

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA



UTILIZAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS NA  
OBTENÇÃO DE GLICOSE A PARTIR DE  
MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E NO  
ESTUDO MECANÍSTICO DA REAÇÃO DE  
UGI

**ALUNA: GISELE ALVES MEDEIROS**

ORIENTADOR: PROF. DR. BRENNO AMARO DA SILVEIRA NETO

COORIENTADORA: DRA. DASCIANA DE SOUSA RODRIGUES GAMBETTA

BRASÍLIA, MARÇO DE 2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



UTILIZAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS NA  
OBTENÇÃO DE GLICOSE A PARTIR DE  
MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E NO  
ESTUDO MECANÍSTICO DA REAÇÃO DE  
UGI

**Aluna: Gisele Alves Medeiros**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Química como pré-  
requisito para obtenção do título de Mestre.

**Brasília, março de 2014**

## Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha família. A minha mãe Maria, ao meu pai José e aos meus irmãos Ricardo e Jefferson. Pelo carinho, amor e compreensão. Por incentivar e apoiarem minhas escolhas. Por serem meu porto seguro!

## Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida. Por me permitir acordar todos os dias e poder desfrutar das maravilhas que Ele criou. Por fazer da minha vida uma história de amor e superação. Por me mostrar que cada pequeno acontecimento está inserido em um plano de salvação maior. Por me amar independente de qualquer coisa e por nunca ter me abandonado.

Agradeço a minha família pelo apoio e compreensão. Em especial minha mãe Maria, por ser minha principal fonte de inspiração. Por todo sacrifício dedicado aos meus estudos e a minha carreira. Ao meu pai José por sempre estar disposto a me ajudar e proporcionar o melhor para mim. Aos meus pais agradeço pelo amor incondicional. Aos meus irmãos Jefferson e Ricardo pelo companheirismo, carinho e amizade.

Agradeço ao meu orientador e amigo Brenno pela dedicação a mim e a minha carreira. Pelas conversas científicas, por sempre estar disponível para tirar as dúvidas que sempre surgem, por me ensinar a conduzir um trabalho científico e por tantas outras coisas que deixei passar despercebido e que merecem ser agradecidas. Grande parte do meu amadurecimento pessoal e profissional é a ele atribuído. Não posso deixar de agradecer, também, pela amizade.

Agradeço meus amigos e companheiros de laboratório que acabaram se tornando minha segunda família: Haline (Halinizinha), Thyago (Thythy), Marcelo, Pedro (Pimy), Raquel (Retchulll), Renata (Baby), Júlia, Alberto, Diego, Aline, Felipe, Rômulo, Marina, Pedro M., Pedro G., Betinho, Jefferson, Tiago, Daniela, Jéssica, Thaynara e a todos que passaram pelo laboratório e fizeram os dias de trabalho mais agradáveis.

Agradeço a minha coorientadora Dasciana pela paciência e orientação. Agradeço as analistas da EMBRAPA Thaís, Thálita e Carol pela paciência em passar seus conhecimentos de laboratório.

Agradeço as amigas de graduação, que mesmo após a conclusão do curso ainda estão presentes na minha vida e sempre vão estar no meu coração: Kênia, Juliete, Mayra (e Luca), Evelyn, Paula.

Agradeço aos meus compadres Daniela e Paulo Henrique por terem me escolhido como madrinha de seu filho. Por confiarem a mim esse papel tão importante. Agradeço aos meus lindos afilhados Daniel e Gabriel, por fazerem dos meus dias mais felizes e cheios de vida.

Por fim e não menos importante, agradeço aos meus avos Josefa, Francisca e Espedito pelo amor e carinho apesar da distância. Aos meus tios e tias: Neguinha e Alex, Dineide e Adailton, Valdirene, Cleide, Dilene, Dinir e Alice, Denor e Maria, Ilda e Inácio, Maria, Nenem, Geraldo e Dinalva, Bastim e Nice, Paulo, Deassis, Valdina, Dachaga e Ritinha, Rose e Wandir, Sula e Janduir, Neto e Carminha. E todos os primos e primas, por todas as tardes de churrascos com conversas agradáveis e por todas as viagens extremamente divertidas.

## Sumário

<b>Dedicatória .....</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>iv</b>
<b>Sumário.....</b>	<b>vi</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Abreviações e Acrônimos .....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Esquemas .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>xv</b>
<b>Capítulo 1: Obtenção de Glicose a Partir de Material Lignocelulósico Utilizando o Líquido Iônico BMI.NTf<sub>2</sub>.....</b>	<b>1</b>
<i>1 - Introdução:</i> .....	2
1.1 - Pré-tratamento em materiais lignocelulósicos .....	6
1.2 - Gargalos na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.....	10
1.3 - Aplicações de líquidos iônicos para a hidrólise de biomassa .....	13
<i>2- Objetivos</i> .....	17
2.1- Objetivo geral.....	17
2.2- Objetivos Específicos .....	17
<i>3 - Parte Experimental</i> .....	18
3.1 - Determinação de Atividades Enzimáticas em Tubos .....	18
3.1.1 - Determinação da atividade total de celulase (FPase) utilizando papel filtro .....	18
3.1.1.1 - Preparo de soluções .....	18
3.1.1.2 - Ensaio de hidrólise do papel e quantificação do produto.....	20
3.1.1.3 - Cálculo da atividade enzimática em papel.....	22
3.1.2- Determinação da atividade de endoglicanase utilizando CMC .....	24
3.1.2.1 - Preparo de soluções .....	24
3.1.2.2 - Ensaio de hidrólise de carboximetilcelulose e quantificação dos produtos ..	24

3.1.2.3 - Cálculo da atividade enzimática em carboximetilcelulose .....	26
3.1.3 - Determinação da atividade de exoglicanase utilizando avicel .....	27
3.1.3.1 - Preparo de soluções .....	27
3.1.3.2 - Ensaio de hidrólise de avicel e quantificação dos produtos .....	27
3.1.3.3 - Cálculo da atividade enzimática em avicel .....	29
3.1.4- Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase utilizando celobiose .....	30
3.1.4.1 - Preparo de soluções .....	30
3.1.4.2 - Ensaio de hidrólise de celobiose e quantificação dos produtos .....	30
3.1.4.3 - Cálculo da atividade enzimática em celobiose .....	32
3.2 - Determinação da Atividade Enzimática em Microescala .....	33
3.2.1 - Determinação da atividade total de celulase (FPase) utilizando papel filtro .....	33
3.2.1.1 - Preparo de soluções .....	33
3.2.1.2 - Ensaio de hidrólise de papel e quantificação dos produtos .....	33
3.2.1.3 - Cálculo da atividade enzimática em papel .....	35
3.2.2 – Determinação da atividade de endoglicanase utilizando CMC .....	36
3.2.2.1 - Preparo de soluções .....	36
3.2.2.2 - Ensaio de hidrólise de carboximetilcelulose e quantificação dos produtos .....	36
3.2.2.3 - Cálculo da atividade enzimática em carboximetilcelulose .....	38
3.2.3- Determinação da atividade de exoglicanase utilizando avicel .....	38
3.2.3.1 - Preparo de soluções .....	38
3.2.3.2 - Ensaio de hidrólise de avicel e quantificação dos produtos .....	39
3.2.3.3 - Cálculo da atividade enzimática em avicel .....	40
3.2.4- Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase utilizando celobiose .....	40
3.2.4.1 - Preparo de soluções .....	40
3.2.4.2 - Ensaio de hidrólise de celobiose e quantificação dos produtos .....	41
3.2.4.3 - Cálculo da atividade enzimática em celobiose .....	42
3.3 – Pré-tratamento e caracterização da biomassa .....	42
3.3.1 - Caracterização da biomassa .....	42
3.3.2 - Pré-tratamento .....	43
3.4 - Síntese do LI bis(trifluorometano-sulfonil)imidato de 1- <i>n</i> -butil-3- <i>n</i> -metilimidazolio (BMI.NTf <sub>2</sub> ) .....	44
3.5 - Hidrólise enzimática de biomassa utilizando LI .....	45
3.5.1 - Efeito da força iônica na separação de fases aquosa e LI .....	46
3.5.2 - Partição de glicose nas fases aquosa e LI .....	46
3.5.3 – Estabilidade das celulasas na presença de LI .....	47
3.5.4 - Hidrólise da biomassa in natura .....	47
3.5.5 - Hidrólise da biomassa pré-tratada .....	49
4 - Resultados e Discussão .....	51
4.1 - Atividades enzimáticas do extrato Cellic Ctec 2 em tubo e microensaio .....	51
4.2 - Partição da glicose em tampão e LI .....	52

4.3 - Definição do sistema Líquido Iônico: Solução enzimática .....	53
4.3.1 - Efeito da concentração de tampões e definição do tempo na separação de LI da fase aquosa.....	54
4.3.2 - Efeito da concentração de LI no rendimento da hidrólise enzimática.....	55
4.3.3 - Uso de LI antes e durante a hidrólise enzimática .....	57
4.4 - Estabilidade de celulases na presença de LI.....	59
4.5 - Hidrólise enzimática de biomassa na presença de LI .....	60
4.5.1 - Hidrólise enzimática de biomassa sem pré-tratamento na presença de LI .....	60
4.5.2 - Hidrólise enzimática de biomassa pré-tratada.....	61
4.5.2 - Efeito da carga de sólido sobre o rendimento de hidrólise enzimática .....	63
5- <i>Conclusão e Perspectivas</i> .....	65

**Capítulo 2: Estudo mecanístico da reação de Ugi quatro componentes utilizando-se líquidos iônicos de função específica como reagentes ionicamente marcados por ESI-MS(/MS) ..... 66**

1 - <i>Introdução</i> .....	67
1.1 - Reação de UGI (U4CR) .....	69
1.2 - Técnicas de detecção de intermediários reacionais e limitações .....	71
2 - <i>Objetivos</i> .....	72
2.1 – <i>Objetivos Gerais</i> .....	72
2.2 - <i>Objetivos Específicos</i> .....	72
3 - <i>Parte Experimental</i> .....	73
3.1 - Síntese dos Líquidos Iônicos utilizados como marcadores de carga .....	73
3.2 - Síntese das reações de quatro componentes de Ugi.....	74
3.3 - Metodologia do experimento de detecção .....	74
3.4 - Cálculos teóricos .....	75
4- <i>Resultados e Discussão</i> .....	76
5 - <i>Conclusão e Perspectivas</i> .....	89
<b>3 - Referências .....</b>	<b>91</b>



## Resumo

Na primeira parte deste trabalho é apresentado um estudo metodológico de otimização da obtenção de glicose a partir de materiais lignocelulósicos utilizando o líquido iônico bis(trifluorometano-sulfonil)imidato de 1-*n*-butil-3-metilimidazolio como suporte enzimático. Apesar de ter sido observada uma queda da atividade enzimática quando em contato com o líquido iônico, o sistema catalítico se mostrou extremamente eficiente ao evitar a inibição enzimática pelo produto por ela produzido (glicose). Na segunda parte é apresentado um estudo mecanístico da reação de Ugi quatro componentes utilizando-se líquidos iônicos de função específica e espectrometria de massas - ESI-MS(/MS) - como base. O estudo permitiu a indicação de um caminho reacional preferencial para a reação.

## Abstract

In the first part of this work it is presented a methodological study aiming at an optimized condition towards glucose obtainment from lignocellulosic materials using the 1-*n*-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethane)sulfonimide ionic liquid as the enzyme support. Despite some decrease on the catalytic activity of the enzyme in the ionic liquid support, the catalytic system proved to be very efficient to avoid enzyme inhibition after the product generation (glucose). In the second part a mechanistic study is presented regarding the four-component Ugi reaction by using task-specific ionic liquids and mass spectrometry - ESI-MS(/MS) - as the basic technique. The study allowed the proposition of a preferred reaction pathway.

## Lista de Abreviaes e Acrnimos

Cloreto de 1-n-butil-3-n-metilimidazolio	BMI.Cl
cidodinitrossaliclico	DNS
Aares Redutores Totais	ART
Atividade de celobiohidrolases	CB
Atividade total da celulase	FPase
bis(trifluorometano-sulfonil)imidato de 1-n-butil-3-n-metilimidazolio	BMI.NTf2
Carboximetilcelulose	CMC
Cellic Ctec 2	CC2
Líquido Iônico	LI
Líquidos iônicos de função específica	TSLI
Reação de 4 componentes de Ugi	U4RC
Reação em cadeia pela polimerase	PCR
Reações multicomponentes	RMC

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Representação ilustrativa da constituição de materiais lignocelulósicos. Adaptada da referência 16.....	6
<b>Figura 2</b> - Hidrólise enzimática de <i>Brachiaria brizantha</i> submetida a dois pré-tratamentos diferentes: A) ácido (1,5% v/v) e B) ácido (1,5% v/v) seguido de alcalino (4,0% p/v). Adaptada da referência 54.....	11
<b>Figura 3</b> - Representação estrutural 3D de dois LIs derivado do cátion imidazolio. Adaptada da referência 67.....	14
<b>Figura 4</b> – Gráfico da concentração de glicose (g/L) x tempo (h) da solução padrão de glicose em contato com o LI e do controle da reação (apenas solução padrão de glicose). .....	53
<b>Figura 5</b> - À esquerda, com borda azul, são os sistemas após 2 h de agitação e 5 min de repouso. À direita, com borda verde, são os sistemas após 24 h de agitação e 5 min de repouso. Nos dois casos, as soluções da esquerda para a direita são: água + LI, tampão 0,1 M + LI e tampão 0,005 M + LI.....	54
<b>Figura 6</b> – Gráfico da concentração de glicose (g/L) formada ao longo do tempo reacional (h) para as três reações com volumes diferentes de LI e para o “controle” (sem LI).....	55
<b>Figura 7</b> – Gráfico da quantidade de glicose (g) formada nas reações ao longo do tempo (h) para as três reações com volumes diferentes de LI e para o “controle” (sem LI).....	56
<b>Figura 8</b> – Gráfico comparativo da concentração de glicose gerada (g/L) x tempo (h) da reação de hidrólise da biomassa previamente aquecida em LI e da biomassa sem aquecimento. ....	58
<b>Figura 9</b> – Gráfico da atividade enzimática total – Fpase ( $\square$ mol/min.mL) x tempo (h). ....	59
<b>Figura 10</b> – Gráfico da concentração de glicose (g/L) x tempo (h) da biomassa sem pré-tratamento.....	60
<b>Figura 11</b> – Gráfico do rendimento reacional a esquerda e a direita concentração de glicose (g/L) x tempo (h) da reação da biomassa pré-tratada e hidrolisada (com e sem LI).....	61
<b>Figura 12</b> – Gráfico da concentração de glicose (g/L) x tempo (h) da hidrólise da biomassa pré-tratada e hidrolisada (com e sem LI) após a dição de solução enzimática e mais biomassa (1,470 g).....	62
<b>Figura 13</b> – Gráfico da concentração de glicose (g/L) x tempo (h) da da biomassa pré-tratada e hidrolisada (com e sem LI) após a dição de apenas biomassa (1,470 g). ....	63
<b>Figura 14</b> - Líquidos iônicos utilizados na reação: cloreto de 1-metil-3-carboximetilimidazolio (MAI.Cl) (1) e brometo de 3-(2-aminoetil)-1-metilimidazolio (LI-NH <sub>2</sub> ) (2). ....	77
<b>Figura 15</b> - ESI(+)-MS/MS da solução metanólica do marcador de carga MAI.Cl. O pico de m/z 141 é referente ao cátion MAI.....	77
<b>Figura 16</b> - ESI(+)-MS/MS da solução metanólica da amina marcada. O sinal de m/z 126 é referente ao cátion da amina marcada. ....	78
<b>Figura 17</b> - Possíveis intermediários da reação U4CR utilizando reagentes "neutro". ....	79
<b>Figura 18</b> - Possíveis intermediários da reação U4CR utilizando o MAI.Cl como o ácido carboxílico da reação. ....	79
<b>Figura 19</b> – ESI(+)-MS de alta resolução da reação U4CR utilizando o MAI.Cl como o ácido carboxílico da reação (m/z 141). ....	80
<b>Figura 20</b> – Espectro de ESI(+)-MS/MS do intermediário catiônico <b>Ib</b> (m/z 120). ....	80
<b>Figura 21</b> - ESI(+)-MS/MS do sinal de m/z 191 (um fragmento da molécula de m/z 247). ....	81

---

<b>Figura 22</b> - ESI(+)-MS/MS do íon de $m/z$ 343, que evidencia que a fragmentação é coerente apenas com o produto formado após o rearranjo de Mumm. ....	83
<b>Figura 23</b> – Tempo de vôo do íon de $m/z$ 343 na drift cell. Para o nitrogênio ( $N_2$ ) o fluxo de gás foi igual a $45 \text{ mL min}^{-1}$ (2,19 mbar), a velocidade da onda foi de $250 \text{ ms}^{-1}$ e a altura de onda foi de 30 V. Para $CO_2$ o fluxo de gás foi igual a $50 \text{ mL min}^{-1}$ (1,54 mbar), a velocidade da onda foi de $200 \text{ ms}^{-1}$ e altura de onda foi igual a 30 V. ....	84
<b>Figura 24</b> - M062X/6-311+G(2d,2p)//M062X/6-31+G(d,p) perfil da energia relativa do rearranjo de Mumm ( <b>IVb</b> $\rightarrow$ <b>Vb</b> ) em metanol. ....	85
<b>Figura 25</b> - Possíveis intermediários da reação U4CR utilizando o LI-NH <sub>2</sub> como a amina da reação. ....	85
<b>Figura 26</b> - ESI(+)-MS da reação de U4RC usando a amina marcada (LI-NH <sub>2</sub> , $m/z$ 126), boc-glicina, formaldeído e t-butil isocianeto. ....	86
<b>Figura 27</b> - ESI(+)-MS/MS do íon de $m/z$ 138. ....	87
<b>Figura 28</b> - ESI(+)-MS/MS do íon de $m/z$ 221. ....	87

## Lista de Esquemas

<b>Esquema 1</b> - Fluxograma do processo de obtenção de etanol e outros produtos renováveis a partir de biomassa vegetal. Adaptado das referências 11 e 12.....	4
<b>Esquema 2</b> - Alguns dos produtos provenientes da fermentação da glicose e algumas reações de transformação do ácido láctico em produtos químicos comerciais. Adaptado da referência 13.....	5
<b>Esquema 3</b> - Representação esquemática ilustrativa da hidrólise enzimática da celulose. Adaptada da referência 55.....	12
<b>Esquema 4</b> - Ordem decrescente de estabilização (antes da “  ”) e desestabilização (depois da “  ”) da estrutura enzimática gerada por alguns ânions. Adaptado da referência 74.....	15
<b>Esquema 5</b> - Ordem decrescente de estabilização (antes da “ ”) e desestabilização (depois da “ ”) da estrutura enzimática gerada por alguns cátions. Adaptado da referência 74.....	16
<b>Esquema 6</b> - Representação esquemática do procedimento experimental de determinação da atividade enzimática FPase em tubos.....	22
<b>Esquema 7</b> - Representação esquemática do procedimento experimental de determinação da atividade enzimática em microescala.....	35
<b>Esquema 8</b> . Síntese do BMI.Cl. ....	45
<b>Esquema 9</b> - Síntese do BML.NTf <sub>2</sub> .....	45
<b>Esquema 10</b> - Representação da síntese de uma molécula complexa por duas vias: síntese linear e síntese via reação multicomponente. “GF” representa grupo funcional. Adaptado das referências 88 e 89.....	67
<b>Esquema 11</b> – Cronologia da descoberta e estudos das RMC mais visadas. Adaptado da referência 84..	68
<b>Esquema 12</b> – Primeira proposta mecanística para a U4CR.....	70
<b>Esquema 13</b> – Proposta mecanística em que há primeiramente a inserção do ácido à base de Schiff. ....	71
<b>Esquema 14</b> – Síntese do líquido iônico cloreto de 1-(3-aminoetil)-3-metilimidazolio.....	73
<b>Esquema 15</b> – Síntese do líquido iônico cloreto de 1-metil-3-carboximetilimidazolio (MAI.Cl).....	74
<b>Esquema 16</b> – Dois possíveis mecanismos da reação de U4CR antes do rearranjo de Mumm que leva ao aduto de Ugi.....	76
<b>Esquema 17</b> - ESI(+)-MS/MS do sinal de $m/z$ 247 (um subproduto da reação).....	81
<b>Esquema 18</b> - ESI(+)-MS/MS do subproduto do intermediário catiônico de $m/z$ 221 e, na parte inferior, uma proposta mecanística para sua formação.....	82
<b>Esquema 19</b> – Ilustração do mecanismo de conversão da molécula <b>IV</b> para <b>V</b> via rearranjo de Mumm..	83

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** - Atividades do extrato enzimático total (FPase),  $\beta$ -glicosidase (celobiase), celobiohidrolase (avicelase) e endoglicanase (CMCase). Os ensaios de hidrólise dos substratos foram realizados em, no mínimo, sextuplicata e os valores de média e desvio padrão foram dispostos na tabela. .... 51

Capítulo 1: Obtenção de Glicose a Partir de Material  
Lignocelulósico Utilizando o Líquido Iônico  
BMI.NTf<sub>2</sub>



## 1 - Introdução:

A maior parte da crosta terrestre é recoberta por vegetais, também denominados materiais lignocelulósicos, que são constituídos principalmente de celulose, lignina e hemicelulose.<sup>1</sup>

A celulose, presente em materiais lignocelulósicos, pode ser utilizada na forma polimérica para produção de papel, fibras artificiais, ser modificada para produção de lubrificantes, dentre outras aplicações, ou pode ser submetida a outra etapa reacional denominada hidrólise enzimática em que é convertida em glicose, ou seja, a celulose é quebrada em seus monômeros de origem. Ao se submeter essa glicose recém obtida a um processo de fermentação é possível converter o material em subprodutos que podem ser utilizados como reagentes de partida de diversos produtos comerciais de alto valor agregado.

Um importante produto da fermentação da glicose e o mais produzido é o etanol, que é utilizado como biocombustível por automóveis e motores.<sup>2,3</sup> Biocombustíveis são combustíveis obtidos de fontes naturais renováveis.<sup>4</sup> O investimento no desenvolvimento de tecnologias que facilitem e barateiem a produção destes tem aumentado consideravelmente nos últimos anos.

