valores de pH: (A) pH 9,0, (B) pH 7,0 e (C) pH 6,0. As medidas foram realizadas em 25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹.

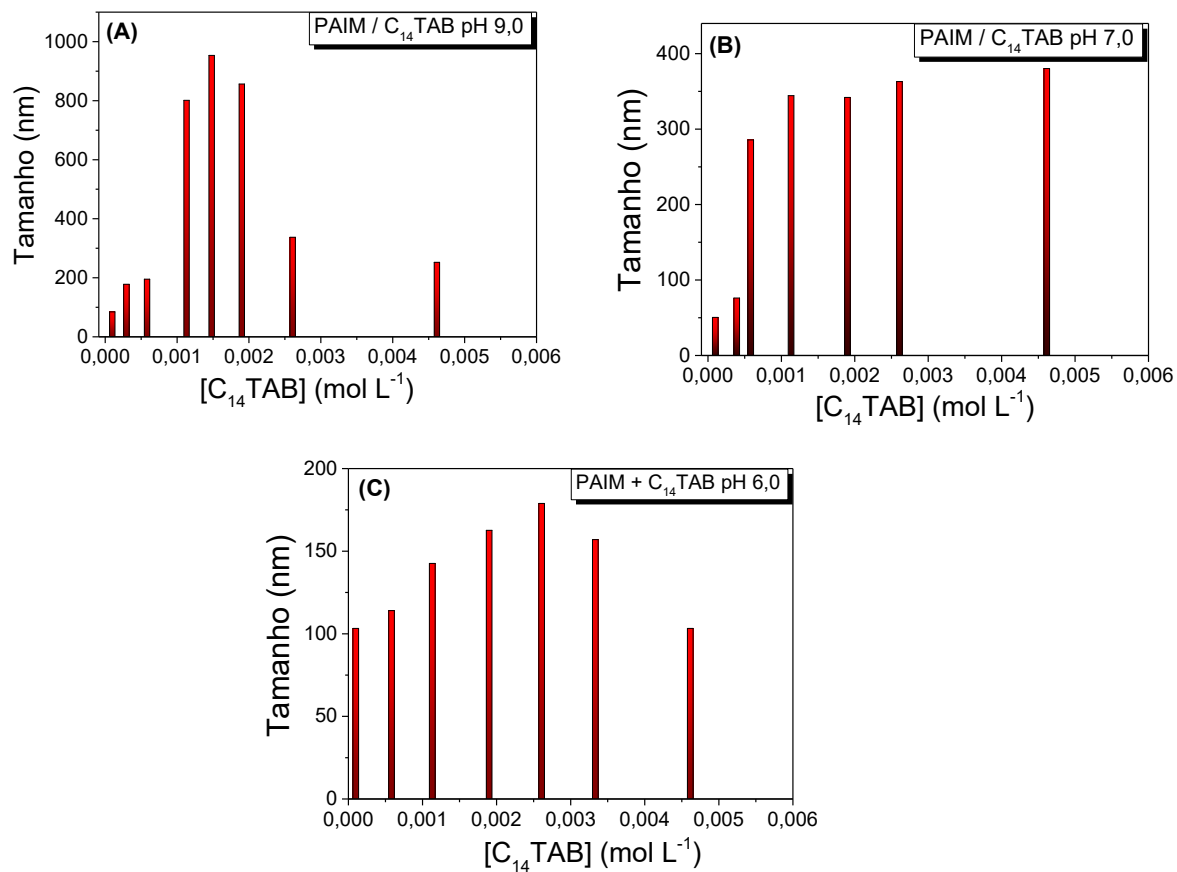


Figura A 2. Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₂TAB em função da concentração de C₁₂TAB em diferentes valores de pH: (A) pH 9,0, (B) pH 7,0 e (C) pH 6,0. As medidas foram realizadas em 25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹.