O etanol é um dos biocombustíveis que tem recebido maior atenção por parte das pesquisas acadêmicas. Esse destaque pode ser explicado pelas vantagens apresentadas pelo material quando comparado aos combustíveis de origem fóssil: sua produção gera menos resíduos, emite menor quantidade de gases poluentes em sua queima, é obtido de fontes naturais renováveis e causa menos dano ao motor dos carros, pois sua combustão é quase que completa não havendo formação de subprodutos que depositem no motor.<sup>5</sup>

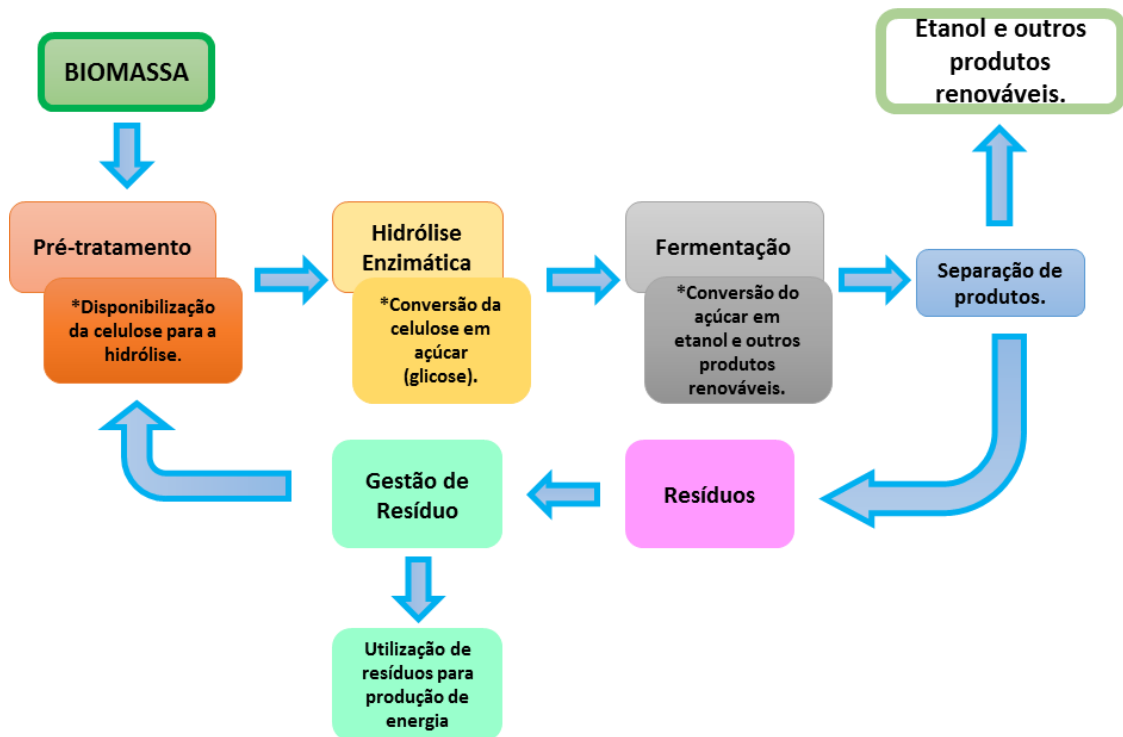
A obtenção do etanol disponível comercialmente é principalmente do tratamento do sumo da cana-de-açúcar (Brasil) e do amido presente no milho (Estados Unidos), sendo essas formas de obtenção denominadas de primeira geração. Entretanto o etanol de 1ª geração apresenta alguns entraves ambiental e comercialmente falando. Muitos pesquisadores afirmam que esse tipo de produção provoca a diminuição de terras disponíveis para produção de alimentos, fazendo com que ocorra inflação dos mesmos.<sup>6</sup> Outro ponto negativo é o desmatamento de florestas feito pelos fazendeiros com objetivo de aumentar suas plantações. E por esse último motivo existem pesquisas feitas que

afirmam que o débito de carbono gerado na produção de etanol de primeira geração é muito maior que o da produção de gasolina.<sup>7</sup>

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (de segunda geração) surge como uma oportunidade de se aumentar o custo benefício global do processo citado anteriormente. No caso da cana-de-açúcar é possível se aumentar a produção de etanol em cerca de 40% em relação a uma mesma área plantada quando se aproveita o bagaço e a parte celulósica descartada na produção de etanol de 1ª geração,<sup>8</sup> tornando, assim, o processo mais autossustentável.

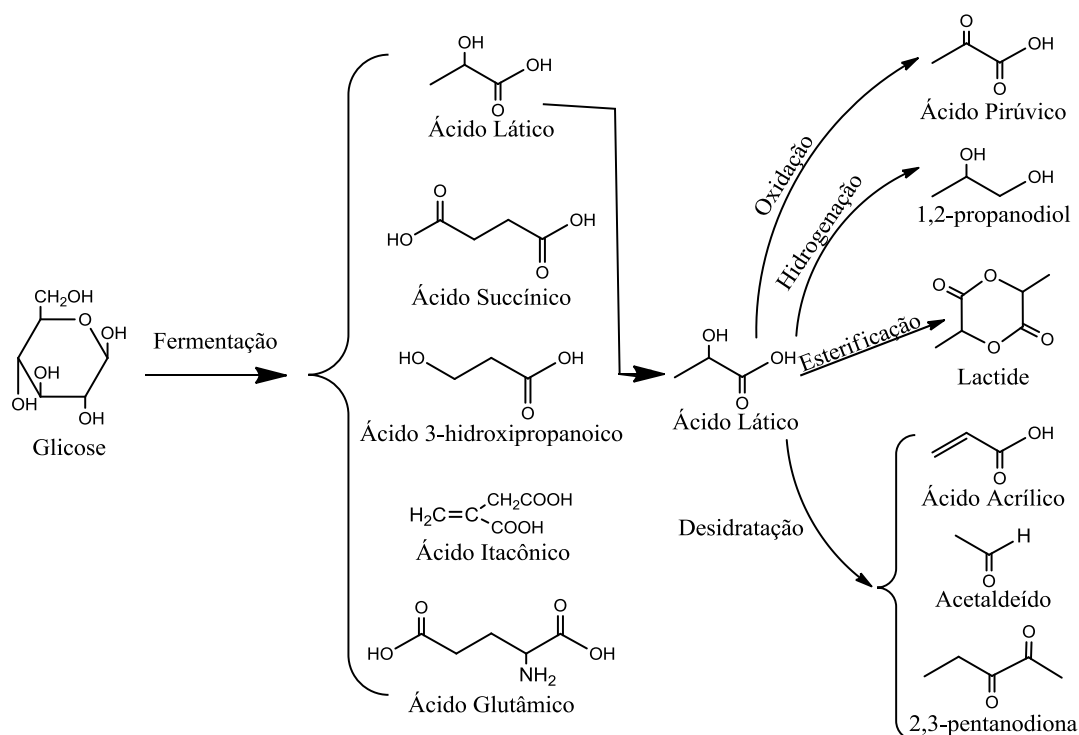
Diariamente milhares de toneladas de material lignocelulósico são descartadas como lixo. Sendo originário principalmente da indústria de alimentos, têxtil, de construção (dentre outras), sua composição é variável: palha de milho, capim que cresce em volta da plantação, resto de madeira de indústrias e madeireiras, resíduos florestais, algas. Anualmente a quantidade de rejeito gerada alcança cerca de 40 milhões de toneladas.<sup>9</sup>

Essa grande quantidade de matéria-prima chama atenção para o desenvolvimento e aprimoramento de metodologias de obtenção do etanol assim como de outros produtos renováveis. O processo de transformação da biomassa em etanol e outros produtos renováveis é constituído por algumas etapas básicas. O material primeiramente é pré-tratado, hidrolisado e o produto final dessas etapas (o açúcar, glicose) é fermentado, gerando etanol e/ou outros produtos. A parte final do processo é a separação e purificação dos produtos.<sup>10</sup> O Esquema 1 ilustra as etapas do processo de geração de etanol e outros produtos renováveis com o auxílio de um fluxograma.



**Esquema 1** - Fluxograma do processo de obtenção de etanol e outros produtos renováveis a partir de biomassa vegetal. Adaptado das referências 11 e 12.

O interesse na conversão da celulose através de processos fermentativos tem aumentado consideravelmente pelo fato do preço do petróleo estar cada vez mais elevado, fazendo com que os produtos obtidos de suas frações também enfrentem o mesmo problema. Sendo assim, a utilização de biomassa vegetal para suprir algumas demandas por produtos químicos se torna cada vez mais interessante.<sup>13</sup> O Esquema 2 ilustra a conversão da glicose em alguns importantes produtos para Indústria Química.



**Esquema 2** - Alguns dos produtos provenientes da fermentação da glicose e algumas reações de transformação do ácido láctico em produtos químicos comerciais. Adaptado da referência 13.

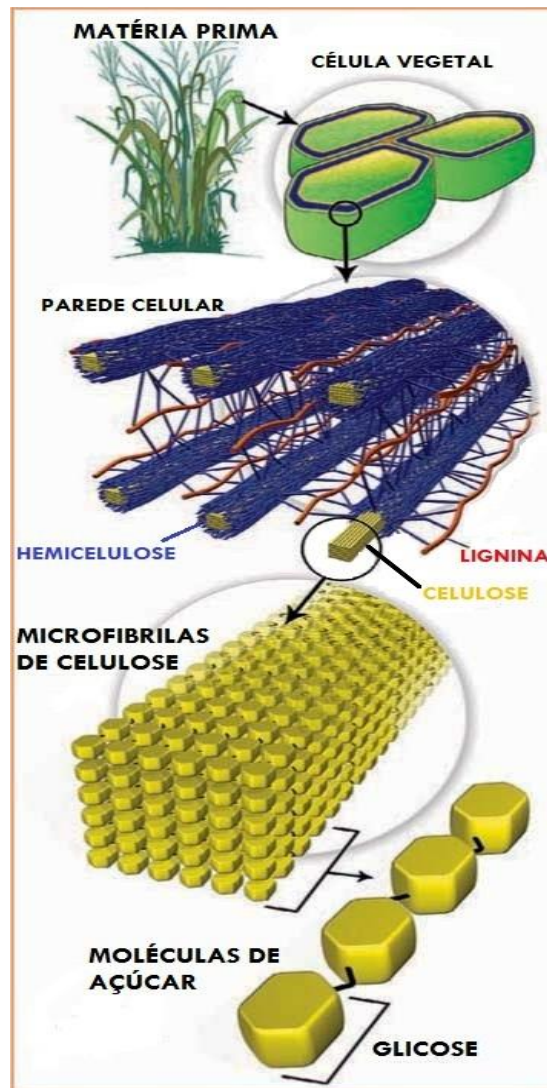
Os produtos obtidos diretamente da fermentação da glicose podem ser tratados e utilizados como reagentes de partida para diversos outros produtos químicos. O ácido láctico, por exemplo, pode ser convertido diretamente, por metodologias diferentes, em: ácido acrílico, acetaldeído, 2,3-pentanediona, 1,2-propanodiol, lactatos, ácido pirúvico, dentre outros como pode-se observar no Esquema 2.<sup>13,14,15</sup>

A produção de glicose a partir de materiais lignocelulósicos pode ser realizada por métodos químicos ou enzimáticos, ou ainda por uma combinação destes métodos. Considerando questões operacionais, ambientais e econômicas, a produção da glicose a partir de biomassa vegetal usando métodos combinados como, por exemplo, uma etapa de pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática tem se mostrado mais promissora quando comparada a processos químicos ou enzimáticos isoladamente. Entretanto, ainda existem diversos desafios a serem superados para que o processo aumente o rendimento e produtividade.

Alguns fundamentos, gargalos e avanços relacionados ao processo de produção de glicose a partir de biomassa vegetal serão apresentados nos itens a seguir, enfatizando o uso de líquidos iônicos como facilitadores da ação enzimática sobre a celulose, o que é objeto de estudo neste trabalho.

## 1.1 - Pré-tratamento em materiais lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos são constituídos principalmente por: celulose, hemicelulose e lignina. Com o auxílio da Figura 1 é possível observar um esquema ilustrativo da disposição dos três principais componentes da parede celular vegetal.



**Figura 1-** Representação ilustrativa da constituição de materiais lignocelulósicos. Adaptada da referência 16.

A molécula de celulose é formada por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, entre anéis de glicose, formando longas cadeias poliméricas lineares que se associam por interações de hidrogênio. A alta organização e empacotamento das cadeias de celulose associados às fortes interações intermoleculares estabelecidas entre as mesmas conferem ao material a característica de ser insolúvel em água e em grande parte dos solventes orgânicos clássicos.<sup>17</sup> Por ser uma das biomacromoléculas mais abundantes na natureza,

economicamente acessível, obtida de fontes renováveis e possuir aplicações das mais diversas, a celulose ocupa um lugar de destaque na indústria.<sup>18</sup>

Ao longo de muitas décadas o desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de glicose a partir da celulose contida na biomassa vegetal tem sido alvo de estudo.<sup>17,19</sup>

Sendo assim, pelo fato da celulose *in natura* ser encontrada associada à hemicelulose e lignina, diversas metodologias foram sendo desenvolvidas, ao longo do tempo por diferentes grupos de pesquisas, para que fosse possível realizar sua separação dessas moléculas (que têm função de proteger a celulose) de maneira prática e eficiente. Esse processo de separação foi denominado no meio científico de pré-tratamento.

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é etapa indispensável na desconstrução das várias barreiras físicas e químicas que tornam o material resistente ao ataque enzimático. Os principais objetivos do pré-tratamento são: alterar as propriedades de resistência do material (pela quebra da estrutura da lignina e desestruturação do arranjo cristalino da celulose), aumentar a porosidade da parede celular e melhorar a acessibilidade das enzimas durante a hidrólise.<sup>10,20,21</sup>

Em seguida alguns tipos de pré-tratamentos são destacados:

*- Pré-tratamentos físicos:*

Triturar/moer a biomassa possibilita a diminuição da cristalinidade da celulose e um aumento na superfície de contato do material com os agentes que catalisam a etapa seguinte do processo de obtenção da glicose, ou seja, a hidrólise das cadeias poliméricas, facilitando assim o contato entre os mesmo e possibilitando a diminuição do tempo da etapa de hidrólise.<sup>22</sup> O processo de moagem pode ser realizado com o material seco ou úmido, podendo utilizar o processo de compressão e descompressão do sistema para facilitar a manipulação do material nas etapas de obtenção da glicose.<sup>21</sup>

Associar a moagem com a adição de água quente, resultando no aumento da temperatura do sistema reacional na etapa de pré-tratamento, é favorável para a ruptura das interações entre celulose, hemicelulose e lignina, entretanto essas metodologias demandam um maior gasto de energia, encarecendo o processo quando se pensa em escala industrial.<sup>23,24</sup>

Outra metodologia física estudada é a utilização de radiação gama para quebrar as ligações glicosídicas da celulose, diminuindo sua cristalinidade e aumentando a superfície de contato. Entretanto não é possível se aplicar essa metodologia em escala industrial por ser extremamente dispendiosa e por ainda não existir uma tecnologia que consiga associar

a metodologia com o restante do processo de obtenção da glicose a partir de materiais lignocelulósicos de maneira ambientalmente amigável.<sup>12</sup>

*- Pré-tratamentos físico-químicos:*

A explosão a vapor é um processo simples realizado em reatores e o mais utilizado como forma de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Consiste no aumento da pressão da mistura de biomassa com água seguida de uma rápida descompressão do sistema, provocando uma descompressão explosiva, que faz com que a maior parte da celulose do material seja dissociada da lignina e hemicelulose. Ao se comparar com algumas metodologias mecânicas como, por exemplo, a moagem da biomassa esse processo possui um custo benefício maior, entretanto gera subprodutos indesejáveis (tóxicos) que inibem a ação enzimática na etapa seguinte do processo de obtenção da glicose, a hidrólise enzimática. A combinação do processo de explosão a vapor com a utilização de soluções ácidas diluídas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou dos gases SO<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub> (normalmente 0,3 a 3% m/m) possibilitam a diminuição da temperatura e do tempo reacional assim como fazem com que poucos subprodutos tóxicos sejam gerados.<sup>25,26,27,28,29</sup> Dentre os três processos em questão o mais viável economicamente é o da explosão com CO<sub>2</sub>, entretanto é o que leva à uma menor produção de açúcar ao final da hidrólise enzimática.<sup>30</sup>

O processo de explosão com amônia é similar ao processo de explosão a vapor, a única diferença é a adição da solução de amônia ao reator. Primeiramente o material lignocelulósicos é umedecido com uma solução de amônia sob alta pressão e submetido a um aquecimento brando por um tempo predeterminado, esse procedimento tem o objetivo diminuir a cristalinidade da celulose. Transcorrido o tempo reacional, é realizada uma rápida descompressão do sistema, que provoca o rompimento das interações entre a celulose, a lignina e a hemicelulose, bem como o aumento da superfície de contato da celulose.<sup>31,32</sup> Nesse processo todos os parâmetros são ajustáveis (de acordo com o tipo de material lignocelulósicos a ser tratado), são eles: a quantidade de amônia, a quantidade de água, a temperatura e a pressão do sistema. Sendo assim, cada grupo de pesquisa ajusta a metodologia de acordo com sua necessidade.

A utilização do ultrassom como metodologia de pré-tratamento da biomassa em solução (aquosa<sup>33</sup> ou básica<sup>34,35</sup>) aumenta consideravelmente a disponibilização da celulose para a ação enzimática o que favorece sua conversão em glicose. O aumento nos rendimentos reacionais é explicado pelos efeitos da cavitação que o campo do ultrassom proporciona às amostras e pelos impactos mecânicos do colapso das bolhas de cavitação

que proporcionam a abertura da superfície da biomassa, o que aumenta sua superfície de contato e com isso, facilita o acesso enzimático.<sup>10</sup>

A utilização do micro-ondas como forma de pré-tratamento normalmente é associada a agentes químicos (ácidos ou bases).<sup>36</sup> Essa metodologia é promissora uma vez que é mais branda e possibilita a junção da etapa de hidrólise enzimática ao pré-tratamento barateando o processo e minimizando a geração de resíduos.<sup>37</sup> Entretanto ainda não há tecnologia suficiente para o desenvolvimento desse processo em escala industrial.

*- Pré-tratamentos biológicos:*

O pré-tratamento biológico consiste na utilização de micro-organismos que degradam especificamente a lignina, favorecendo a hidrólise enzimática uma vez que a celulose estará acessível. Normalmente é utilizado em materiais lignocelulósicos mais rígidos, como por exemplo, a madeira para facilitar a remoção da lignina e hemicelulose.<sup>38</sup> De todos, este é o processo mais ambientalmente correto, entretanto é o mais caro e demorado, o que inviabiliza sua implementação em escala industrial.<sup>39</sup>

*- Pré-tratamentos químicos:*

Os pré-tratamentos químicos podem fazer uso, principalmente, de soluções ácidas e básicas, solventes orgânicos e líquidos iônicos.

O pré-tratamento ácido pode ser realizado com os ácidos  $H_2SO_4$ ,  $H_3PO_4$  e  $HCl$ , entre outros, em baixas ou elevadas concentrações. Nesse processo é possível remover quase que totalmente a hemicelulose do material.<sup>40,41</sup> A metodologia se torna dispendiosa pelo fato de gerar muito resíduo ácido e pela corrosão do reator provocada pelo ácido uma vez que a constante utilização do reator provoca seu desgaste. Uma alternativa seria a utilização de soluções ácidas mais diluídas, entretanto é sabido que a metodologia não promove a remoção significativa da hemicelulose. Outra desvantagem da utilização de soluções de ácido concentrado é a produção de subprodutos que inativam a celulase utilizada na etapa de hidrólise.<sup>42</sup>

O pré-tratamento básico é realizado com hidróxidos e é mais brando que o pré-tratamento ácido, porém não menos eficiente. A ação da base se dá de modo a enfraquecer as interações ente a lignina e os outros dois principais componentes de materiais lignocelulósicos (celulose e hemicelulose). Também é eficiente no decréscimo da percentagem de celulose cristalina no meio e conseqüentemente torna o processo de



hidrólise mais rápido.<sup>10</sup> Grupos de pesquisa que utilizam essa metodologia descrevem excelentes resultados de conversão da biomassa em açúcares.<sup>43</sup> Porém essa metodologia apresenta a desvantagem de gerar grande quantidade de resíduo básico, a encarecendo.

O processo de organossolvatação consiste na utilização de um solvente (orgânico ou inorgânico) combinado com água ou não. Um catalisador ácido ou básico pode ser utilizado. Essa mistura tem o potencial de romper as interações entre a lignina e a hemicelulose.<sup>44</sup> Como grande parte dos solventes são voláteis e inflamáveis, as condições reacionais devem ser controladas rigorosamente para evitar acidentes.<sup>45</sup>

Recentemente os Líquidos Iônicos (LI) também começaram a ser utilizados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, principalmente com o objetivo de se analisar o comportamento das interações entre os constituintes do material (celulose, lignina e hemicelulose) em LI. Alguns destes se mostraram eficientes na quebra das interações entre a celulose e seus invólucros (lignina e hemicelulose), deixando-a mais acessível à ação enzimática.<sup>46,47,48,49</sup>

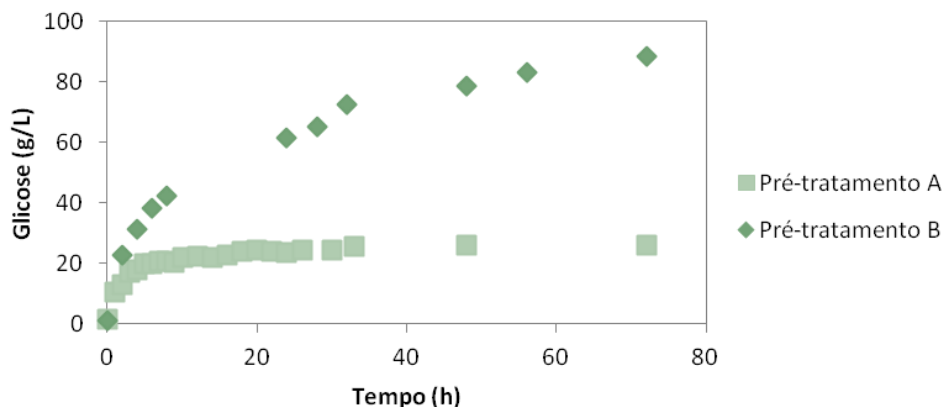
## 1.2 - Gargalos na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos

A etapa mais dispendiosa do processo de obtenção da glicose é a hidrólise enzimática.<sup>2,50</sup> Os coquetéis enzimáticos são extremamente caros e as condições reacionais utilizadas atualmente não possibilitam o reciclo desse catalisador, uma vez que durante a reação grande parte da enzima desnatura ou se prende a biomassa remanescente do processo.

Também é importante destacar que a eficiência da hidrólise enzimática é extremamente dependente do tipo de pré-tratamento ao qual o material lignocelulósicos foi submetido inicialmente. A porosidade do material pré-tratado,<sup>51</sup> a quantidade de lignina e hemicelulose que foram extraídas,<sup>52</sup> a diminuição da cristalinidade e o aumento da área de contato da celulose com as enzimas e produção indesejada de inibidores (por exemplo fenóis)<sup>53</sup> são fatores ligados diretamente ao rendimento da etapa de hidrólise enzimática,<sup>3</sup> ou seja, a escolha de um pré-tratamento eficiente e que não gere subprodutos é importantíssima.

A Figura 2 ilustra, com auxílio de um gráfico, o perfil de conversão de celulose em glicose de uma espécie de braquiária usando dois tipos de pré-tratamentos químico diferentes e uma mesma condição de hidrólise. No primeiro (representado no gráfico por A) apenas foi realizado um pré-tratamento ácido e no segundo (representado no gráfico

por B) foi realizado um pré-tratamento ácido seguido do básico. É notável a diferença da eficiência da hidrólise entre os dois materiais (A e B).

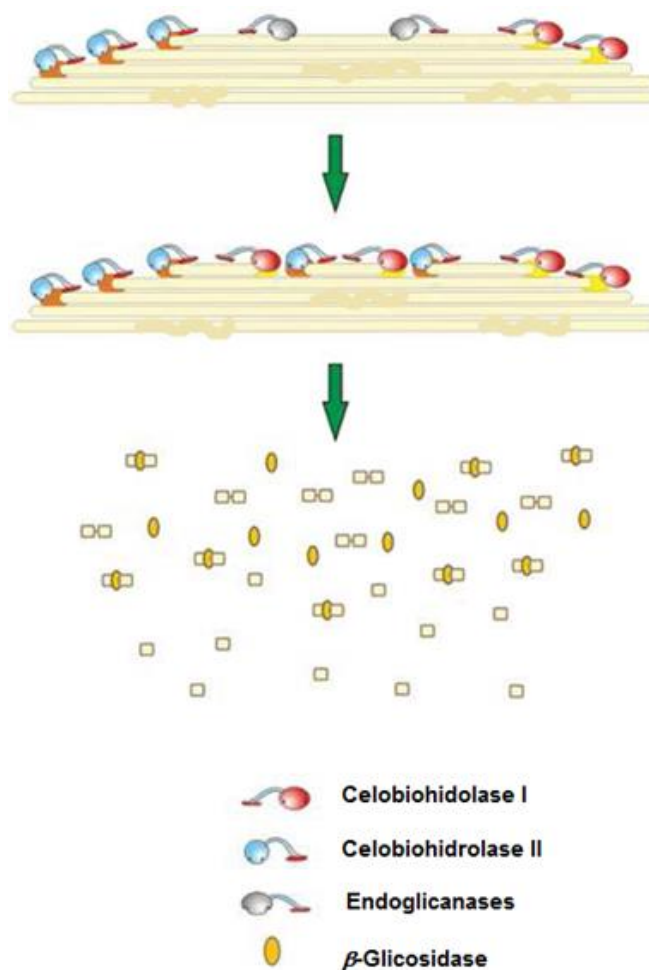


**Figura 2** - Hidrólise enzimática de *Brachiaria brizantha* submetida a dois pré-tratamentos diferentes: A) ácido (1,5% v/v) e B) ácido (1,5% v/v) seguido de alcalino (4,0% p/v). Adaptada da referência 54.

A diferença observada entre os perfis de hidrólise pode ser explicada pela diferença na eficiência de cada um dos pré-tratamentos utilizados. O primeiro pré-tratamento (A) retirou apenas a hemicelulose enquanto que o segundo (B) removeu tanto a hemicelulose quanto a lignina.

Como é possível observar, a reação atinge seu ápice em aproximadamente 75 h. Esses longos tempos reacionais podem ser atribuídos à inibição da enzima, que acontece naturalmente quando o meio reacional já está com uma determinada concentração de glicose (glicose essa produzida pela própria enzima na hidrólise da celulose).

Para entender o processo de inibição das enzimas celulases é necessário conhecer o seu comportamento. Os coquetéis enzimáticos normalmente possuem mais de um tipo de enzimas celulases que trabalham sinergicamente na conversão da celulose (insolúvel em água) em açúcares solúveis. O Esquema 3 ilustra a ação das três principais enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose na etapa de hidrólise enzimática: celobiohidrolases (ou exoglucanases), endoglicanases e as  $\beta$ -glicosidases. A parte contínua em rosa claro representa a celulose cristalina e os segmentos ondulados representam as regiões amorfas.



**Esquema 3** - Representação esquemática ilustrativa da hidrólise enzimática da celulose. Adaptada da referência 55.

As enzimas endoglicanases clivam as ligações glicosídicas ao longo das cadeias poliméricas de celulose, diminuindo significativamente o seu grau de polimerização e, com isso, são criadas novas extremidades reductoras e não-reductoras que, por sua vez, são clivadas pelas celobiohidrolases que removem os resíduos de celobiose dessas extremidades. Por fim, as  $\beta$ -glicosidases clivam os resíduos de celobiose formados pela ação sinérgica das endoglicanases e exoglucanases, liberando glicose.<sup>56</sup> Todas as 3 enzimas sofrem inibição pela alta concentração dos produtos produzidos por elas mesmas. Ou seja, quando a concentração de glicose no meio reacional começa a se elevar, a  $\beta$ -glicosidase começa a inativar. Como consequência disso o meio reacional começa a ficar saturado de celobiose, o que inativa as celobiohidrolases. Por fim, as endoglicanases são inativadas pois trabalham em sinergia com as celobiohidrolases.<sup>55</sup>

Com o objetivo evitar o problema da inativação da enzima e pensando na possibilidade de reciclo do meio catalítico tem-se estudado metodologias de suporte

enzimático. Sendo assim, os LI são uma excelente alternativa, que será discutida no tópico seguinte.

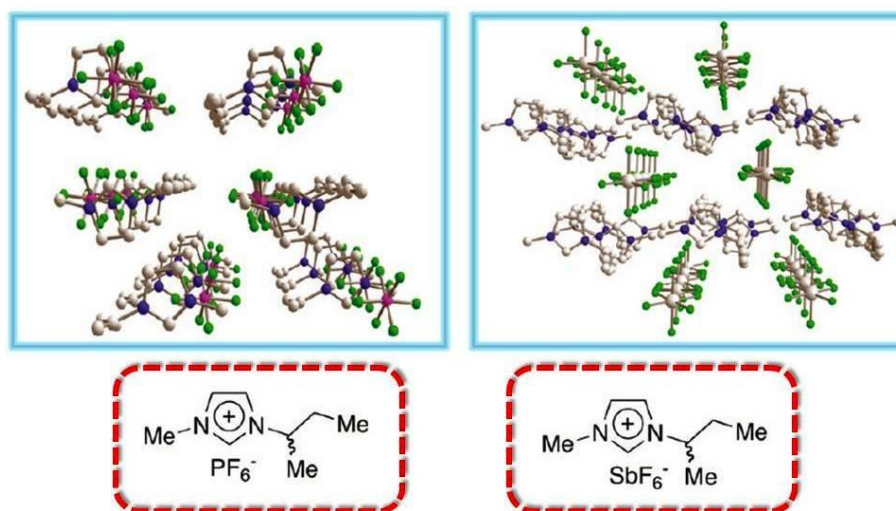
### 1.3 - Aplicações de líquidos iônicos para a hidrólise de biomassa

Vários artigos na literatura descrevem o comportamento de diversas enzimas em LI (principalmente os derivados do cátion imidazólio). Algumas delas são: lipases,<sup>57</sup> lactases,<sup>58</sup> monooxigenases (P450 BM-3),<sup>59</sup> amidases,<sup>60</sup> celulases.<sup>61</sup>

Entender o comportamento das celulases em LI é importante para este trabalho uma vez que estas enzimas são responsáveis pela catálise na reação de hidrólise para a quebra da celulose em açúcares menores.

Os LI são compostos com temperatura de fusão abaixo de 100 °C constituídos inteiramente por íons.<sup>62,63</sup> Mostram-se ser excelentes alternativas aos solventes orgânicos clássicos com a vantagem de não poluírem a atmosfera com seu vapor, pois possuem uma pressão de vapor negligenciável (apenas passam para fase gasosa quando submetidos a aquecimento e auto vácuo).<sup>64</sup> São recicláveis, uma vez que prontos é possível utilizá-los diversas vezes em reações de reciclo, pois são facilmente isolados e recuperados do meio reacional.<sup>65</sup> Esses aspectos fazem com que os LI sejam extremamente atrativos do ponto de vista da Química Verde.<sup>66</sup>

LI derivados do cátion imidazólio estão constantemente em destaque nas pesquisas acadêmicas porque possuem nano organização molecular e formam aglomerados supramoleculares direcionalmente organizados. Formando canais iônicos direcionadores de cargas.<sup>67</sup> A Figura 3 ilustra a disposição dos cátions e ânions de dois LI imidazolios, é possível observar que a organização leva a formação de canais iônicos. Essas características básicas são suficientes para explicar o sucesso desse material em diversos segmentos da Química e da Indústria.<sup>68</sup>



**Figura 3** - Representação estrutural 3D de dois LIs derivado do cátion imidazolio. Adaptada da referência 67.

Entretanto não são somente essas características que chamaram a atenção do nosso grupo de pesquisa; diversas outras características físico-químicas únicas também foram cruciais para escolha desse material a ser inserido na rota de obtenção do etanol lignocelulósico. Algumas dessas características seguem listadas a seguir:

- ❖ São bons solventes para muitos materiais orgânicos e inorgânicos. Isso permite que sejam usados em reações com ambos os tipos de reagentes, sendo, portanto, viáveis e extremamente atrativos do ponto de vista tecnológico e industrial;
- ❖ São normalmente constituídos por íons que são fracamente coordenantes, por isso são potencialmente solventes de polaridades ajustáveis e não coordenantes;
- ❖ É possível escolher ou moldar o LI desejado dependendo da necessidade de solubilidade do mesmo em algum outro solvente ou reagente para uma reação de catálise heterogênea, por exemplo;
- ❖ Não são inflamáveis podendo ser utilizados em temperaturas elevadas, diminuindo os riscos associados;
- ❖ Melhoram o rendimento, em alguns casos, de reações orgânicas;
- ❖ Conseguem promover reações que são difíceis de serem realizadas em solventes orgânicos clássicos.<sup>69</sup>

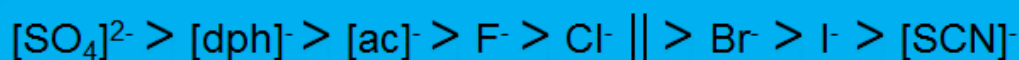
Por serem constituídos inteiramente de íons os LI possibilitam a formação e estabilização de intermediários reacionais, em especial os polares e iônicos. Sendo esse efeito denominado efeito do líquido iônico (*ionic liquid effect*).<sup>70</sup>

Alguns estudos mostram que os LI podem ser considerados substâncias com a natureza relativamente polar,<sup>71</sup> isso quando se leva em consideração os parâmetros de Kamlet-Taft.<sup>72</sup> Tendo essa característica, eles podem contribuir mais efetivamente para a estabilização de estados de transição enzimáticos que normalmente são polares e atenuar eventuais distorções conformacionais causada pela desidratação da enzima. É justamente esse efeito que explica a estabilidade de várias enzimas em alguns tipos de LI. O que favorece a junção dos mesmos em reações catalíticas, onde ambos contribuirão sinergicamente para a efetividade da transformação de reagentes no produto desejado.

Outro ponto crucial para que as enzimas continuem ativas ou até mesmo aumentem sua atividade catalítica em LI é o fato de que os mesmo ajudam-nas a manter a sua água estrutural ( $a_w$ ), que é responsável pela manutenção mínima da estrutura terciária e atividade da enzima.

Os “efeitos de Hofmeister” também são importantes para o entendimento de estabilidade enzimática. O pesquisador Franz Hofmeister, em seus estudos em 1888, percebeu que o comportamento das enzimas frente a alguns íons seguia um padrão. Com auxílio de suas observações experimentais ele foi capaz de construir duas séries (uma de cátions e uma de ânions) que previam e relacionavam a estabilidade e a precipitação (desenovelamento) de enzimas em solução. A série de Hofmeister relaciona diversos fatores intrínsecos como estabilidade térmica, atividade catalítica enzimática (a qual é expressa atualmente como “*Turnover number*”),<sup>73</sup> cristalização, interação com a água e outros.

Os Esquemas 4 e 5 ilustram o trabalho de Hofmeister que foi homenageado com seu nome. A presença de íons em solução tem efeito direto na estabilidade da enzima, podendo ser benéfico ou prejudicial à sua estabilidade catalítica. O Esquema 4 representa antes de “||” a ordem decrescente da capacidade de estabilização enzimática de alguns ânions. Após “||” encontra-se a ordem decrescente dos ânions que desestabilizam a estrutura enzimática em solução.



**Esquema 4** - Ordem decrescente de estabilização (antes da “||”) e desestabilização (depois da “||”) da estrutura enzimática gerada por alguns ânions. Adaptado da referência 74.

O Esquema 5, por sua vez, representa antes da “||” a ordem decrescente da capacidade de estabilização enzimática de alguns cátions. Após a “||” representa a ordem decrescente dos cátions que desestabilizam a estrutura enzimática em solução.



**Esquema 5** - Ordem decrescente de estabilização (antes da “||”) e desestabilização (depois da “||”) da estrutura enzimática gerada por alguns cátions. Adaptado da referência 74.

Mesmo tendo acesso a todas essas informações é difícil prever com precisão o comportamento das enzimas em LIs, pois são materiais que começaram a ser estudados mais a fundo a pouco tempo (últimas duas décadas). Muitas pesquisas recentes já observaram que os LIs sofrem um desvio dessa série.

Outra maneira de se explicar o comportamento das enzimas frente aos íons é analisando os mesmos quanto à sua caotropicidade (oficialmente descrito como um desestabilizante da enzima) e/ou cosmotropicidade (que estabilizam a enzima). Esses conceitos são referentes aos tipos de interação dos íons com a água e como elas influenciam o equilíbrio da mesma em alta ou baixa densidade, bem como seus efeitos diretos na estabilização enzimática. Entretanto o comportamento dos LIs também não seguem de maneira linear essas definições uma vez que ele é a combinação de íons podendo ser ambos cosmotrópicos, ambos caotrópicos ou a combinação dos dois. Então cada situação deve ser analisada individualmente.

Tendo acesso a todas essas informações sobre enzimas e LIs e conhecendo as variáveis que influenciam direta e indiretamente o sucesso dessa possível combinação surge o desafio de se formular um LI que detenha todas as características necessárias para o destino de interesse: suporte enzimático catalítico.

## 2- Objetivos

### 2.1- Objetivo geral

Avaliar o efeito de LI sobre rendimento e produtividade de glicose a partir de material lignocelulósico, buscando aperfeiçoamento deste processo.

### 2.2- Objetivos Específicos

- Estudar a estabilidade de celulases comerciais na presença de LI BMI.NTf2;
- Avaliar o desempenho da hidrólise enzimática de material lignocelulósico pré-tratado e in natura;
- Estabelecer a melhor condição operacional para hidrólise da biomassa, em termos da concentração de LI BMI.NTf2.



## 3 - Parte Experimental

O desenvolvimento experimental deste trabalho pode ser dividido em quatro partes principais: adaptação de métodos para dosagem da atividade enzimática, preparo de LI, estudo da estabilidade de celulases na presença de LI e hidrólise de biomassa pré-tratada e in natura utilizando LI e celulases. Os itens que descrevem as atividades experimentais realizadas são descritos a seguir.

### 3.1 - Determinação de Atividades Enzimáticas em Tubos

As atividades foram determinadas, inicialmente em tubos (volume reacional superior a 1000 uL), como descrita no artigo de referência,<sup>75</sup> depois todos os procedimentos foram adaptados para uma escala menor (60 uL), com o objetivo de realizar um número maior de ensaios por tempo e reduzir a quantidade de resíduos gerados. Os ensaios em microescala serão descritos no item 3.2.

O complexo enzimático comercial Cellic Ctec 2 (CC2), da Novozymes, foi avaliado quanto a sua atividade enzimática utilizando como substratos papel, avicel, carboximetilcelulose e celobiose seguindo metodologias previamente estabelecidas, as quais foram ligeiramente modificadas neste trabalho.<sup>75,76</sup>

#### *3.1.1 - Determinação da atividade total de celulase (FPase) utilizando papel filtro*

##### **3.1.1.1 - Preparo de soluções**

###### *Preparo de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5:*

Foi preparada uma solução 0,1 M e uma 0,05 M de citrato de sódio di-hidratado (MM=294,10 g/mol) e uma solução 0,1 M e uma 0,05 M de ácido cítrico anidro (MM=210,14 g/mol). A solução de ácido cítrico foi adicionada lentamente à solução de citrato de sódio como molaridade correspondente até que a mistura apresentasse pH 5.

Preparo da solução de ácido dinitrossalicílico (DNS):

O preparo da solução de DNS foi adaptado da referência usada com modelo.<sup>75</sup> Para a síntese foram necessários os seguintes reagentes:

- 1423,6 mL de água deionizada;
- 10,6 g de ácido dinitrossalicílico;
- 19,8 g de hidróxido de sódio (NaOH);
- 306,0 g de tartarato de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ );
- 8,3 g de metabissulfito de Sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ).

Em 1000,0 mL de água deionizada foram dissolvidos 10,6 g de ácido dinitrossalicílico e 19,8 g de NaOH. Para a completa solubilização, utilizou-se uma placa de aquecimento (temperatura máxima= 40°C) e agitação magnética. Após a dissolução total, adicionou-se 306,0 g tartarato de sódio e potássio, 8,3 g de metabissulfito de sódio e 423,6 mL de água deionizada.

Foram titulados 3 mL da solução recém preparada com uma solução de HCl 0,1 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Foram necessários cerca de 5,0-6,0 mL da solução de HCl para que a tonalidade do indicador se modificasse. Caso a quantidade de HCl utilizada na titulação ultrapassasse os 6,0 mL, eram adicionados, à solução de DNS, 2,0g de NaOH para cada 1,0 mL de solução de HCl 0,1 M excedida.

A solução foi armazenada em frasco âmbar ou revestido por papel alumínio.

Preparo da solução de enzima:

A diluição da enzima foi feita em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. O procedimento foi realizado com duas diluições tais que, decorrido o tempo de incubação, nas condições reacionais utilizadas, a quantidade absoluta de açúcares redutores totais (ART) gerados foram pouco menor e pouco maior que 2,00 mg.

### 3.1.1.2 - Ensaio de hidrólise do papel e quantificação do produto

#### Ensaio para determinação da atividade enzimática:

Em um tubo de ensaio de 15,0 mL com tampa foram colocados 1,0 mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5 e 0,5 mL da enzima previamente diluída, a mistura foi colocada em banho termostático a 50 °C. Foram aguardados cerca de 3 min para que os tubos chegassem à temperatura de incubação. Foi adicionada uma tira de papel filtro Whatman nº1 de 1,0x6,0 cm (equivalente a aproximadamente 50,00 mg) enrolada em espiral. Atentou-se para que o líquido cobrisse todo o papel.

A mistura foi incubada a 50 °C por 60 min. Transcorridos os 60 min de incubação, os tubos foram retirados do banho termostático e adicionou-se 3,0 mL de solução de DNS. Os tubos foram mantidos por exatos 10 min em água fervente. Todas as amostras, incluindo branco da enzima, branco do substrato, curva padrão e zero do espectro foram incubados nesse banho.

Os tubos foram retirados da água fervente e resfriado em banho de gelo.

Retirou-se uma alíquota de 0,2 mL de cada um dos tubos que foi transferida para novos tubos contendo 2,5 mL de água deionizada, a mistura foi agitada.

Em seguida foram transferidos 200 µL de cada tubo para microplaca (cada amostra foi transferida para 3 poços da microplaca) e determinou-se a absorbância a 540 nm em espectrofotômetro.

- **Zero do espectro:** Foram colocados 1,5 mL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico em um tubo de 15,0 mL com tampa. Adicionou-se 3,0 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido por exatos 10 min em água fervente. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

- **Branco do substrato:** Foram colocados 1,5 mL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico e uma tira de papel de filtro em um tubo de 15,0 mL com tampa. Adicionou-se 3,0 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido por exatos 10 min em água fervente. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

- **Branco da enzima:** Foram colocados, em um tubo de 15,0 mL com tampa, 1,0 mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico e 0,5 mL da enzima diluída. Adicionou-se 3,0 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido por exatos 10 min em água fervente. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

Construção da curva padrão:

As diluições para construção das curvas padrões foram preparadas a partir de uma solução padrão 10,00 g/L de glicose:

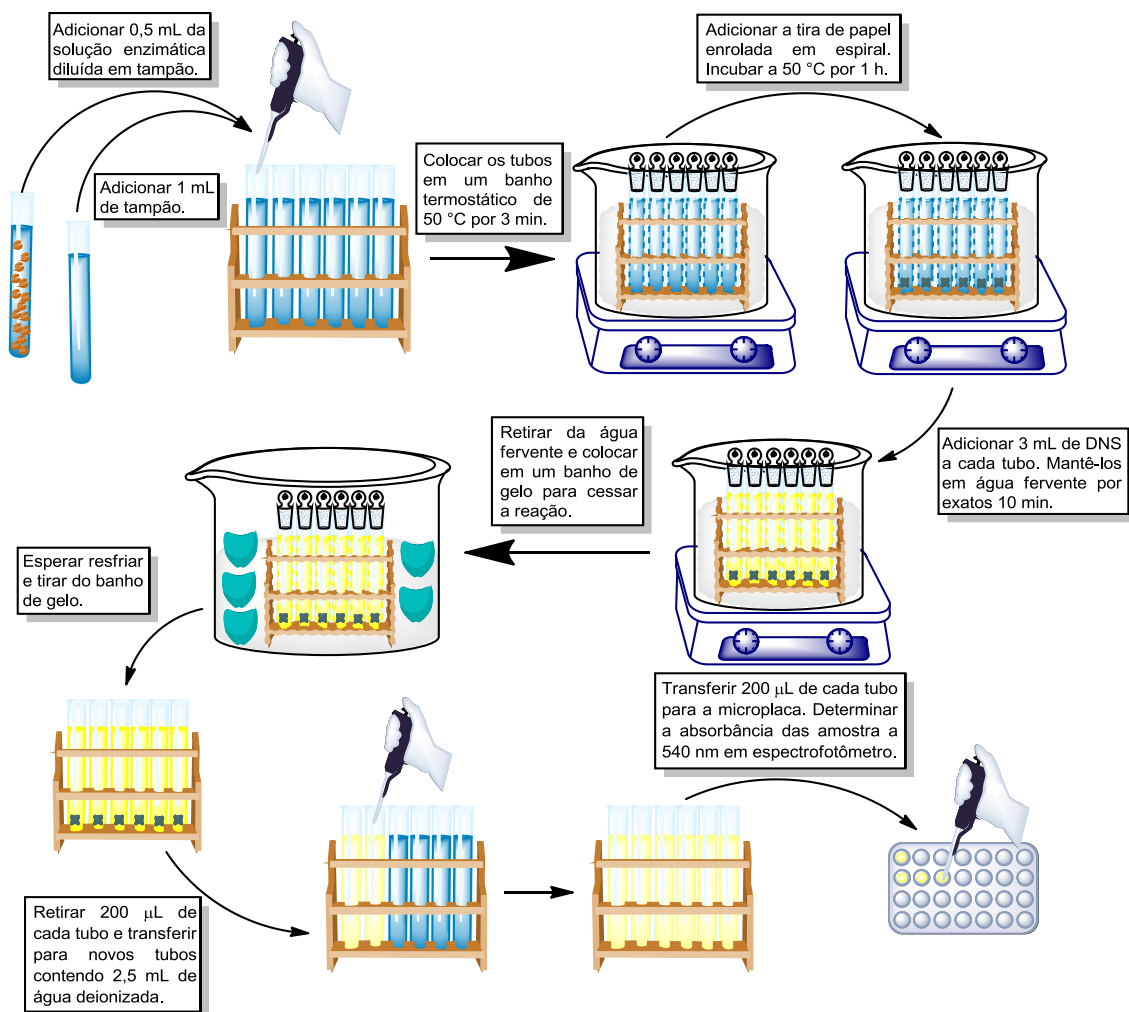
- 1,0 mL da solução padrão + 0,5 mL de tampão = 1:1,5 = 6,70 mg/mL (3,35 mg/0,5 mL\*);
- 1,0 mL da solução padrão + 1,0 mL de tampão = 1:2 = 5,00 mg/mL (2,50 mg/0,5 mL);
- 1,0 mL da solução padrão + 2,0 mL de tampão = 1:3 = 3,30 mg/mL (1,65 mg/0,5 mL);
- 1,0 mL da solução padrão + 4,0 mL de tampão = 1:5 = 2,00 mg/mL (1,00 mg/0,5 mL).