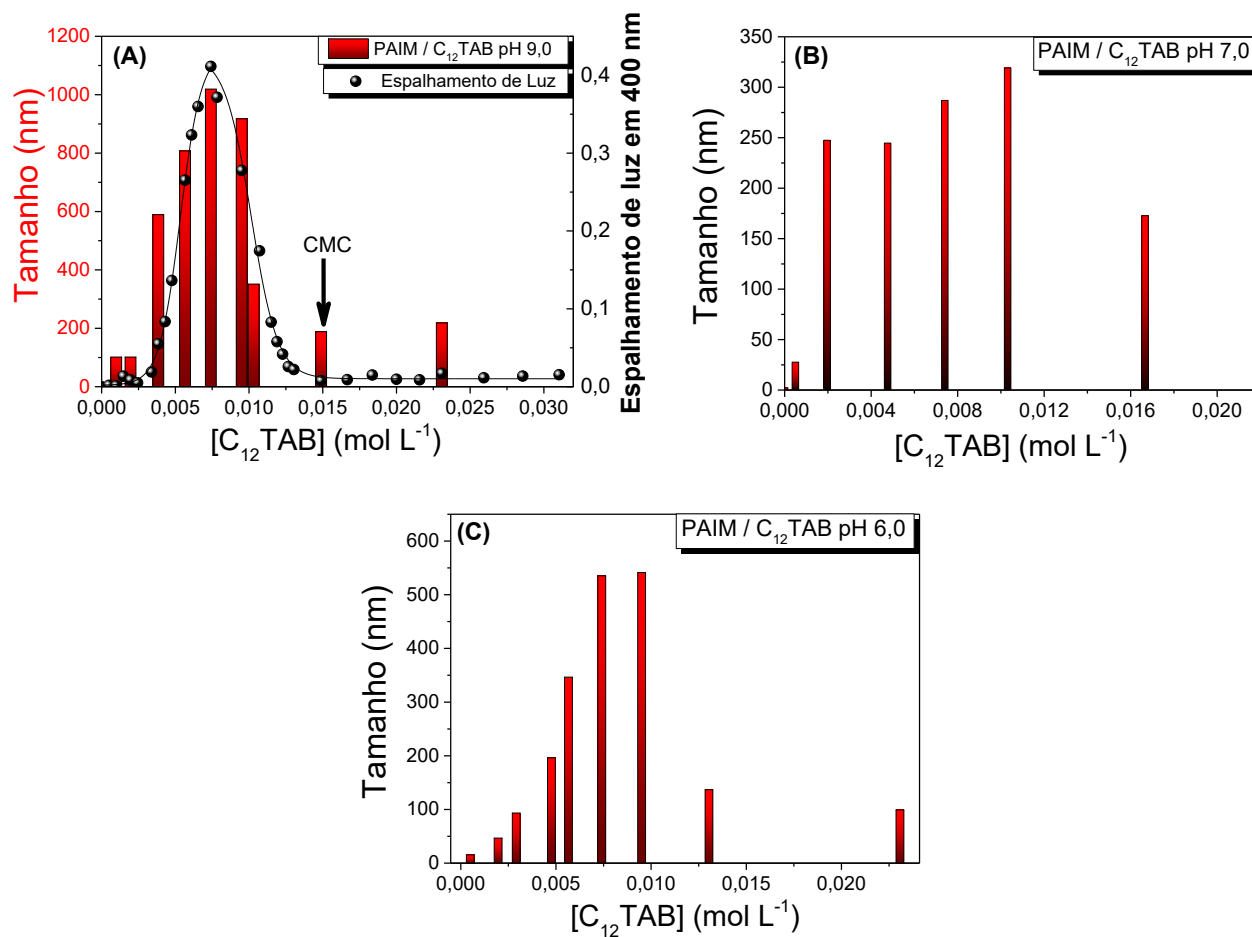


Figura A 3. Diâmetros hidrodinâmicos dos complexos supramoleculares PAIM / C₁₀TAB em função da concentração de C₁₀TAB em diferentes valores de pH: (A) pH 9,0 e (B) pH 7,0. As medidas foram realizadas em 25,0 °C e [PAIM]=2x10⁻⁴ mol L⁻¹.

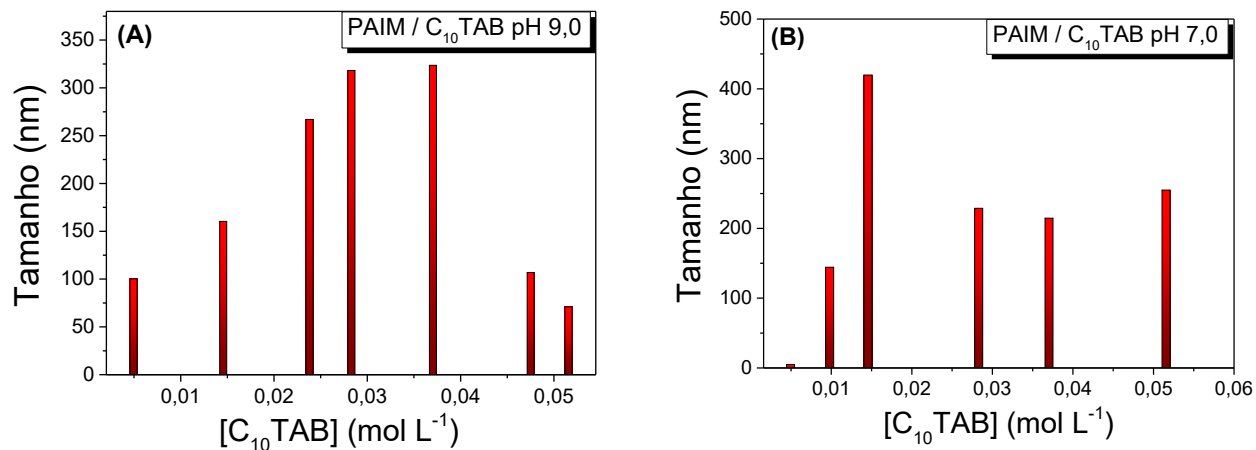


Figura A 4. Medidas de tensão superficial para determinação da concentração micelar crítica de surfactantes zwitteriônicos. Dados retirados da dissertação de mestrado do autor.