\*Entre parenteses encontra-se a quantidade absoluta de glicose contida no tubo de reação.

Após o preparo das diluições da curva padrão, em novos tubos, foram colocados 0,5 mL da solução padrão de glicose previamente diluída e adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico. Dessa forma, as absorbâncias obtidas foram correspondentes às quantidades absolutas de glicose contidas nos tubos de reação. Adicionou-se 3,0 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido em água fervente por exatos 10 min. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

A curva padrão foi construída usando a quantidade absoluta de glicose x absorbância em 540 nm.

O Esquema 6 ilustra esquematicamente o procedimento experimental da determinação da atividade enzimática total com papel filtro.



**Esquema 6** - Representação esquemática do procedimento experimental de determinação da atividade enzimática FPase em tubos.

### 3.1.1.3 - Cálculo da atividade enzimática em papel

Do valor de absorbância obtido para a amostra foi descontada a absorbância do branco da enzima e do branco do substrato. Com este novo valor, foi calculado a quantidade absoluta de açúcares redutores totais (ART) com base na curva padrão de glicose. A curva padrão foi construída utilizando somente glicose como padrão, entretanto, após a hidrólise da celulose, muitos compostos reagem com o DNS, por exemplo, celobiose e oligossacarídeos. Assim, o que de fato é quantificado são todos os açúcares redutores, não somente glicose, daí a sigla ART, os quais serão considerados como glicose neste trabalho. Este comentário também é válido para as hidrólises de avicel e carboximetilcelulose.

Os valores de diluição empregados foram convertidos em concentração enzimática, de acordo com a seguinte equação (2.1):

$$\text{Concentração} = \frac{1}{\text{Diluição}} \left( \frac{\text{Volume de enzima na diluição}}{\text{Volume total da diluição}} \right) \quad (2.1)$$

Em seguida, em um gráfico semi-logaritmico, foram plotados os valores da concentração de glicose (ART) liberada contra a concentração de enzima:

Abcissa: glicose liberada (mg)

Ordenada:  $\log(1/\text{dil})$

Com a curva de regressão linear obtida foi estimada a concentração de enzima que gere exatamente 2,00 mg de glicose.

O cálculo da atividade, em FPU, foi realizado com auxílio da equação 2.2.

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Concentração de enzima que fornece 2,00 mg de glicose}} \text{ unidades/mL} \quad (2.2)$$

Em que a unidade FPU é baseado na Unidade Internacional (IU).

1 UI = 1  $\mu\text{mol min}^{-1}$  por substrato convertido

= 1  $\mu\text{mol min}^{-1}$  de “glicose” (ART) formado durante a hidrólise

= 0,18  $\text{mg min}^{-1}$  quando o produto for glicose

A quantidade de glicose liberada, no ensaio, na diluição crítica é de 2 mg:

$$2 \text{ mg glicose} = \frac{2}{0,18 \mu\text{mol}} \quad (2.3)$$

A quantidade de glicose produzida por 0,50 mL de enzima em 60 min, ou seja, em FPU na reação:

$$2 \text{ mg glicose} = \frac{2}{0,18 \mu\text{mol} \cdot 0,5 \text{ mL} \cdot 60 \text{ min}} \quad (2.4)$$

$$2 \text{ mg glicose} = 0,37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{mL}^{-1} \text{ (UI} \cdot \text{mL}^{-1}) \quad (2.5)$$

Portanto a quantidade estimada de enzimas (concentração crítica de enzimas) que libera 2,00 mg de glicose, em FPU, contém 0,37 unidades.

### 3.1.2- Determinação da atividade de endoglicanase utilizando CMC

#### 3.1.2.1 - Preparo de soluções

As soluções de tampão citrato e DNS utilizadas aqui, foram preparadas conforme descrito no item 3.1.1.1.

##### Preparo da solução de carboximetilcelulose (CMC):

Foi preparada uma solução com 2% m/v de CMC em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. Utilizou-se uma placa aquecedora (temperatura máxima = 40°C) e agitador magnético para completa dissolução do substrato. Observou-se a formação de uma solução viscosa.

##### Preparo da solução de enzima:

A diluição da enzima foi feita em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. O procedimento foi realizado com duas diluições tais que, decorrido o tempo de incubação, nas condições reacionais utilizadas, a quantidade absoluta de ART gerados foram pouco menor e pouco maior que 0,5 mg. No mínimo duas diluições diferentes da enzima foram testadas.

#### 3.1.2.2 - Ensaio de hidrólise de carboximetilcelulose e quantificação dos produtos

Em tubos de ensaio de 15 mL com tampa foi colocado 0,5 mL da enzima previamente diluída. Os tubos foram levados ao banho termostático a 50°C e deixados em repouso por cerca de 3 minutos para que chegassem à temperatura de incubação. Em seguida adicionou-se 0,5 mL da solução de CMC 2% m/v. A mistura foi incubada por 30 min. a 50 °C.

Transcorridos os 30 min de incubação, os tubos foram retirados do banho termostático e adicionou-se 3 mL de solução de DNS. Os tubos foram mantidos por exatos 10 min em água fervente. Todas as amostras, incluindo branco da enzima, branco do substrato, curva padrão e zero do espectro foram incubados nesse banho.

Os tubos foram retirados da água fervente e resfriado em banho de gelo.

Retirou-se uma alíquota de 0,2 mL de cada um dos tubos que foi transferida para novos tubos contendo 2,5 mL de água deionizada, a mistura foi agitada.

Em seguida foram transferidos 200 µL de cada tubo para microplaca (cada amostra foi transferida para 3 poços da microplaca) e determinou-se a absorbância a 540 nm em espectrofotômetro.

- **Zero do espectro:** Foram colocados 1 mL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico em um tubo de 15 mL com tampa. Adicionou-se 3 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido por exatos 10 min em água fervente. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

- **Branco do substrato:** Foram colocados 0,5 mL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico e 0,5 mL da solução de CMC 2% m/v em um tubo de 15 mL com tampa. A mistura foi incubada juntamente com as amostras (30 min a 50 °C). Adicionou-se 3 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido por exatos 10 min em água fervente. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

- **Branco da enzima:** Foram colocados, em um tubo de 15 mL com tampa, 0,5 mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico e 0,5 mL da enzima diluída. A mistura foi incubada juntamente com as amostras (30 min a 50 °C). Adicionou-se 3 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido por exatos 10 min em água fervente. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

#### Construção da curva padrão:

As diluições para construção das curvas padrões foram preparadas a partir de uma solução padrão 2,0 g/L de glicose:

- Sem diluição = 2,0g/L (1 mg/0,5 mL\*);
- 1 mL + 0,5 mL de tampão = 1:1,5 = 1,33 g/L (0,67 mg/0,5 mL);
- 1 mL + 1 mL de tampão = 1:2 = 1,0 g/L (0,5 mg/0,5 mL);
- 1 mL + 3 mL de tampão = 1:4 = 0,5 g/L (0,25 mg/0,5 mL).

\*Entre parenteses encontra-se a quantidade absoluta de glicose contida no tubo de reação.

Após o preparo das diluições da curva padrão, em novos tubos, foram colocados 0,5 mL da solução padrão de glicose previamente diluída e adicionou-se 0,5 mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico. Dessa forma, as absorbâncias obtidas foram correspondentes às quantidades absolutas de glicose contidas nos tubos de reação.



Adicionou-se 3 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido em água fervente por exatos 10 min. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

A curva padrão foi construída usando a quantidade absoluta de glicose x absorvância em 540 nm.

### 3.1.2.3 - Cálculo da atividade enzimática em carboximetilcelulose

Os cálculos realizados na determinação da atividade da endoglicanase (para carboximetilcelulose) foram realizados da mesma forma do cálculo descrito para a determinação da atividade em papel.

Do valor de absorvância obtido para a amostra foi descontada a absorvância do branco da enzima e do branco do substrato. Com este novo valor, foi calculado a quantidade absoluta de ART com base na curva padrão de glicose.

Os valores de diluição empregados foram convertidos em concentração enzimática, com auxílio da equação 2.1.

Em seguida, em um gráfico semi-logaritmico, foram plotados os valores da concentração de glicose (ART) liberada contra a concentração de enzima:

Abscissa: glicose liberada (mg)

Ordenada:  $\log(1/\text{dil})$

Com a curva de regressão linear obtida foi estimada a concentração de enzima que gere exatamente 0,5 mg de glicose.

O cálculo da atividade, em CMC, é realizado com auxílio da equação 2.6.

$$CMC = \frac{0,185}{\text{Concentração de enzima que fornece 0,5 mg de glicose}} \text{ unidades/mL} \quad (2.6)$$

A equação 2.6 é obtida da mesma maneira que a 2.2, apenas é necessário trocar os valores de quantidade de glicose formada e o tempo reacional, uma vez que nesse experimento a quantidade de substrato utilizada bem como o tempo reacional são diferentes.

### 3.1.3 - Determinação da atividade de exoglicanase utilizando avicel

#### 3.1.3.1 - Preparo de soluções

As soluções de tampão citrato e DNS utilizadas aqui, foram preparadas conforme descrito no item 3.1.1.1.

##### Preparo da suspensão de avicel:

Foi preparada uma solução com 0,5% *m/v* de avicel em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. O substrato não se solubiliza no tampão, por esse motivo, cada vez que a suspensão precisou ser utilizada era mantida sob agitação magnética para que ficasse o mais homogênea possível.

##### Preparo da solução de enzima:

A diluição da enzima foi feita em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. O procedimento foi realizado com duas diluições tais que, decorrido o tempo de incubação, nas condições reacionais utilizadas, a quantidade absoluta de ART gerados foram próximos a 0,5 mg. No mínimo duas diluições diferentes da enzima foram testadas.

#### 3.1.3.2 - Ensaio de hidrólise de avicel e quantificação dos produtos

Em tubos de ensaio de 15 mL com tampa foi colocado 0,5 mL da enzima previamente diluída. Os tubos foram levados ao banho termostático a 50 °C e deixados em repouso por cerca de 3 min para que chegassem à temperatura de incubação. Em seguida adicionou-se 0,5 mL da solução de avicel 0,5% *m/v*. Como este substrato é insolúvel, a solução foi mantida em constante agitação durante a transferência desta para os tubos. A mistura foi encubada por 60 min a 50 °C.

Transcorridos os 60 min de incubação, os tubos foram retirados do banho termostático e adicionou-se 3 mL de solução de DNS. Os tubos foram mantidos por exatos 10 min em água fervente. Todas as amostras, incluindo branco da enzima, branco do substrato, curva padrão e zero do espectro foram incubados nesse banho.

Os tubos foram retirados da água fervente e resfriado em banho de gelo. Em seguida foram centrifugados para que as partículas de celulose cristalina (avicel) que não reagiram não interferissem na leitura do espectrofotômetro.

Retirou-se uma alíquota de 0,2 mL de cada um dos tubos que foi transferida para novos tubos contendo 2,5 mL de água deionizada, a mistura foi agitada.

Em seguida foram transferidos 200 µL de cada tubo para microplaca (cada amostra foi transferida para 3 poços da microplaca) e determinou-se a absorbância a 540 nm em espectrofotômetro.

- **Zero do espectro:** Foram colocados 1 mL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico em um tubo de 15 mL com tampa. A mistura foi incubada juntamente com as amostras (60 min a 50 °C). Adicionou-se 3 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido por exatos 10 min em água fervente. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

- **Branco do substrato:** Foram colocados 0,5 mL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico e 0,5 mL da suspensão 0,5% m/v em um tubo de 15 mL com tampa. A mistura foi incubada juntamente com as amostras (60 min a 50 °C). Adicionou-se 3 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido por exatos 10 min em água fervente. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

- **Branco da enzima:** Foram colocados, em um tubo de 15 mL com tampa, 0,5 mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico e 0,5 mL da enzima diluída. A mistura foi incubada juntamente com as amostras (60 min a 50 °C). Adicionou-se 3 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido por exatos 10 min em água fervente. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

#### Construção da curva padrão:

As diluições para construção das curvas padrões foram preparadas a partir de uma solução padrão 2,0 g/L de glicose:

- Sem diluição = 2,0g/L (1 mg/0,5 mL\*);
- 1 mL + 0,5 mL de tampão = 1:1,5 = 1,33 g/L (0,67 mg/0,5 mL);
- 1 mL + 1 mL de tampão = 1:2 = 1,0 g/L (0,5 mg/0,5 mL);
- 1 mL + 3 mL de tampão = 1:4 = 0,5 g/L (0,25 mg/0,5 mL).

\*Entre parentes encontra-se a quantidade absoluta de glicose contida no tubo de reação.

Após o preparo das diluições da curva padrão, em novos tubos, foram colocados 0,5 mL da solução padrão de glicose previamente diluída e adicionou-se 0,5 mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico. Dessa forma, as absorbâncias obtidas foram correspondentes às quantidades absolutas de glicose contidas nos tubos de reação. Adicionou-se 3 mL de solução de DNS ao tubo que foi mantido em água fervente por exatos 10 min. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

A curva padrão foi construída usando a quantidade absoluta de glicose x absorbância em 540 nm.

### 3.1.3.3 - Cálculo da atividade enzimática em avicel

Do valor de absorbância obtido para a amostra foi descontada a absorbância do branco da enzima e do branco do substrato. Com este novo valor, foi calculado a quantidade absoluta de ART com base na curva padrão de glicose.

Uma unidade de exoglicanase é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o respectivo substrato para gerar 1 μmol de glicose por minuto nas condições descritas no procedimento. O cálculo dessa atividade é dado por:

$$U_{Avicel}/mL = \frac{ART(mg/mL).V_T(mL)}{T_H.0,18mg.V_E(mL)} \quad (2.7)$$

Em que:

- ART = concentração de açúcar redutor (mg/mL);
- V<sub>T</sub> = volume do reator (mL) = 1,0 mL;
- T<sub>H</sub> = tempo de hidrólise em minutos = 120 minutos;
- V<sub>E</sub> = volume da enzima (mL) = 0,5 mL;
- 0,18 mg = 1 μmol de glicose.

A atividade da exoglicanase, considerando a diluição da enzima, é o valor obtido anteriormente com auxílio da equação 2.7 multiplicado pela diluição empregada.

### *3.1.4- Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase utilizando celobiose*

#### **3.1.4.1 - Preparo de soluções**

A solução de tampão citrato utilizada aqui, foi preparada conforme descrito no item 3.1.1.1.

##### *Preparo da solução de Celobiose:*

Foi preparada uma solução de 15 mM de celobiose em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. Para isso, pesou-se 0,2566 g de celobiose que foi solubilizado e avolumado para 50 mL com tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M, pH 5. Esta solução não deve ser armazenada para uso posterior.

##### *Preparo da solução de enzima:*

A diluição da enzima foi feita em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. O procedimento foi realizado com duas diluições tais que, decorrido o tempo de incubação, nas condições reacionais utilizadas, a quantidade absoluta de glicose gerada foi pouco menor e pouco maior que 1,0 mg. No mínimo duas diluições diferentes da enzima foram testadas.

#### **3.1.4.2 - Ensaio de hidrólise de celobiose e quantificação dos produtos**

Em tubos de ensaio de 15 mL com tampa foi colocado 1,0 mL da enzima previamente diluída. Os tubos foram levados ao banho termostático a 50°C e deixados em repouso por cerca de 3 min para que chegassem à temperatura de incubação. Em seguida adicionou-se 1,0 mL da solução 15 mM da celobiose. A mistura foi agitada e encubada por 30 min a 50 °C.

Transcorridos os 30 min de incubação, os tubos foram retirados do banho termostático e interrompeu-se a reação mantendo-os em água fervente por 5 min. Todas as amostras, incluindo branco da enzima, branco do substrato, curva padrão e zero do espectro foram incubados nesse banho.

Os tubos foram retirados da água fervente e resfriado em banho de gelo.

A glicose formada foi determinada utilizando o reagente enzimático Glicose Oxidase. Em tubos de 10 mL foram adicionados 1 mL do reagente (Glicose Oxidase) e 10  $\mu$ L das amostras. A mistura foi agitada e incubada em banho termostático a 37 °C por 10 min.

Em seguida foram transferidos 200  $\mu$ L de cada tubo para microplaca (cada amostra foi transferida para 3 poços da microplaca) e determinou-se a absorvância a 505 nm em espectrofotômetro.

- **Zero do espectro:** Foram colocados 1 mL do reagente (Glicose Oxidase) e 10  $\mu$ L da solução tampão de citrato de sódio/ ácido cítrico em um tubo de 10 mL. A mistura foi incubada juntamente com as amostras (10 min a 37 °C). Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

- **Branco do substrato:** Foram colocados 1,0 mL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico e 1,0 mL da solução 15,0 mM de Celobiose em um tubo de 10 mL. A mistura foi incubada juntamente com as amostras (30 min a 50 °C). Interrompeu-se a reação mantendo os tubos em água fervente por 5 min. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

- **Branco da enzima:** Foram colocados, em um tubo de 15 mL, 1,0 mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico e 1,0 mL da enzima diluída. A mistura foi incubada juntamente com as amostras (30 min a 50 °C). Interrompeu-se a reação mantendo os tubos em água fervente por 5 min. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

#### Construção da curva padrão:

As diluições para construção das curvas padrões foram preparadas a partir de uma solução padrão 1,8 g/L de glicose:

- 100  $\mu$ L + 400  $\mu$ L de água destilada = 0,36 g/L;
- 200  $\mu$ L + 300  $\mu$ L de tampão = 0,72 g/L;
- 300  $\mu$ L + 200  $\mu$ L de tampão = 1,08 g/L;
- 400  $\mu$ L + 100  $\mu$ L de tampão = 1,44 g/L;
- 500  $\mu$ L + 0 de água destilada = 1,8 g/L.

Após o preparo das diluições da curva padrão, em novos tubos, foram colocados 1,0 mL do reagente enzimático e 10  $\mu$ L da diluição previamente preparada. Dessa forma,

as absorvâncias obtidas foram correspondentes às quantidades absolutas de glicose contidas nos tubos de reação. A quantidade de glicose gerada foi determinada utilizando o reagente enzimático Glicose Oxidase. Os passos seguintes do procedimento foram realizados conforme descrito anteriormente.

A curva padrão foi construída usando a quantidade absoluta de glicose x absorvância em 505 nm.

### 3.1.4.3 - Cálculo da atividade enzimática em celobiose

Do valor de absorvância obtido para a amostra foi descontada a absorvância do branco da enzima e do branco do substrato. Com este novo valor, foi calculado a quantidade absoluta de glicose com base na curva padrão de glicose.

Os valores de diluição empregados foram convertidos em concentração enzimática, com auxílio da equação 2.1.

Em seguida, em um gráfico semi-logaritmico, foram plotados os valores da concentração de glicose liberada contra a concentração de enzima:

Abscissa: glicose liberada (mg)

Ordenada:  $\log(1/\text{dil})$

Com a curva de regressão linear obtida foi estimada a concentração de enzima que gere exatamente 1,0 mg de glicose.

O cálculo da atividade, em CB, é dado por:

$$CB = \frac{0,0926}{\text{Concentração de enzima que fornece 1 mg de glicose}} \text{ unidades/mL} \quad (2.8)$$

A equação 2.8 é obtida da mesma maneira que a 2.2, apenas é necessário modificar os valores de quantidade de glicose formada e o tempo reacional. Também foi levado em consideração o fato de que 1  $\mu\text{mol}$  do substrato forma 2  $\mu\text{mol}$  de glicose no caso da celobiose.

## 3.2 - Determinação da Atividade Enzimática em Microescala

Com o objetivo de minimizar os resíduos gerados no processo de determinação de atividade enzimática bem como tornar o processo mais prático no que se diz respeito ao manuseio de vidrarias e equipamentos, a metodologia foi trabalhada para que pudesse ser realizada em escala micro com a mesma confiabilidade de resultados dos ensaios em tubo.

### *3.2.1 - Determinação da atividade total de celulase (FPase) utilizando papel filtro*

Algumas das metodologias descritas a seguir já foram estabelecidas e estão descritas na literatura, entretanto para este trabalho algumas adaptações foram realizadas.<sup>77</sup>

#### **3.2.1.1 - Preparo de soluções**

A solução de tampão citrato e de DNS utilizadas aqui foram preparadas conforme descrito no item 3.1.1.1.

##### *Preparo da solução de enzima:*

A diluição da enzima foi feita em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. O procedimento foi realizado com duas diluições tais que, decorrido o tempo de incubação, nas condições reacionais utilizadas, a quantidade absoluta de ART gerados foram pouco menor e pouco maior que 0,08 mg.

#### **3.2.1.2 - Ensaio de hidrólise de papel e quantificação dos produtos**

Para cada amostra o procedimento foi realizado, no mínimo, em triplicata. Foi utilizado como substrato discos de papel filtro Whatman nº 1 de 7 mm de diâmetro. Os discos de papel filtro foram obtidos utilizando um furador de papel.

Os discos de papel foram inseridos nos poços de microplacas de PCR-96 poços (Reação em cadeia pela polimerase) com auxílio de uma pinça. Foi necessário tomar



cuidado para que todos os discos ficassem bem próximos ao fundo dos poços e que a disposição fosse a mesma para todos. Em seguida adicionou-se, a cada poço contendo disco de papel filtro, 40 µL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. Tomou-se cuidado para que todos os discos de papel filtro ficassem imersos em solução tampão e que não existisse bolhas de ar nos poços. Posteriormente adicionou-se 20 µL da enzima previamente diluída em todos os poços com amostra, menos no “branco do substrato”. Homogeneizou-se a solução com auxílio da micropipeta automática.

Os controles (zero do espectro, branco da enzima e branco do substrato) foram preparados diretamente na microplaca.

- **Zero do espectro:** Foram colocados 60 µL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico em um dos poços da microplaca.

- **Branco do substrato:** Foram colocados 60 µL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico e um disco de papel filtro de 7 mm em 5 poços da microplaca.

- **Branco da enzima:** Foram colocados 40 µL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico e 20 µL da enzima diluída em 5 poços da microplaca.

A microplaca foi vedada com filme plástico adesivo próprio para essa finalidade e incubada a 50 °C por 60 min em um termociclador.

No intervalo da incubação foi preparada a curva padrão (mesma que no item 3.1.1.2).

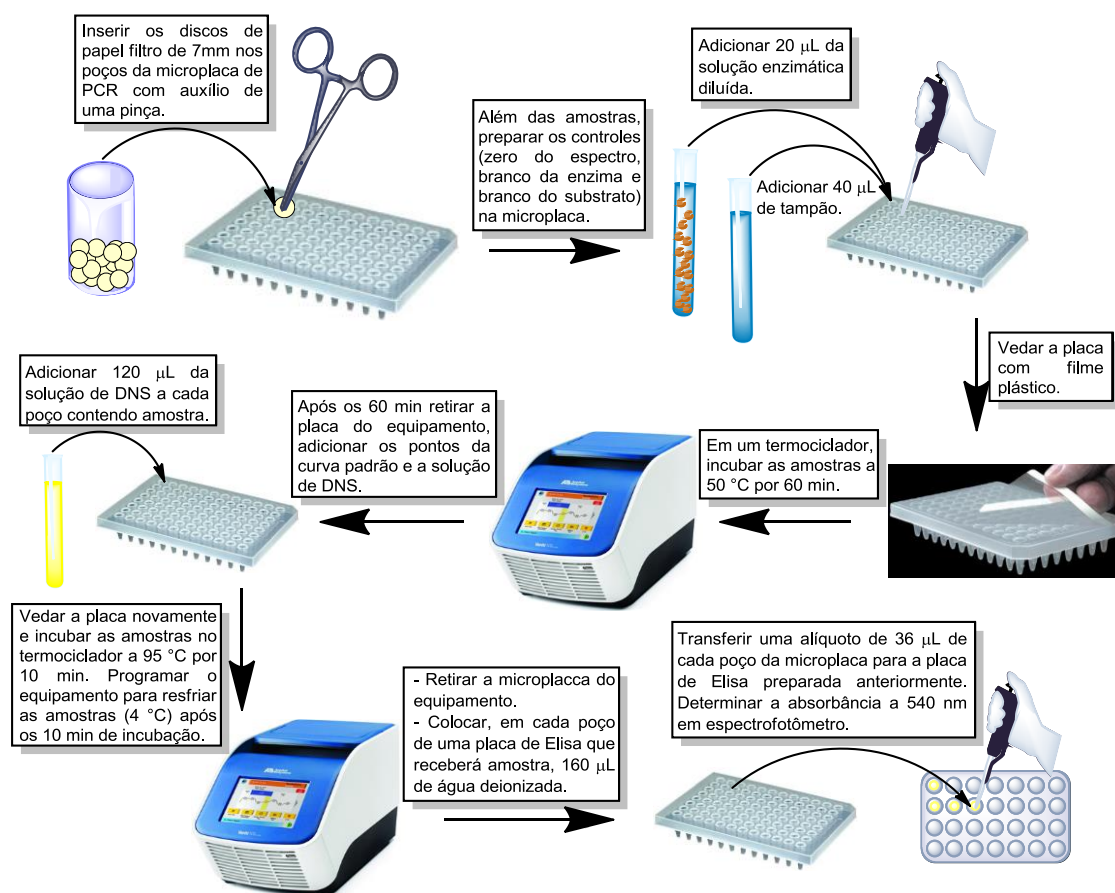
Após o preparo das diluições da curva padrão e transcorrido o tempo de incubação a placa foi retirada do termociclador e foram adicionados 20 µL da solução padrão de glicose previamente diluída e 40 µL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico. Dessa forma, as absorbâncias obtidas foram correspondentes às quantidades absolutas de ART contidos em todos os poços de reação.

Adicionou-se 120 µL de solução de DNS a todos os poços. A microplaca foi novamente vedada e incubada a 95 °C por 10 min no termociclador. O equipamento foi programado para resfriar (4 °C) a microplaca assim que os 10 min terminassem.

Após o resfriamento da microplaca, retirou-se uma alíquota de 36 µL de cada um dos poços que foram transferidas para uma placa de Elisa. Na placa de Elisa foi adicionado, a cada poço com amostra, 160 µL de água deionizada. A mistura foi homogeneizada com auxílio de uma micropipeta automática. A absorbância foi determinada a 540 nm em um espectrofotômetro.

A curva padrão foi construída usando a quantidade absoluta de glicose x absorbância em 540 nm.

O Esquema 7 ilustra esquematicamente o procedimento experimental da determinação da atividade enzimática total com papel filtro em microescala.



**Esquema 7-** Representação esquemática do procedimento experimental de determinação da atividade enzimática em microescala.

### 3.2.1.3 - Cálculo da atividade enzimática em papel

Do valor de absorbância obtido para a amostra foi descontada a absorbância do branco da enzima e do branco do substrato. Com este novo valor, foi calculado a quantidade absoluta de ART com base na curva padrão de glicose.

Os valores de diluição empregados foram convertidos em concentração enzimática, com auxílio da equação 2.1.

Em seguida, em um gráfico semi-logaritmico, foram plotados os valores da concentração de glicose (ART) liberada contra a concentração de enzima:

Abscissa: glicose liberada (mg)

Ordenada: log(1/dil)

Com a curva de regressão linear obtida foi estimada a concentração de enzima que gere exatamente 0,08 mg de glicose.

O cálculo da atividade, em FPU, é dado por:

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Concentração de enzima que fornece 0,08 mg de glicose}} \text{ unidades/mL} \quad (2.9)$$

A equação 2.8 foi obtida da mesma maneira que a 2.2, apenas foi necessário modificar o valor de quantidade de glicose formada.

### 3.2.2 - Determinação da atividade de endoglicanase utilizando CMC

#### 3.2.2.1 - Preparo de soluções

A solução de tampão citrato e de DNS utilizadas aqui foram preparadas conforme descrito no item 3.1.1.1. A solução de CMC utilizada foi a mesma preparada para o ensaio em tubos, descrita no item 3.1.2.1.

#### Preparo da solução de enzima:

A diluição da enzima foi feita em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. O procedimento foi realizado com duas diluições tais que, decorrido o tempo de incubação, nas condições reacionais utilizadas, a quantidade absoluta de açúcares redutores totais (ART) gerados foram pouco menor e pouco maior que 0,02 mg.

#### 3.2.2.2 - Ensaio de hidrólise de carboximetilcelulose e quantificação dos produtos

Para cada amostra o procedimento foi realizado, no mínimo, em quintuplicata.

Foram colocados 20 µL da enzima previamente diluída (caso necessário) e 20 µL da solução de CMC 2% m/v nos poços de uma microplaca de PCR-96 poços. Tomou-se cuidado para que não existissem bolhas de ar nos poços. Homogeneizou-se a solução com auxílio da micropipeta automática.

Os controles (zero do espectro, branco da enzima e branco do substrato) também foram preparados diretamente na microplaca.

- **Zero do espectro:** Foram colocados 40  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico em um dos poços da microplaca.

- **Branco do substrato:** Foram colocados 20  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico e 20  $\mu\text{L}$  da solução de CMC 2% m/v em 5 poços da microplaca.

- **Branco da enzima:** Foram colocados 20  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio/ácido cítrico e 20  $\mu\text{L}$  da enzima diluída em 5 poços da microplaca.

A microplaca foi vedada com filme plástico adesivo próprio para essa finalidade e incubada a 50 °C por 30 min em um termociclador.

No intervalo da incubação foi preparada a curva padrão (mesma que no item 3.1.2.2).

Após o preparo das diluições da curva padrão e transcorrido o tempo de incubação a microplaca foi retirada do termociclador e foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da solução padrão de glicose previamente diluída e 20  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio/ácido cítrico. Dessa forma, as absorbâncias obtidas foram correspondentes às quantidades absolutas de ART contidas em todos os poços de reação.

Adicionou-se 120  $\mu\text{L}$  de solução de DNS a todos os poços. A microplaca foi novamente vedada e incubada a 95 °C por 10 min no termociclador. O equipamento foi programado para resfriar (4 °C) a microplaca assim que os 10 min de incubação terminassem.

Após o resfriamento da microplaca, retirou-se uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de cada um dos poços que foram transferidas para uma placa de Elisa. Na placa de Elisa foi adicionado, a cada poço com amostra, 100  $\mu\text{L}$  de água deionizada. A mistura foi homogeneizada com auxílio de uma micropipeta automática. A absorbância foi determinada a 540 nm em um espectrofotômetro.

A curva padrão foi construída usando a quantidade absoluta de glicose x absorbância em 540 nm.

### 3.2.2.3 - Cálculo da atividade enzimática em carboximetilcelulose

Do valor de absorbância obtido para a amostra foi descontada a absorbância do branco da enzima e do branco do substrato. Com este novo valor, foi calculado a quantidade absoluta de ART com base na curva padrão de glicose.

Os valores de diluição empregados foram convertidos em concentração enzimática, com auxílio da equação 2.1.

Em seguida, em um gráfico semi-logaritmico, foram plotados os valores da concentração de glicose (ART) liberada contra a concentração de enzima:

Abscissa: glicose liberada (mg)

Ordenada:  $\log(1/\text{dil})$

Com a curva de regressão linear obtida foi estimada a concentração de enzima que gere exatamente 0,02 mg de glicose.

O cálculo da atividade, em CMC, é dado por:

$$CMC = \frac{0,185}{\text{Concentração de enzima que fornece } 0,02 \text{ mg de glicose}} \text{ unidades/mL} \quad (2.10)$$

A equação 2.10 foi obtida da mesma maneira que a 2.2, apenas foi necessário modificar os valores de quantidade de glicose formada e o tempo reacional.

### 3.2.3- Determinação da atividade de exoglicanase utilizando avicel

#### 3.2.3.1 - Preparo de soluções

A solução de tampão citrato e de DNS utilizadas aqui foram preparadas conforme descrito no item 3.1.1.1. A solução de avicel utilizada foi a mesma preparada para o ensaio em tubos (item 3.1.3.1).

#### Preparo da solução de enzima:

A diluição da enzima foi feita em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. O procedimento foi realizado com duas diluições tais que, decorrido o tempo de incubação,

nas condições reacionais utilizadas, a quantidade absoluta de ART gerados foram próximos a 0,02 mg.

### 3.2.3.2 - Ensaio de hidrólise de avicel e quantificação dos produtos

Para cada amostra o procedimento foi realizado, no mínimo, em quintuplicata.

Foram colocados 20 µL da enzima previamente diluída (caso necessário) e 20 µL da solução de avicel 0,5% m/v nos poços de uma microplaca de PCR-96 poços. Tomou-se cuidado para que não existissem bolhas de ar nos poços. Homogeneizou-se a solução com auxílio da micropipeta automática.

Os controles (zero do espectro, branco da enzima e branco do substrato) também foram preparados diretamente na microplaca.

- **Zero do espectro:** Foram colocados 40 µL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico em um dos poços da microplaca.

- **Branco do substrato:** Foram colocados 20 µL de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico e 20 µL da solução de Avicel 0,5% m/v em 5 poços da microplaca.

- **Branco da enzima:** Foram colocados 20 µL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico e 20 µL da enzima diluída em 5 poços da microplaca.

A microplaca foi vedada com filme plástico adesivo próprio para essa finalidade e incubada a 50 °C por 60 min em um termociclador.

No intervalo da incubação foi preparada a curva padrão (mesma que no item 3.1.3.2).

Após o preparo das diluições da curva padrão e transcorrido o tempo de incubação a microplaca foi retirada do termociclador e foram adicionados 20 µL da solução padrão de glicose previamente diluída (a 5 poços da microplaca) e 20 µL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico. Dessa forma, as absorbâncias obtidas foram correspondentes às quantidades absolutas de glicose contidas em todos os poços de reação.

Adicionou-se 120 µL de solução de DNS a todos os poços. A microplaca foi novamente vedada e incubada a 95 °C por 10 min no termociclador. O equipamento foi programado para resfriar (4 °C) a microplaca assim que os 10 min de incubação terminassem.

Após o resfriamento a microplaca foi centrifugada para que as partículas de celulose cristalina (avicel) que não reagiram não interferissem na leitura do

espectrofotômetro. Retirou-se uma alíquota de 20 µL de cada um dos poços que foram transferidas para uma placa de Elisa. Na placa de Elisa foi adicionado, a cada poço com amostra, 100 µL de água deionizada. A mistura foi homogeneizada com auxílio de uma micropipeta automática. A absorbância foi determinada a 540 nm em um espectrofotômetro.

A curva padrão foi construída usando a quantidade absoluta de glicose x absorbância em 540 nm.

### **3.2.3.3 - Cálculo da atividade enzimática em avicel**

Do valor de absorbância obtido para a amostra foi descontada a absorbância do branco da enzima e do branco do substrato. Com este novo valor, foi calculado a quantidade absoluta de ART com base na curva padrão de glicose.

Uma unidade de exoglicanase é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o respectivo substrato para gerar 1µmol de glicose por minuto nas condições descritas no procedimento. O cálculo dessa atividade foi calculado com auxílio da equação 2.7.

### *3.2.4- Determinação da atividade de β-glicosidase utilizando celobiose*

#### **3.2.4.1 - Preparo de soluções**

A solução de tampão citrato e de DNS utilizadas aqui foram preparadas conforme descrito no item 3.1.1.1. A solução de celobiose utilizada foi a mesma preparada para o ensaio em tubos (item 3.1.4.1).

#### *Preparo da solução de enzima:*

A diluição da enzima foi feita em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. O procedimento foi realizado com duas diluições tais que, decorrido o tempo de incubação, nas condições reacionais utilizadas, a quantidade absoluta de ART gerados foram pouco menor e pouco maior que 0,1 mg. No mínimo duas diluições diferentes da enzima foram testadas.

### 3.2.4.2 - Ensaio de hidrólise de celobiose e quantificação dos produtos

Para cada amostra o procedimento foi realizado, no mínimo, em quintuplicata.

Foram colocados 100  $\mu\text{L}$  da enzima previamente diluída e 100  $\mu\text{L}$  da solução de Celobiose 15 mM nos poços de uma microplaca de PCR-96 poços. Tomou-se cuidado para que não existissem bolhas de ar nos poços. Homogeneizou-se a solução com auxílio da micropipeta automática.

Os controles (zero do espectro, branco da enzima e branco do substrato) também foram preparados diretamente na microplaca.

- **Zero do espectro:** Foram colocados 200  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico em um dos poços da microplaca.

- **Branco do substrato:** Foram colocados 100  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio/ ácido cítrico e 100  $\mu\text{L}$  da solução de Celobiose 15 mM em 5 poços da microplaca.

- **Branco da enzima:** Foram colocados 100  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio/ácido cítrico e 100  $\mu\text{L}$  da enzima diluída em 5 poços da microplaca.

A microplaca foi vedada com filme plástico adesivo próprio para essa finalidade e incubada a 50 °C por 30 min em um termociclador. O equipamento foi programado para que, após os 30 min, a temperatura se elevasse a 95 °C por 10 min para a enzima ser inativada e, assim, cessar a reação.

No intervalo da incubação foi preparada a curva padrão (mesma que no item 3.1.4.2).

Após o preparo das diluições da curva padrão e transcorrido o tempo de incubação a microplaca foi retirada do termociclador e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão de glicose previamente diluída (a 5 poços da microplaca) e 100  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio/ácido cítrico. Dessa forma, as absorbâncias obtidas foram correspondentes às quantidades absolutas de glicose contidas em todos os poços de reação.

A quantidade de glicose gerada foi determinada utilizando o reagente enzimático Glicose Oxidase. Em uma placa Elisa foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  do reagente (Glicose Oxidase) e 2,5  $\mu\text{L}$  das amostras. A mistura foi homogeneizada com auxílio de uma micropipeta automática e incubada em banho termostático a 37 °C por 10 minutos. Determinou-se a absorbância a 505 nm em espectrofotômetro.

A curva padrão foi construída usando a quantidade absoluta de glicose x absorbância em 505 nm.



### 3.2.4.3 - Cálculo da atividade enzimática em celobiose

Do valor de absorvância obtido para a amostra foi descontada a absorvância do branco da enzima e do branco do substrato. Com este novo valor, foi calculado a quantidade absoluta de glicose com base na curva padrão de glicose.

Os valores de diluição empregados foram convertidos em concentração enzimática, com auxílio da equação 2.1.

Em seguida, em um gráfico semi-logaritmico, foram plotados os valores da concentração de glicose liberada contra a concentração de enzima:

Abscissa: glicose liberada (mg)

Ordenada:  $\log(1/\text{dil})$

Com a curva de regressão linear obtida foi estimada a concentração de enzima que gere exatamente 0,1 mg de glicose.

O cálculo da atividade, em CB, é dado por:

$$CB = \frac{0,0926}{\text{Concentração de enzima que fornece } 0,1 \text{ mg de glicose}} \text{ unidades/mL} \quad (2.11)$$

A equação 2.11 é obtida da mesma maneira que a 2.2, apenas é necessário modificar os valores de quantidade de glicose formada e o tempo reacional. Também foi levado em consideração o fato de que 1  $\mu\text{mol}$  do substrato forma 2  $\mu\text{mol}$  de glicose no caso da celobiose.

## 3.3 – Pré-tratamento e caracterização da biomassa

A biomassa de estudo foi a *brachiaria brizantha cv. Marandu*, gentilmente cedida pela Embrapa Cerrados. O material foi cultivado em campo experimental da Embrapa Cerrados e passou por secagem a 70 °C por 48 h e moagem em moinho de facas (granulometria máxima de 2 mm).

### 3.3.1 - Caracterização da biomassa

Brachiaria in natura e pré-tratada foram caracterizadas quanto a umidade, teor de celulose, hemicelulose e lignina. A determinação da umidade foi realizada empregando o analisador de umidade, modelo IV 3000, da marca GEHAKA. A determinação dos componentes principais foi realizada utilizando a metodologia adaptada de Gouveia et al.<sup>78</sup>

### 3.3.2 - *Pré-tratamento*

O pré-tratamento da brachiaria foi realizado em duas etapas, ácida e alcalina, as quais são descritas a seguir.

#### *Etapa ácida:*

Foi pesado em um béquer de plástico, de 250 mL, 20 g da biomassa seca.

Preparou-se uma solução ácida de ácido Sulfúrico P.A. em água destilada de forma a se obter uma solução com concentração de 1,5% (v/v) de ácido.

A solução ácida foi adicionada ao béquer contendo o material previamente pesado numa razão sólido/líquido de 1/10 (200 mL de ácido) e agitada com o auxílio de um bastão de vidro. Tomou-se cuidado para que não houvesse a deposição de material na parede do béquer.

O béquer foi tampado com papel pardo e coberto com papel filme. A mistura foi levada imediatamente para autoclave. Esperou-se até que o monômetro indicasse 1 atm e 121 °C, a partir desse momento foi marcado 30 min.

Passados os 30 min, o béquer foi retirado da autoclave e transferido para um recipiente contendo água gelada para que o material fosse resfriado.

A fração sólida foi separada da líquida por filtração em tecido, a biomassa foi espremida para a máxima retirada do líquido. O sólido obtido foi lavado 2 vezes com água destilada. Cada lavagem foi realizada com o mesmo volume de solução ácida utilizada no pré-tratamento (200 mL). Em cada lavagem o sólido foi separado do líquido por filtração com tecido. As frações líquidas foram neutralizadas e descartadas.

Foi retirada uma alíquota do material para se determinar o teor de umidade (ou matéria seca). O restante foi guardado em geladeira até que se pudesse realizar o pré-tratamento alcalino.

Etapa alcalina:

Foi preparada uma solução alcalina, NaOH 4% m/v em água destilada.

Pesou-se em um béquer de plástico de 250 mL o material que foi lavado após pré-tratamento ácido. Conhecido o peso seco do material, a solução alcalina foi adicionada ao béquer contendo o material previamente pesado numa razão sólido seco/líquido de 1/10. A mistura foi agitada com o auxílio de um bastão de vidro. Tomou-se cuidado para que não houvesse a deposição de material na parede do béquer.

O béquer foi tampado com papel pardo e coberto com papel filme. A mistura foi levada imediatamente para autoclave. Esperou-se até que o monômetro indicasse 1 atm e 121 °C, a partir desse momento foi marcado 30 min.

Passados os 30 min, o béquer foi retirado da autoclave. Imediatamente o material foi lavado com água fervente até que fosse observada a descoloração do mesmo (aproximadamente 1 L).

Foi retirada uma alíquota do material para se determinar o teor de umidade (ou matéria seca). O restante foi guardado em geladeira até que se pudesse realizar o processo de hidrólise enzimática.

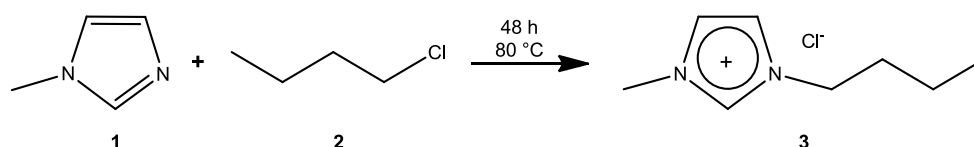
### 3.4 - Síntese do LI bis(trifluorometano-sulfonil)imidato de 1-*n*-butil-3-*n*-metilimidazolio (BMI.NTf<sub>2</sub>)

A síntese do LI utilizado já foi bem descrita na literatura, logo o procedimento experimental foi realizado sem muitas modificações.<sup>79,80</sup>

O reagente de partida 1-metilimidazol (1) foi destilado para garantir sua pureza. Em seguida em um balão de duas bocas foi colocado o clorobutano (2), a reação foi feita na proporção 1:1,3 (1-metilimidazol:clorobutano). Uma das bocas do balão foi vedada com um septo de borracha e na outra boca foi acoplado um condensador, para que o reagente 2 pudesse refluxar. O condensador também foi vedado com um septo de borracha e uma bexiga com gás nitrogênio foi adaptada para ser colocada no septo e garantir que a pressão do sistema não aumentasse muito. O balão foi colocado em um banho de silicone com temperatura de 80 °C. Em seguida o 1-metilimidazol foi adicionado lentamente ao balão com auxílio de uma seringa. Após 48h o balão foi retirado do aquecimento e o excesso de 2 foi retirado com auxílio de um rotaevaporador. O

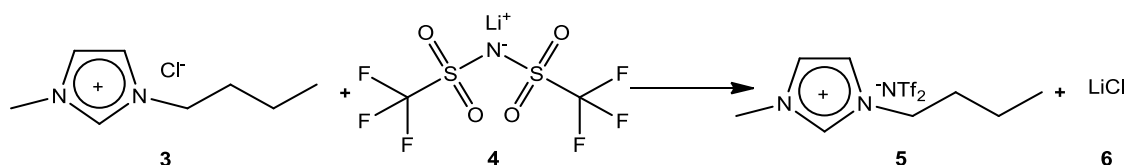
produto da reação, cloreto de 1-*n*-butil-3-*n*-metilimidazolio (BMI.Cl) (3), foi lavado 3 vezes com acetato de etila. O excesso de acetato de etila foi retirado com auxílio de um funil de separação e o restante com auxílio de um rotaevaporador, como resultado foi observada a formação de uma solução muito viscosa e incolor. Em seguida o balão com produto foi colocado no congelador até que se transformasse em um sólido branco.

O Esquema 8 ilustra a reação de formação do LI BMI.Cl.



**Esquema 8.** Síntese do BMI.Cl.

Obtido o LI 3, foi realizada a troca do ânion cloreto (Cl<sup>-</sup>) pelo bis(trifluorometano-sulfonil)imidato (NTf<sub>2</sub>) na proporção molar 1:1. Para isso utilizou-se o sal bis(trifluorometano)-sulfonimida de lítio (4), como representado no Esquema 9.



**Esquema 9** - Síntese do BMI.NTf<sub>2</sub>.

O LI 3 foi solubilizado no mínimo de água destilada possível. Em seguida adicionou-se o sal de lítio em solução. A mistura foi agitada magneticamente por 3 h, passado esse tempo a parte orgânica da mistura foi extraída com diclorometano. A parte orgânica extraída foi lavada com água destilada. O excesso de água foi retirado com auxílio de um funil de separação. Para retirar o restante da água na mistura foi utilizado sulfato de magnésio. Para finalizar a síntese do LI bis(trifluorometano-sulfonil)imidato de 1-*n*-butil-3-*n*-metilimidazolio (BMI.NTf<sub>2</sub>) (5) fez-se uma filtração a vácuo utilizando alumina e celite.

### 3.5 - Hidrólise enzimática de biomassa utilizando LI

Para avaliar adequadamente o desempenho de celulasas sobre a hidrólise de biomassa pré-tratada e in natura em meios contendo LI alguns testes para validar a quantificação dos produtos da hidrólise foram realizados, por exemplo, verificar se a presença do LI interfere na leitura de absorbância, se o produto da hidrólise é particionado entre a fase aquosa e LI, se a força iônica do tampão interfere na separação das fases aquosa e LI, estabilidade das enzimas na presença de LI, etc. A descrição de alguns destes procedimentos serão apresentadas a seguir e outros detalhes serão apresentados no item “Resultados e Discussão”.

### *3.5.1 - Efeito da força iônica na separação de fases aquosa e LI*

Com o objetivo de observar o comportamento do LI BMI.NTf2 frente às soluções tampão de diferentes concentrações foram preparadas 2 soluções tampão (0,1 M e 0,005 M). Em 3 frascos de cintilografia foram adicionados 2,5 mL do LI e 2,5 mL de uma das soluções tampão (em um dos 3 frascos foi adicionado água no lugar da solução tampão). As 2 amostras com tampão e uma amostra com água foram submetidas à agitação magnética a 50 °C. Após 2 h os frascos foram colocados em repouso, passados 5 min uma fotografia foi tirada. Os frascos foram novamente submetidos à agitação magnética a 50 °C. Após 24 h os frascos foram colocados em repouso novamente, passados 5 min outra fotografia foi tirada.

### *3.5.2 - Partição de glicose nas fases aquosa e LI*

Nos processos de hidrólise enzimática utilizando líquido iônico, é preparada uma mistura contendo LI, solução aquosa da enzima e biomassa. O LI utilizado neste estudo é imiscível em água. Ao final da hidrólise, um procedimento padrão para manter a mistura reacional em repouso por 5 min foi estabelecido para obter completa separação entre as fases líquidas (LI e solução aquosa). É esperado que todo o açúcar liberado permaneça na fase aquosa, entretanto para comprovar isto, um teste utilizando solução padrão de glicose foi utilizado. Este procedimento é descrito a seguir.

Em um frasco de cintilografia foram colocados 2,5 mL de BMI.NTf<sub>2</sub> e 2,5 mL de uma solução padrão de glicose (1,8 g/L). A mistura foi agitada com auxílio de uma barra

magnética e aquecida a 50 °C. Foram retiradas 4 alíquotas (3h, 24h, 48h e 72h) e determinada a quantidade de glicose em solução.

A quantidade de glicose gerada foi determinada utilizando o kit enzimático contendo glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.4.2.

### 3.5.3 – Estabilidade das celulases na presença de LI

Em um frasco de cintilografia foram colocados 2,5 mL de BMI.NTf<sub>2</sub>, 2,5 mL da solução tampão e 1200 uL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 1180 µL de tampão). A mistura foi agitada com auxílio de uma barra magnética e aquecida a 50 °C. Foram retiradas 3 alíquotas (0 h, 2 h e 24 h) e determinada a atividade enzimática total como descrito no item 3.2.1.

### 3.5.4 - Hidrólise da biomassa *in natura*

Para determinar a quantidade de glicose que a enzima conseguiria formar a partir da biomassa “*in natura*” foi realizado o seguinte experimento: em um frasco de cintilografia foram colocados 2,5 mL de BMI.NTf<sub>2</sub>, 2,5 mL da solução tampão, 480 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 460 µL de tampão) e 0,375 g de biomassa seca sem pré-tratamento. A mistura foi agitada com auxílio de uma barra magnética e aquecida a 50 °C. Foram retiradas 4 alíquotas (1 h, 24 h, 48 h e 72 h) e determinada a quantidade de glicose em cada amostra.

A quantidade de glicose gerada foi determinada da mesma maneira que no item 3.1.4.2.

Posteriormente foram realizados 4 experimentos com quantidades diferentes de LI em cada um deles, para se observar o comportamento da biomassa bem como das enzimas frente a essa variação de concentração. Os experimentos foram preparados como descrito a seguir.

Foram preparadas 4 reações com quantidades diferentes de LI.

- 1- Sem LI (controle):** Em um frasco de cintilografia foram colocados 5,00 mL de solução tampão, 600 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 580 µL de tampão) e 0,375 g de biomassa seca sem pré-tratamento.

- 2- **Com 1,25 mL de LI:** Em um frasco de cintilografia foram colocados 1,25 mL de BMI.NTf<sub>2</sub>, 3,75 mL da solução tampão, 600 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 580 µL de tampão) e 0,375g de biomassa seca sem pré-tratamento.
- 3- **Com 2,5 mL de LI:** Em um frasco de cintilografia foram colocados 2,50 mL de BMI.NTf<sub>2</sub>, 2,5 mL da solução tampão, 600 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 580 µL de tampão) e 0,375 g de biomassa seca sem pré-tratamento.
- 4- **Com 3,75 mL de LI:** Em um frasco de cintilografia foram colocados 3,75 mL de BMI.NTf<sub>2</sub>, 1,25 mL da solução tampão, 600 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 580 µL de tampão) e 0,375 g de biomassa seca sem pré-tratamento.

As misturas foram submetidas à agitação com auxílio de uma barra magnética e aquecida a 50 °C. Foram retiradas 3 alíquotas (0 h, 24 h e 48 h) de cada amostra e determinada a quantidade de glicose em solução.

A quantidade de glicose gerada foi determinada da mesma maneira que no item 3.1.4.2

Com o objetivo de analisar a capacidade do LI BMI.NTf<sub>2</sub> em desconstruir a biomassa para facilitar a etapa de hidrólise enzimática foi preparado um experimento em que apenas a biomassa e o LI foram aquecidos previamente, como descrito a seguir.

Foram preparadas duas reações para esse estudo.

- 1- **Controle:** Em um frasco de cintilografia foram colocados 2,5 mL de BMI.NTf<sub>2</sub>, 2,5 mL da solução tampão, 720 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 700 µL de tampão) e 0,375 g de biomassa seca sem pré-tratamento.
- 2- **Reação com aquecimento:** Em um frasco de cintilografia foram colocados 2,5 mL de BMI.NTf<sub>2</sub> e 0,375 g de biomassa seca sem pré-tratamento. Essa mistura foi aquecida a 100 °C por 2 h. Após a etapa de aquecimento foram adicionados 2,5 mL da solução tampão, 720 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 700 µL de tampão).

As misturas foram agitadas com auxílio de uma barra magnética e aquecidas a 50 °C. Foram retiradas 12 alíquotas (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h e 24 h) e determinada a quantidade de glicose em cada amostra.

Após retirar a alíquota de 24 h foi adicionado a cada reação mais 720 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 700 µL de tampão). Logo em seguida da adição da solução enzimática, foram retiradas 10 alíquotas (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h e 24 h) e determinada a quantidade de glicose em cada amostra.

A quantidade de glicose gerada foi determinada da mesma maneira que na reação de “LI + Solução padrão de glicose” (primeiro item dessa sessão).

### 3.5.5 - Hidrólise da biomassa pré-tratada

Por fim, foram preparadas reações com a biomassa pré-tratada (pré-tratamento ácido seguido do básico) e testado seu reciclo, como descrito em seguida.

Foram preparadas quatro reações para esse estudo.

- 1- Controle 1:** Em um frasco de cintilografia foram colocados 4260 µL da solução tampão, 720 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 700 µL de tampão) e 1,470 g de biomassa úmida pré-tratada.
- 2- Controle 2:** Mesmo que no “controle 1”.
- 3- Reação 1:** Em um frasco de cintilografia foram colocados 2,5 mL de BMI.NTf<sub>2</sub>, 1750 µL da solução tampão, 720 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 700 µL de tampão) e 1,470 g de biomassa úmida pré-tratada.
- 4- Reação 2:** Mesmo na “reação 1”.

As misturas foram agitadas com auxílio de uma barra magnética e aquecidas a 50 °C. Foram retiradas 16 alíquotas (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72 h) e determinada a quantidade de glicose em cada amostra.

Após retirar a alíquota de 72 h foram adicionados ao “Controle 1” e a “Reação 1” mais 720 µL da solução enzimática previamente preparada (20 µL de enzima + 700 µL de tampão) e mais 1,470 g de biomassa úmida pré-tratada. Ao “Controle 2” e a “Reação 2” foi adicionado apenas 1,470 g da biomassa úmida pré-tratada. Logo em seguida a



adição da solução enzimática, foram retiradas 11 alíquotas (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 24 h, 48 h e 72 h) e determinada a quantidade de glicose em cada amostra.

A quantidade de glicose gerada foi determinada da mesma maneira que na reação de “LI + Solução padrão de glicose” (primeiro item dessa sessão).

## 4 - Resultados e Discussão

Inicialmente foi necessário realizar os experimentos de determinação da atividade enzimática do coquetel enzimático. Posteriormente analisou-se o comportamento da biomassa e das enzimas frente ao LI escolhido, BMI.NTf<sub>2</sub>. Após o estabelecimento de todas as variáveis reacionais, o LI foi testado como suporte enzimático na reação de hidrólise da biomassa “*in natura*” e pré-tratada. A discussão de cada experimento foi dividida em tópicos e dispostas a seguir.

### 4.1 - Atividades enzimáticas do extrato Cellic Ctec 2 em tubo e microensaio

As determinações da atividade enzimática do extrato enzimático total, da  $\beta$ -glicosidade, da celobiohidrolase e da endoglicanase foram importantíssimas para o seguimento do trabalho, pois os valores encontrados serviram de parâmetro de comparação para os experimentos seguintes. A Tabela 1 dispõe os valores das atividades encontrados para os experimentos realizados em tubos e em microescala.

**Tabela 1** - Atividades do extrato enzimático total (FPase),  $\beta$ -glicosidase (celobiase), celobiohidrolase (avicelase) e endoglicanase (CMCase). Os ensaios de hidrólise dos substratos foram realizados em, no mínimo, sextuplicata e os valores de média e desvio padrão foram dispostos na tabela.

Escala	Atividades			
	Celobiase (UCB/mL)	Avicelase (U/mL)	CMCase (U/mL)	FPase (U/mL)
<b>Tubo</b>	6.130,80 ± 547,4	45,60 ± 3,5	5773,11 ± 338,9	188,00 ± 13,5
<b>Micro ensaio</b>	3208,22 ± 172,3	50,16 ± 1,7	4286,15 ± 2272,6	217,52 ± 11,2

Quando era observado um decréscimo nas atividades das celulases em comparação aos valores dispostos na Tabela 1 significava que as enzimas estavam desnaturando no meio reacional contendo LI.

As diluições enzimáticas foram diferentes para cada determinação de atividade. Para a determinação da atividade enzimática total do extrato as diluições foram de 1:500 e 1:600 (1 de enzima para 600 de solução total). Para a  $\beta$ -glicosidase as diluições foram

de 1:60000 e 1:70000. Para a celobiohidrolase a diluição foi de 1:600. E para a endoglicanase as diluições foram de 1:25000 e 1:30000.

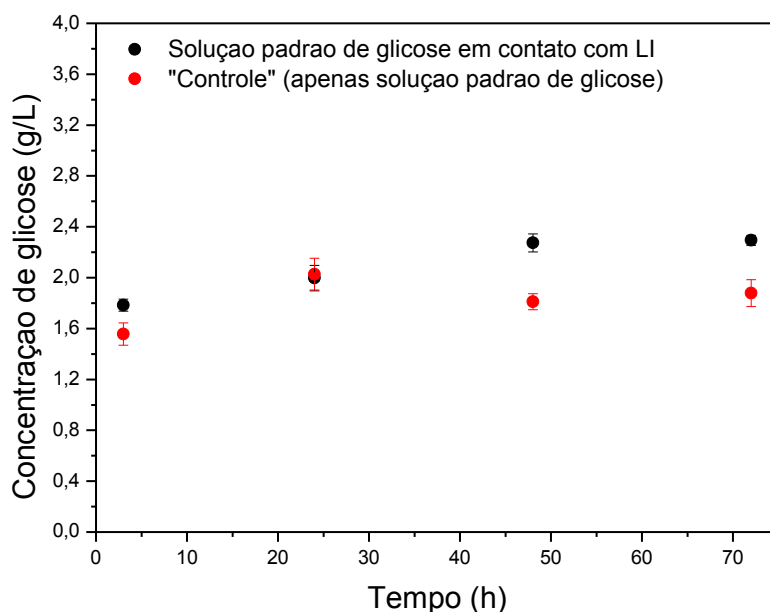
Alguns valores de desvio padrão elevados observados no caso da CMCase podem ser atribuídos a erros experimentais de pipetagem e leituras das absorbâncias pelo espectrofotômetro. Nos ensaios em escala micro os volumes pipetados são muito pequenos, ou seja, qualquer variação mínima do volume pode ocasionar erros consideráveis.

Tendo os valores de atividade pode-se calcular a quantidade de extrato enzimático que seria necessária para fornecer 20 FPU (valor aproximado do recomendado em artigos científicos) em cada reação.<sup>75</sup>

## 4.2 - Partição da glicose em tampão e LI

O parâmetro utilizado para determinar a eficiência da hidrólise enzimática é a concentração de glicose no meio reacional. Logo, é de extrema importância avaliar o comportamento da glicose na presença do LI BMI.NTf<sub>2</sub>, ou seja, se a glicose migra para a fase iônica. Caso houvesse migração, a quantificação da glicose seria um procedimento mais complexo, envolvendo possível extração do analito e análise em HPLC. A glicose teria que ser quantificada nas duas fases e sua concentração seria dada em unidades de massa/massa, visto que há uma diferença significativa na viscosidade dos dois líquidos e que a pipetagem dos mesmos poderia resultar em grandes erros experimentais. A análise por HPLC seria mais adequada porque é um método mais sensível e menos susceptível à interferência do LI, ao contrário do método que utiliza um kit enzimático (glicose oxidase e peroxidase), nos quais as enzimas poderiam sofrer inativação ou inibição na presença do LI, levando a quantificação errada da glicose.

Para identificar se existe migração da glicose para a fase iônica da reação foram montadas duas reações com uma solução padrão de glicose (1,8 g/L), uma em contato com o LI e outra que funcionou como um controle, como descrito no item 3.5.2 da parte experimental. A Figura 4 expõe graficamente os dados coletados do experimento.



**Figura 4** – Gráfico da concentração de glicose (g/L) x tempo (h) da solução padrão de glicose em contato com o LI e do controle da reação (apenas solução padrão de glicose).

Não houve variação significativa dos valores de concentração de glicose na fase aquosa do ensaio, sendo a variação de aproximadamente 0,4 g/L apresentada pela solução que entrou em contato com o LI nos pontos 48 e 73 h atribuídas a erros experimentais (pipetagem e leitura do espectrofotômetro).

### 4.3 - Definição do sistema Líquido Iônico: Solução enzimática

Para o uso eficaz de um meio reacional contendo BMI.NTf<sub>2</sub> e solução enzimática (aquosa), é necessário definir e avaliar alguns parâmetros como, por exemplo, proporção de LI e solução aquosa, efeito da concentração de íons e outros compostos na solução enzimática, tempo de repouso para separação de fases, avaliação da ação de LI sobre a biomassa, carga de biomassa em cada batelada, etc. Isso tudo influenciará na recuperação e reutilização de LI e enzimas, assim como na produtividade e rendimento de hidrólise da biomassa.

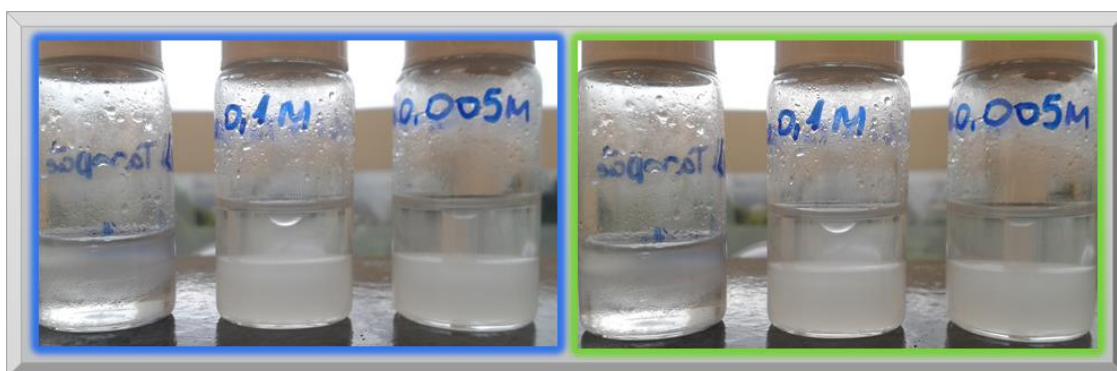
Neste item, os vários testes que avaliaram os itens descritos acima serão apresentados e discutidos.

#### 4.3.1 - Efeito da concentração de tampões e definição do tempo na separação de LI da fase aquosa

Foi observado que a concentração da solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico interferia diretamente na facilidade e velocidade com que a fase aquosa e LI se separavam. Sendo assim o experimento realizado para a determinação de qual seria a concentração ideal da solução tampão foi de extrema importância para o seguimento do trabalho experimental.

Foram analisadas três soluções: apenas a mistura de água e LI e duas concentrações de solução tampão: 0,1 M e 0,005 M. Após 2 h e 24 h de agitação a 50 °C as amostras foram deixadas em repouso por 5 min. Foi estabelecido como tempo de repouso os 5 min, pois tempos superiores não faziam com que os sistemas bifásico modificassem visualmente sua distribuição.

As fotografias dos sistemas após 2 h e 24 h compõem a Figura 5. Da direita para esquerda nas duas fotografias estão: água, tampão 0,1 M e 0,005 M. A fotografia com borda azul são os sistemas após 2 h de agitação e 5 min de repouso e a com borda verde são os sistemas após 24 h de agitação e 5 min de repouso.



**Figura 5** - À esquerda, com borda azul, são os sistemas após 2 h de agitação e 5 min de repouso. À direita, com borda verde, são os sistemas após 24 h de agitação e 5 min de repouso. Nos dois casos, as soluções da esquerda para a direita são: água + LI, tampão 0,1 M + LI e tampão 0,005 M + LI.

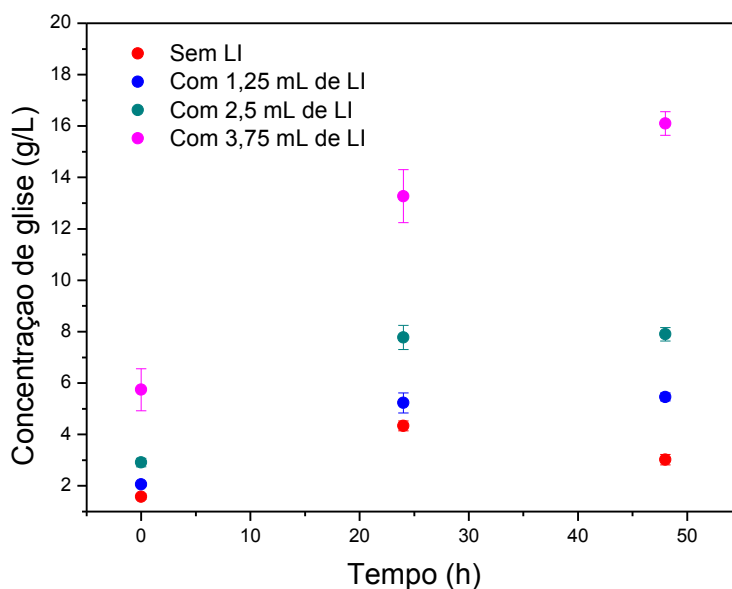
Nesse experimento o pH das soluções tampão foram aferidos algumas vezes após sua separação do LI (antes de iniciar o experimento, após 2 h e após 24 h de agitação). Foi observada uma variação de 0,5 unidade de pH, entretanto isso não afeta significativamente a estabilidade e atividade das celulasas utilizadas neste estudo. Esse

fato elimina a possibilidade de possível inativação das celulases por consequência de variação do pH do meio reacional.

#### 4.3.2 - Efeito da concentração de LI no rendimento da hidrólise enzimática

Por ser o líquido iônico um produto caro (R\$ 1064,00 100 g, valor fornecido no site da *Sigma Aldrich*), quanto menor for o volume utilizado em reações de hidrólise, menor será o custo do processo. Neste trabalho, foram realizadas reações em que a varável foi a quantidade de LI. Apesar de seu valor, o LI pode ser quase 100 % recuperado e reutilizado em novas reações se tornando um investimento vantajoso.

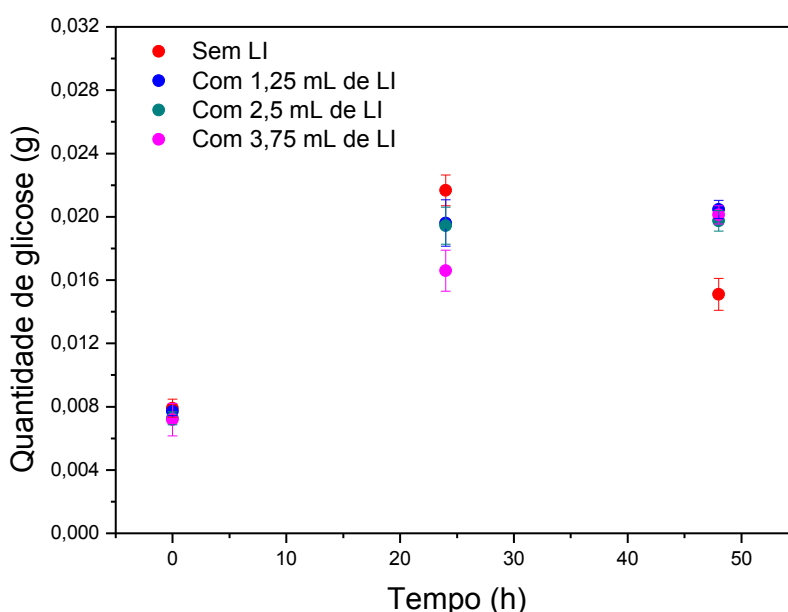
A Figura 6 contém o gráfico da concentração de glicose (g/L) x tempo (h) para as 4 reações montadas: sem LI que funcionou como um controle, com 1,25 mL de LI, com 2,5 mL de LI e 3,75 mL de LI. É possível observar que a reação que proporcionou a maior concentração de glicose em solução aquosa foi a com maior concentração de LI (3,75 mL de LI + 1,25 mL de tampão).



**Figura 6** – Gráfico da concentração de glicose (g/L) formada ao longo do tempo reacional (h) para as três reações com volumes diferentes de LI e para o “controle” (sem LI).

A princípio os resultados apresentados na Figura 6 foram animadores fornecendo concentrações tão elevadas quando se utilizava a menor quantidade de LI. Entretanto é

importante lembrar que os volumes de solução tampão também variaram (na proporção que fornecessem um volume final de reação sempre igual a 5 mL). Sabendo que toda a glicose formada fica na parte aquosa do sistema (de acordo com o item 4.2) a reação com a menor quantidade de solução tampão apresenta o maior valor de concentração de glicose (g/L). Sendo assim, um novo gráfico foi construído, dessa vez com a quantidade de glicose obtida no ensaio (g) x tempo (h), representado na Figura 7. Dessa forma os valores puderam ser comparados com o mesmo critério, fornecendo dados mais precisos.



**Figura 7** – Gráfico da quantidade de glicose (g) formada nas reações ao longo do tempo (h) para as três reações com volumes diferentes de LI e para o “controle” (sem LI).

Os valores de quantidade de glicose nas reações com e sem LI são sempre muito próximos, mesmo fornecendo valores de concentrações diferentes (Figura 6). Com a análise dos dados apresentados na Figura 7 é possível afirmar que a quantidade de LI pouco interfere no resultado final da hidrólise enzimática. Sendo assim, foi determinado como padrão a utilização de 2,5 mL de LI nas reações seguintes, pois quando se utilizava apenas 1,25 mL o LI não conseguia se misturar a biomassa de maneira homogênea.

Para o levantamento dos gráficos da Figura 7, a mesma quantidade de celulose e enzimas foi utilizada, sendo a única variável, a proporção entre LI e solução tampão. Observou-se que o rendimento foi aproximadamente igual em todos os sistemas. Entretanto, no sistema em que a quantidade de tampão foi menor, a concentração dos

açúcares foi maior, ou seja, a presença do LI não reduziu o desempenho das celulases, além disso permitiu que a concentração final de açúcar fosse aumentada.

#### *4.3.3 - Uso de LI antes e durante a hidrólise enzimática*

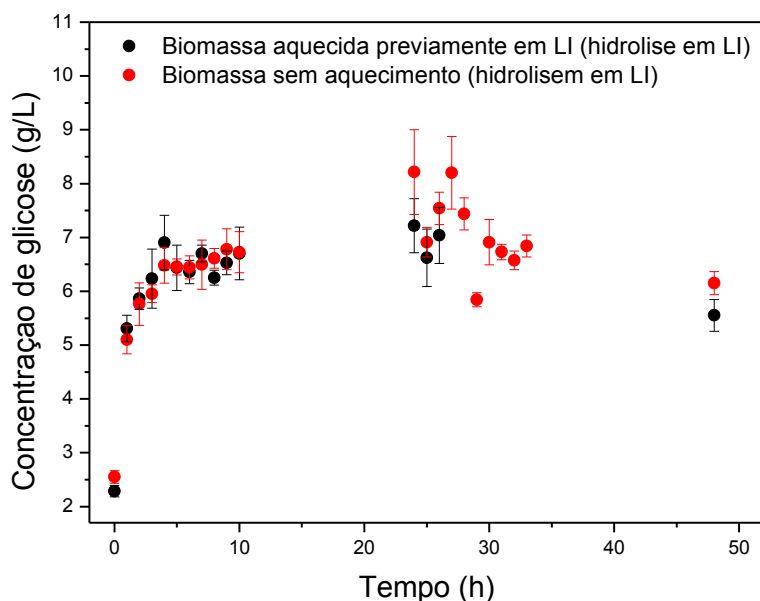
Como diversos LI apresentam a capacidade de enfraquecer as ligações entre lignina celulose e hemicelulose e ao mesmo tempo servir de suporte enzimático sem desnaturar as celulases, era esperado que houvesse um aumento no rendimento de hidrólise no sistema contendo LI quando comparado ao sistema sem LI. Entretanto isso não foi observado.

Uma das estratégias usadas para obter a desestruturação da biomassa com BMI.NTf<sub>2</sub> foi promover o aquecimento da biomassa com o LI, antes do processo de hidrólise.

Foram realizados dois experimentos em paralelo com o objetivo de observar se a biomassa aquecida previamente com o LI forneceria concentrações finais de glicose superiores a da biomassa sem aquecimento. A metodologia utilizada foi descrita no item 3.5.4 (terceiro experimento descrito).

A Figura 8 dispõe os dados da hidrólise enzimática da biomassa previamente aquecida com LI e da biomassa sem aquecimento. É possível observar que os valores de concentração de glicose no meio reacional são quase os mesmos, diferindo apenas no ponto “24 h” em que a biomassa sem aquecimento fornece uma concentração maior de glicose. Transcorridas as primeiras 24 h de reação, foi adicionado ao meio reacional mais solução enzimática (720 µL), com o objetivo de analisar se a produção de glicose já havia atingido o ápice ou se apenas havia ocorrido a inativação das celulases.





**Figura 8** – Gráfico comparativo da concentração de glicose gerada (g/L) x tempo (h) da reação de hidrólise da biomassa previamente aquecida em LI e da biomassa sem aquecimento.

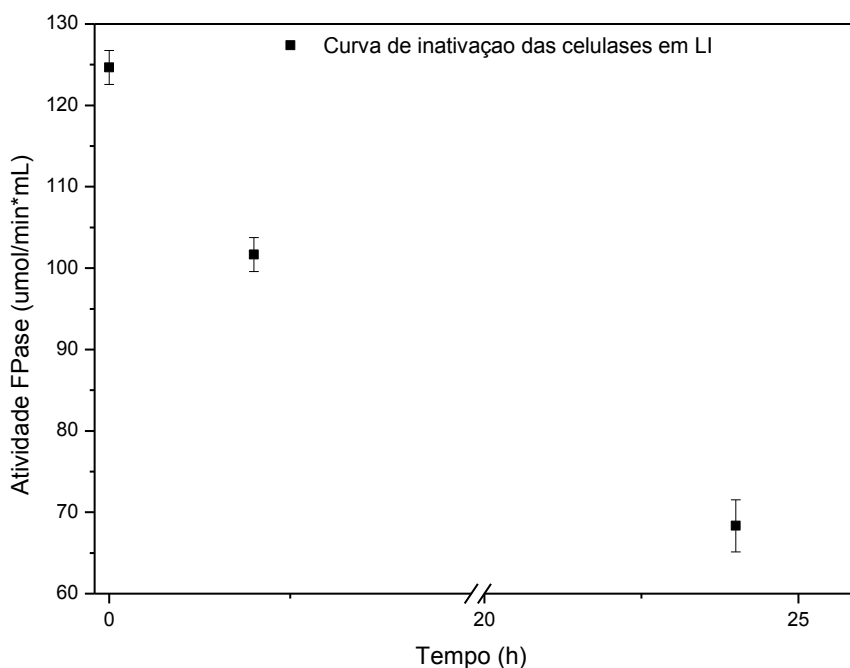
Com os dados fornecidos por esse experimento é possível concluir que o LI BMI.NTf<sub>2</sub> não é ideal para a metodologia de aquecimento. Ele não facilitou o acesso da enzima à celulose, ou seja, sua composição não é eficaz na desconstrução da biomassa (enfraquecimento das ligações entre lignina, celulose e hemicelulose). Esse fato pode ser explicado por o LI em questão ser composto por um cátion e um ânion volumosos, que não foram capazes de acessar os interstícios da biomassa por serem grandes.

Com a análise dos dados da Figura 8 é possível observar que a adição de mais solução enzimática a reação apenas perturbou o sistema, não elevando a concentração de glicose produzida nas primeiras 24 h de reação. Sendo assim, é possível afirmar que provavelmente a produção de glicose cessou pelo fato de a concentração de glicose no meio estar elevada, essa alta concentração inibe as enzimas  $\beta$ -glicosidases, que passa a converter a celobiose em glicose de maneira tão lenta que não é perceptível em curtos intervalos de tempo. A concentração de celobiose no meio reacional também se torna alta, o que inibe preferencialmente as enzimas exoglicanases, que funcionam em simbiose com as endoglicanases e por esse fato estas enzimas também são inibidas.

Apesar deste resultado, outros testes com este LI foram realizados, pois somente o fato de ser possível obter soluções dos açúcares em maior concentração ao final da hidrólise já torna este sistema extremamente interessante.

#### 4.4 - Estabilidade de celulases na presença de LI

Após determinar as condições reacionais a estabilidade das celulases no LI BMI.NTf<sub>2</sub> foi analisada. Nesse experimento foram coletadas alíquotas ao longo do tempo e determinada a atividade enzimática dessas alíquotas como descrito no item 3.2.1. A Figura 9 dispõe graficamente os valores das atividades encontradas.



**Figura 9** – Gráfico da atividade enzimática total – Fpase ( $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mL}$ ) x tempo (h).

É possível observar que a enzima sofreu inativação ao longo do tempo, entretanto a inativação não foi de forma drástica. Esse decaimento gradativo da atividade observado na Figura 9 pode ser atribuído a inativação gerada pela temperatura reacional ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Quase 50 % da atividade foi perdida em 24 h, mas isto também é observado quando soluções da enzima em tampão são incubadas mesmo sem LI. Por outro lado na presença de substratos estas enzimas se tornam muito mais estáveis.

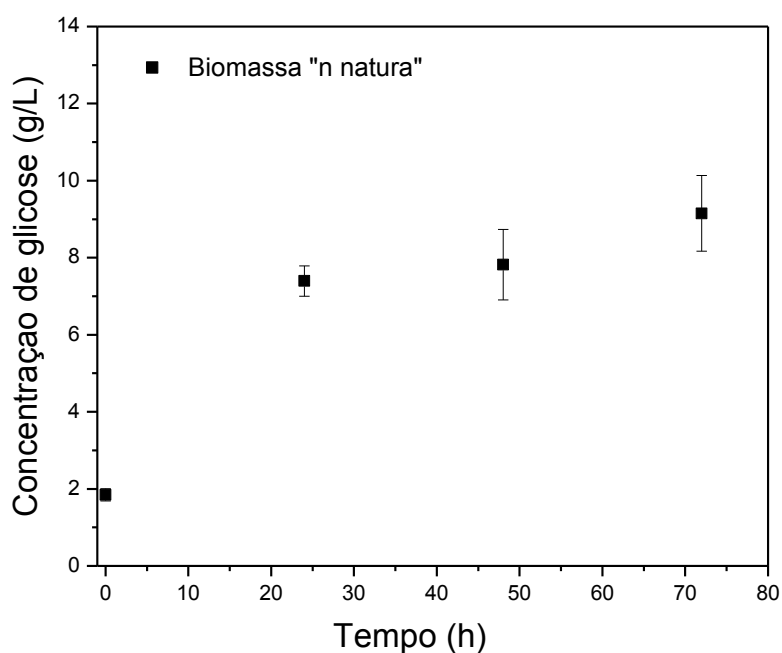
## 4.5 - Hidrólise enzimática de biomassa na presença de LI

Como os rendimentos de hidrólise da biomassa *in natura* na presença de LI foram relativamente baixos nos experimentos anteriores, a biomassa foi submetida a pré-tratamento químico antes da etapa de hidrólise enzimática em meios contendo LI. As hidrólises da biomassa sem pré-tratamento e pré-tratada foram analisadas e seus resultados comparados, com o objetivo de observar se a utilização do LI realmente oferecia alguma vantagem a metodologia.

Estabelecidas as condições experimentais ideais para a hidrólise, a parte final do trabalho foi iniciada.

### 4.5.1 - Hidrólise enzimática de biomassa sem pré-tratamento na presença de LI

A reação de hidrólise da biomassa sem pré-tratamento foi realizada para que fosse possível se comparar a eficácia das hidrólises da biomassa “*in natura*” e pré-tratada. A Figura 10 dispõem graficamente os valores da hidrólise da biomassa sem pré-tratamento.



**Figura 10** – Gráfico da concentração de glicose (g/L) x tempo (h) da biomassa sem pré-tratamento.

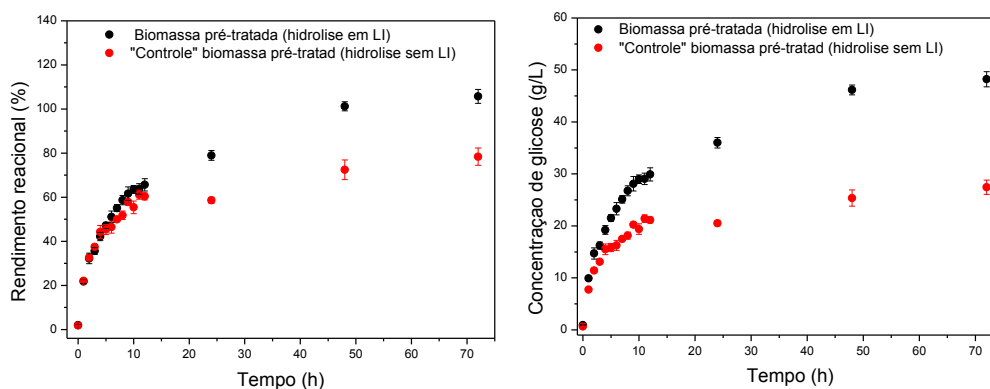
Mesmo não fornecendo valores elevados de concentração final de glicose o resultado da hidrólise da biomassa em LI sem pré-tratamento são excelentes quando comparados a hidrólise sem LI, que fornecem aproximadamente a metade da concentração de glicose.

Além dos problemas de inibição, a hidrólise de biomassa não-pré-tratada é extremamente dificultada pela recalcitrância deste material. Portanto, o fato de a celulose está blindada por hemicelulose e lignina, e além disso, apresentar-se na sua forma cristalina (forma organizada e difícil de ser hidrolisada) certamente contribuiu para que o rendimento de hidrólise fosse muito baixo.

Para melhorar o rendimento de hidrólise, um pré-tratamento químico foi realizado.

#### 4.5.2 - Hidrólise enzimática de biomassa pré-tratada

Como o LI BMI.NTf<sub>2</sub> não se mostrou eficiente em desconstruir a biomassa e facilitar o acesso da enzima à celulose a biomassa foi submetida a um pré-tratamento ácido seguido do pré-tratamento básico (descrito no item 3.3.2). A Figura 11 dispõe os dados experimentais coletados da hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada (com e sem LI) em forma de gráfico.

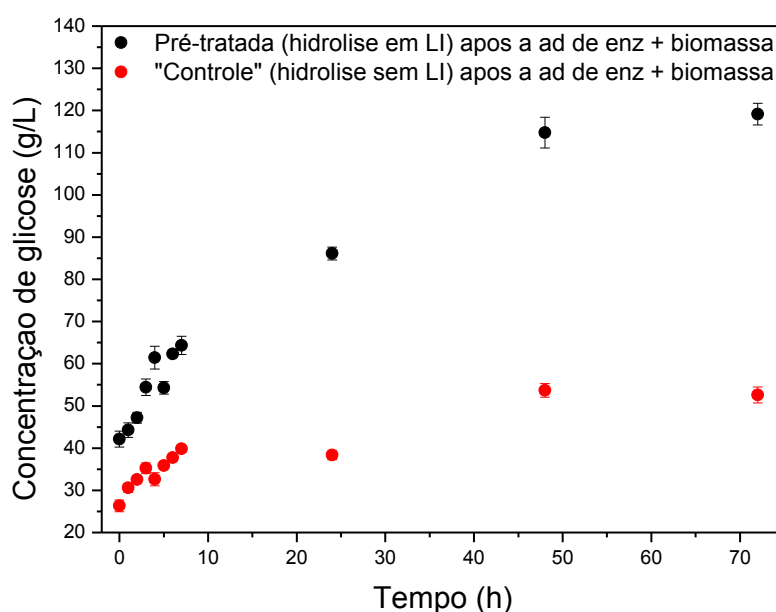


**Figura 11** – Gráfico do rendimento reacional a esquerda e a direita concentração de glicose (g/L) x tempo (h) da reação da biomassa pré-tratada e hidrolisada (com e sem LI).

Caso toda a celulose do meio reacional fosse convertida em glicose seria observada uma concentração de aproximadamente 45,6 g/L na reação com LI e aproximadamente 35 g/L na reação sem LI.

A produção de glicose na hidrólise com LI atinge seu ápice após 48 h de reação, alcançando uma concentração de glicose aproximada de 46 g/L, quase o dobro da reação feita sem LI. Esse resultado é extremamente satisfatório, uma vez que representa 6 vezes mais que a produção de glicose da biomassa sem pré-tratamento.

Após as primeiras 72 h de reação foram adicionadas mais solução enzimática em cada reação e mais biomassa, com o objetivo de analisar a capacidade máxima de produção de glicose pelo sistema. A Figura 12 dispõe os valores de concentração de glicose das reações após a adição de enzima e biomassa.



**Figura 12** – Gráfico da concentração de glicose (g/L) x tempo (h) da hidrólise da biomassa pré-tratada e hidrolisada (com e sem LI) após a dição de solução enzimática e mais biomassa (1,470 g).

A reação sem LI alcançou seu máximo em 48 h de reação, produzindo aproximadamente 50 g/L de glicose. Já a reação de hidrólise feita em LI alcançou seu máximo de produção de glicose em 72 h, produzindo aproximadamente 119 g/L de glicose, valor que processos utilizados em escala industrial alcançam.

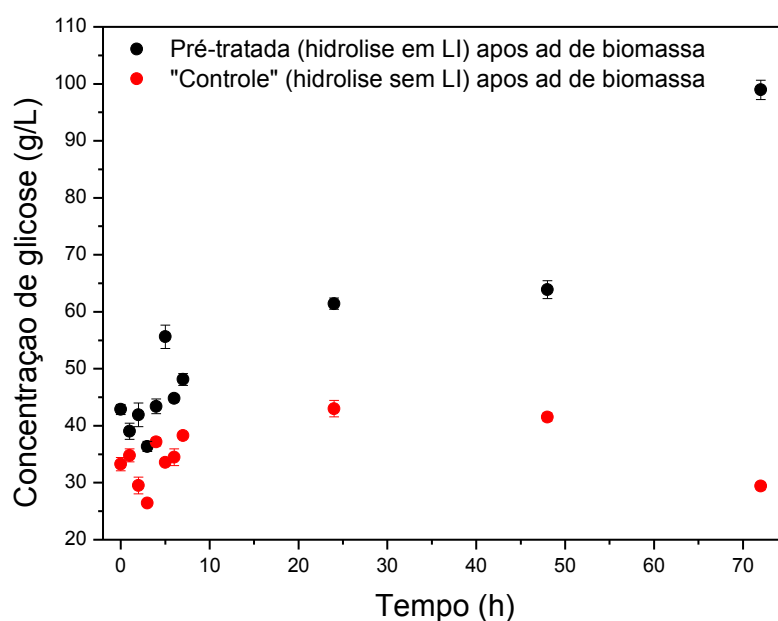
Caso toda a celulose fosse convertida em glicose na reação, seria observada uma concentração de glicose final igual a aproximadamente 84 g/L na reação com LI e aproximadamente 65 g/L na sem LI. Nesse caso o valor de concentração de celulose no ensaio encontrado foi superior ao valor esperado. Isso pode ter ocorrido pela concentração do sistema reacional por perda de água por evaporação, pois, por mais que o sistema fosse

fechado, foram no total 144 h de reação a 50 °C e o sistema foi aberto várias vezes para retirada de alíquotas.

Os resultados apresentados na Figura 13 comparados aos da Figura 12, indicam que o sistema contendo LI torna-se melhor ainda em altas cargas de sólido, pois na Figura 12 a concentração final de açúcar no sistema contendo LI era somente 67 % maior que o sistema sem LI, enquanto na Figura 13 esse valor é de aproximadamente 110 %.

#### 4.5.2 - Efeito da carga de sólido sobre o rendimento de hidrólise enzimática

Por fim, foi analisado o reciclo do sistema catalítico. Nesse experimento o sistema LI e enzima foi mantido e adicionado apenas biomassa. Essa análise também é uma continuação do experimento da Figura 11. A Figura 13 dispõe graficamente os dados coletados de concentração de glicose em relação ao tempo reacional do experimento de reciclo do sistema catalítico.



**Figura 13** – Gráfico da concentração de glicose (g/L) x tempo (h) da da biomassa pré-tratada e hidrolisada (com e sem LI) após a dição de apenas biomassa (1,470 g).

É possível observar que após a adição da biomassa há um pequeno desequilíbrio dos dois sistemas reacionais nas primeiras horas de reação.

As enzimas da reação sem LI não formaram mais glicose, a concentração se manteve constante e depois sofreu uma queda considerável. Esse acontecimento pode ser associado a inativação da enzima por adsorção à biomassa. Como foi adicionada mais biomassa ao sistema as enzimas ainda ativas no ensaio acabaram se prendendo a biomassa.

As enzimas da reação com LI continuaram formando glicose até 72 h de reação, onde a concentração alcançou aproximadamente 75 g/L de glicose. Caso toda a celulose do meio fosse convertida em glicose seria observada uma concentração de aproximadamente 91 g/L glicose na reação com LI e aproximadamente 70 g/L na sem LI. Ou seja, a reação alcançou aproximadamente 83% de rendimento, um resultado excelente. Esse fato é importantíssimo para o trabalho, pois prova que é possível se realizar o reciclo do meio catalítico reacional, mantendo as enzimas celulases ativas.

Sendo assim a aplicação dessa metodologia em escala industrial é extremamente atrativa do ponto de vista econômico, pois reduz o gasto com a parte mais dispendiosa da produção de glicose a partir de biomassa: a hidrólise enzimática.

## 5- Conclusão e Perspectivas

Com esse trabalho pode-se observar que a presença do LI foi extremamente benéfica para o rendimento global da reação.

O interesse da utilização de LI como suporte enzimático é uma tentativa de conseguir recuperar o meio catalítico e reciclá-lo, uma vez que se busca metodologias baratas e ambientalmente amigáveis. Sem dúvidas, a utilização dos LI em processos enzimáticos é extremamente promissora, apesar de ainda existirem muitos impedimentos tecnológicos associados às metodologias.

Sistemas com LI permitem atingir concentrações de açúcar exigidas em escala industrial (> 100 g/L) pois aparentemente minimiza efeitos de inibição. A estabilidade da enzima na presença do BMI.NTf<sub>2</sub> precisa ser melhorada, isso pode ser atingido por modificação química das enzimas. Estudos da aplicação de BMINTf<sub>2</sub> com pequenas quantidades de LI que são capazes de modificar a estrutura de lignocelulósicos será interessante para criar um sistema em que pré-tratamento e hidrólise sejam feitos simultaneamente.

Observa-se, também, a necessidade de se estudar mais profundamente as interações entre as enzimas e os LI, em especial para se entender mais claramente o que de fato contribui para estabilização enzimática e, conseqüentemente, se melhorar a abordagem do sistema catalítico no sentido do aumento da atividade catalítica. Analisando o comportamento de algumas enzimas em LI seria possível prever quais combinações cátion/ânion favorecem o aumento da atividade enzimática. Sendo assim é possível se propor a síntese de um novo LI que funcione de forma ótima com a enzima.

Por todos estes motivos, a combinação de LI e enzimas permite com que se possa vislumbrar um futuro energético mais limpo e com uma síntese de glicose e biocombustíveis sem todos os problemas comumente associados.

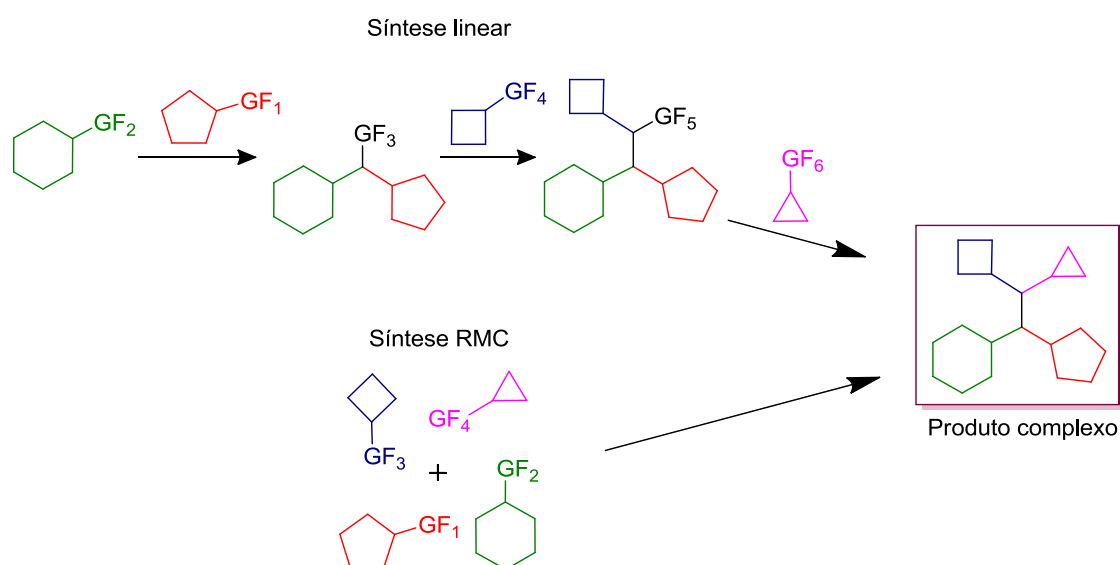


Capítulo 2: Estudo mecanístico da reação de Ugi quatro componentes utilizando-se líquidos iônicos de função específica como reagentes ionicamente marcados por ESI-MS(/MS)

## 1 – Introdução

Reações multicomponentes (RMC) são reações em que três ou mais componentes são agrupados simultaneamente para formação do produto, onde todos ou grande parte dos átomos dos materiais de partida envolvidos são utilizados, em uma única etapa reacional (*one pot*).<sup>81,82</sup> Usualmente, os subprodutos das RMC são moléculas de água. As RMC são utilizadas, principalmente, na obtenção de moléculas biologicamente ativas. As diversas combinações de reagentes gera uma grande variedade (bibliotecas) de produtos, com potencial aplicação como novos fármacos, estruturas biologicamente ativas e outros.<sup>83,84</sup>

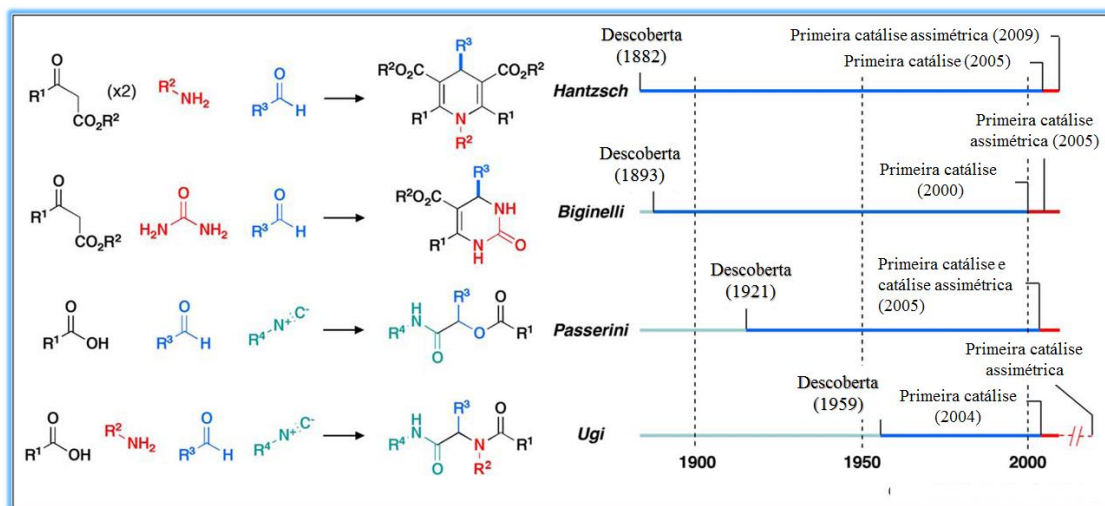
Esse tipo de reação tem atraído cada vez mais o interesse da comunidade científica por apresentar diversos facilitadores e características positivas: são eficientes, possibilitam a economia de átomos, a ordem de adição dos reagentes não influencia na formação do produto, são rápidas quando comparadas a reações lineares com diversas etapas, geram produtos com alto grau de pureza e são convergentes.<sup>81,85,86</sup> Como todos ou quase todos os átomos envolvidos na reação são convertidos no produto, não são gerados subprodutos indesejáveis ou resíduos, fazendo da metodologia ambientalmente amigável.<sup>87</sup> O Esquema 10 ilustra duas maneiras de se obter o mesmo produto, a primeira feita por uma reação linear com várias etapas e a segunda feita por meio de uma RMC em etapa única.



**Esquema 10** - Representação da síntese de uma molécula complexa por duas vias: síntese linear e síntese via reação multicomponente. “GF” representa grupo funcional. Adaptado das referências 88 e 89.

Dentre as RMC algumas se destacam pela possibilidade de formarem uma grande variedade de produtos com alta atividade biológica. Alguns adutos de RMC são

encontrados em estruturas básicas de fármacos.<sup>90</sup> O Esquema 11 dispõe a cronologia de descoberta e aprofundamento do conhecimento químico das RMC de Hantzsch, Biginelli, Passerini e Ugi.



**Esquema 11** – Cronologia da descoberta e estudos das RMC mais visadas. Adaptado da referência 84.

O esquema geral da reação de Hantzsch (Esquema 11) utiliza 2 equivalentes de  $\beta$ -cetoésteres, aminas primárias e aldeídos, formando dihidropiridinas. A reação de Biginelli se dá pela reação de aldeídos, (tio)ureas e  $\beta$ -cetoésteres, formando 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-onas. Nesses dois tipos de RMC as espécies carbonílicas são as responsáveis pela reatividade do sistema.

A reação de Passerini é caracterizada pela reação de isocianetos, aldeídos (ou cetonas) e ácidos carboxílicos formando  $\alpha$ -acil-carboxiamidas. A reação de quatro componentes de Ugi, por esse motivo (abreviada como U4RC), é caracterizada pela reação de isocianetos, aminas primárias, aldeídos (ou cetonas) e ácidos carboxílicos, formando  $\alpha$ -aciloamidoamidas, produtos com estrutura e características dipeptídicas.

As RMC podem ser divididas em dois grandes subgrupos, o primeiro, e mais importante, engloba as reações as quais o isocianeto é utilizado como reagente de partida, as reações de Ugi e Passerini compõem esse subgrupo. O segundo reúne todas as reações as quais o isocianeto não é empregado como reagente de partida, as reações de Biginelli e Hantzsch integram esse outro grupo.<sup>81</sup>

O que torna as reações de Ugi e Passerini tão interessantes é a presença do isocianeto, que possui um grupo funcional que tem caráter tanto nucleofílico quanto eletrofílico com características únicas; possui também um C  $\alpha$  ácido facilitando reações

de adição no mesmo e forma radicais com grande facilidade.<sup>91</sup> Sua reatividade e valência tem atraído o interesse dos pesquisadores e sido discutida por muitas décadas. A única classe de compostos orgânicos que possui um carbono divalente capaz de ser convertido em um carbono tetravalente é formada pelos isocianetos.<sup>83</sup>

Dentre as RMC a U4RC, em especial, atrai o interesse de diversos grupos de pesquisas não somente por sua versatilidade. Mas, também, por proporcionar a obtenção de produtos complexos com variadas aplicabilidades, tanto na área medicinal quanto na síntese orgânica. Outra vantagem da reação é o fácil acesso e baixo custo dos reagentes utilizados.<sup>88</sup>

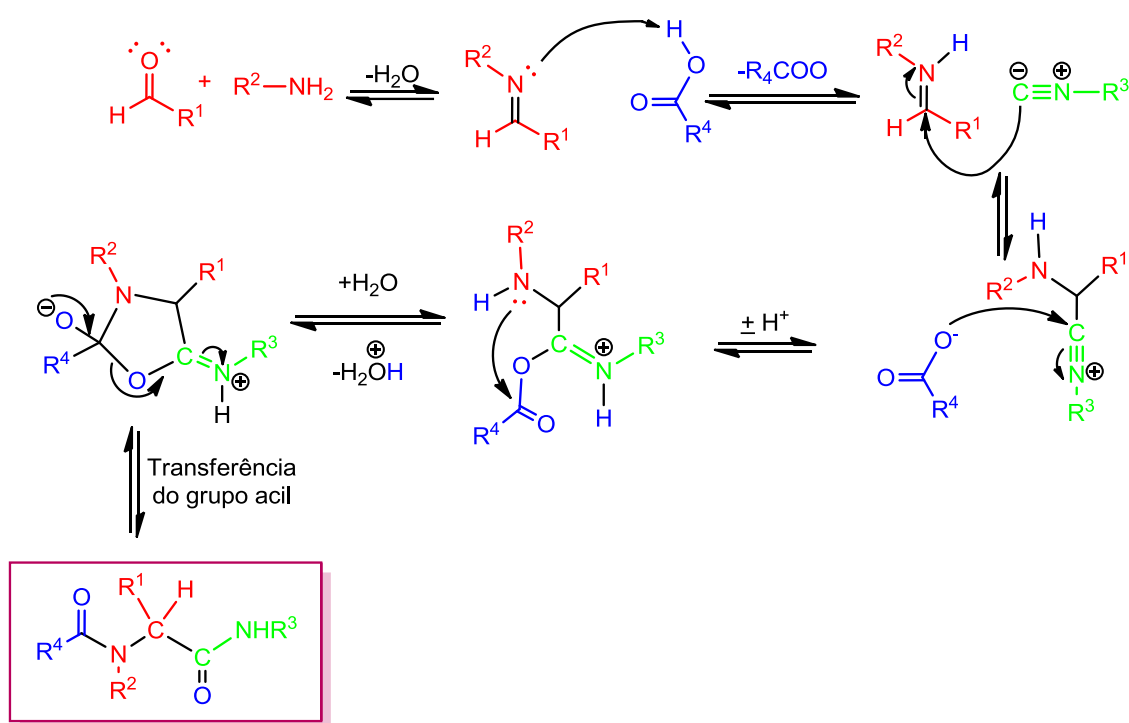
## 1.1 - Reação de UGI (U4CR)

A reação de U4CR foi descoberta em 1959, tendo a reação de Passerine como sua principal inspiração.<sup>92</sup> A U4CR é considerada a reação de condensação de 4 componentes mais importante já descoberta.

Desde a sua evidenciação a U4CR já foi aplicada na síntese de uma ampla gama de estruturas de produtos, sendo necessário para isso, apenas a substituição da amina e do ácido carboxílico (reagentes da reação mais baratos e de fácil acesso), possibilitando a síntese de muitos produtos naturais, a maioria deles apresentando atividade biológica.<sup>93</sup>

A utilização de reagentes quirais começou a ser empregada nesse tipo de reação com o objetivo de se formar moléculas com estereocentros pré-determinados.<sup>94,95</sup> Com isso foi observado que reações com precursores quirais são dependentes da temperatura.<sup>96</sup>

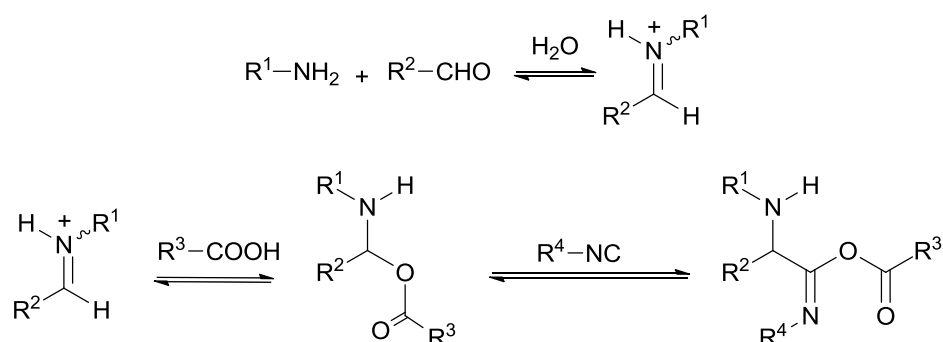
O mecanismo inicialmente proposto para a U4RC e aceito por muito tempo está ilustrado no Esquema 12.



**Esquema 12** – Primeira proposta mecanística para a U4CR.

A primeira etapa da reação o composto oxigenado (aldeído ou cetona) condensa com a amina, formando uma base de Schiff, que interage com o catalisador ou um componente ácido da reação capturando um próton, o que aumenta a eletrofilicidade da ligação C=N. O aumento da eletrofilicidade do íon imínio (e a ajuda de catalisadores) fazem com que o isocianeto seja adicionado a molécula, e em seguida ocorre uma acilação, onde o nitrogênio da ligação C≡N é convertido em uma amina. Depois de uma acilação intramolecular seguida de uma conversão do grupo hidroxilimina para uma amida (rearranjo de Mumm), o produto final é formado.

Apesar da proposta mecanística para U4CR apresentada no Esquema 12 ser bastante coerente, recentemente uma proposta alternativa que sugere um outro mecanismo fez as discussões acerca do tema ressurgirem.<sup>97</sup> Essa nova proposta mecanística (ilustrada no **Esquema 13**) sugere que, após a condensação da amina e o aldeído, há o ataque ao ácido carboxílico e não a reação com o isocianeto como ilustrado no Esquema 12.



**Esquema 13** – Proposta mecanística em que há primeiramente a inserção do ácido à base de Schiff.

O conhecimento da via mecanística reacional mais provável (**Esquema 12 ou 13**) é de extrema importância para a síntese orgânica, pois uma vez descoberta a via mecanística mais provável de ocorrer a U4CR é possível desenhar (idealizar) catalisadores com características de interesse, como por exemplo uma molécula que induza a estereosseletividade do produto formado.<sup>98</sup>

## 1.2 - Técnicas de detecção de intermediários reacionais e limitações

Existem muitas técnicas de caracterização de compostos, entretanto são poucas as que permitem a identificação de intermediários reacionais.

A espectrometria de massas constantemente acompanhando as inovações tecnológicas já possui equipamentos com metodologias que permitem a detecção de intermediários reacionais que são formados e consumidos em poucos segundos.

Entretanto, para que uma molécula possa ser identificada na espectrometria de massas, ela precisa ser carregada (positiva ou negativamente).

De modo que alguns dos intermediários formados na U4CR são neutros e, portanto, não identificáveis pela análise de massas, a utilização de líquidos iônicos de função específica (TSLI) como “marcadores de carga” surge como uma possibilidade solucionar esse problema.

## 2 - Objetivos

### 2.1 - Objetivos Gerais

Compreender o mecanismo da reação U4CR para se facilitar e direcionar a síntese (design) de catalisadores que promovam esse tipo de reação de maneira eficiente bem como que proporcionem o aumento do rendimento global da reação.

### 2.2 - Objetivos Específicos

- Utilizar TSILs como reagentes ionicamente marcados para identificação de possíveis intermediários da U4CR por ESI-MS(/MS).
- Propor uma via mecanística para reação de U4CR com base nos intermediários detectados.

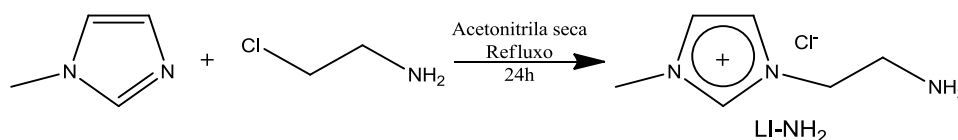
### 3 - Parte Experimental

Para o desenvolvimento do trabalho proposto dois LI com função específica como reagentes ionicamente marcados foram sintetizados. Esses LI foram utilizados como reagentes de partida da U4CR e, em seguida, os produtos reacionais foram analisados por ESI-MS(/MS). Para finalizar o estudo proposto foi realizado um cálculo teórico com o objetivo de estabelecer a estrutura (isômero) final mais estável. Todas as metodologias experimentais seguidas no trabalho estão descritas a seguir.

#### 3.1 - Síntese dos Líquidos Iônicos utilizados como marcadores de carga

##### → Cloreto de 1-(3-aminoetil)-3-metilimidazolio (LI-NH<sub>2</sub>):

Para síntese do LI-NH<sub>2</sub> adicionou-se em um balão o 1-metilimidazol (1,0 mmol), o hidrocloreto de 3-cloroetilamina (1,0 mmol) e 15 mL de acetonitrila seca, como ilustra o Esquema 14. A mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecida a 80 °C durante 24 h. Foi obtida uma mistura turva ao fim do tempo reacional. A mistura formada foi recristalizada em etanol e acetato de etila. Por fim obteve-se o produto (sólido branco) que foi seco com auxílio de uma bomba de vácuo. A metodologia de síntese seguida foi adaptada de artigos da literatura.<sup>99,100</sup> O LI-NH<sub>2</sub> foi caracterizado por ESI (+)-MS/MS, como é descrito posteriormente.



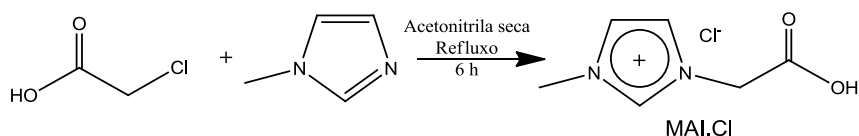
**Esquema 14** – Síntese do líquido iônico cloreto de 1-(3-aminoetil)-3-metilimidazolio.

##### → Cloreto de 1-metil-3-carboximetilimidazolio (MAI.Cl):

Para síntese do MAI.Cl adicionou-se em um Schlenk selado o ácido cloroacético (1,0 mmol), 1-metilimidazol (1,1 mmol) e 2 mL de acetonitrila seca, a mistura foi aquecida a 100 °C e agitada com auxílio de uma barrinha magnética por 6 h, como ilustra o Esquema



15. Transcorrido o tempo reacional e após resfriamento, a mistura foi filtrada e sólido formado foi lavado várias vezes com acetato de etila para retirar toda impureza do produto. Em seguida o produto (sólido branco) formado foi seco com auxílio de uma bomba de vácuo.<sup>101</sup> O MAI.Cl foi caracterizado por ESI (+)-MS/MS, como é descrito posteriormente.



**Esquema 15** – Síntese do líquido iônico cloreto de 1-metil-3-carboximetilimidazolio (MAI.Cl).

### 3.2 - Síntese das reações de quatro componentes de Ugi

Foram preparadas 3 reações para posterior análise.

Na primeira síntese foram utilizados reagentes neutros (sem marcadores de carga). Em um balão foram adicionados: metanol, benzilamina, formaldeído, *t*-butil-isocianeto e BOC-glicina. A mistura foi agitada por 18 h a temperatura ambiente, seguida de aquecimento por 2 min. Em seguida foi preparada uma solução de 100  $\mu$ M que foi injetada no equipamento de massas.

Na segunda síntese foi utilizado o MAI.Cl no lugar da BOC-glicina. Em um balão foram adicionados: metanol, benzilamina, formaldeído, *t*-butil-isocianato e o MAI.Cl. A metodologia reacional foi a mesma descrita anteriormente.

Na terceira síntese o LI-NH<sub>2</sub> foi utilizado no lugar da benzilamina. Em um balão foram adicionados: metanol, formaldeído, *t*-butil-isocianeto, BOC-glicina e o LI-NH<sub>2</sub>. A metodologia reacional foi a mesma descrita anteriormente.

### 3.3 - Metodologia do experimento de detecção

A reação de 4 componentes de Ugi foi estudada a partir de seu monitoramento através do equipamento Synapt HDMS (High Definition Mass Spectrometry; Waters Corp., Manchester, UK). Ele é equipado com uma fonte de Ionização por Elétron Spray (ESI) e

um quadrupolo híbrido/mobilidade de íons/geometria ortogonal de aceleração de tempo de voo (ao-TOF).

As amostras reacionais (100  $\mu\text{M}$ ) foram submetidas a ESI nas seguintes condições: tensão capilar de 3,0 kV, cone da amostra de 30 V, cone de extração de 3 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura do gás de secagem foi de 100 °C e taxa do fluxo de  $\text{N}_2$  de 300  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Os experimentos de MS de armadilha e de transferência de células foram realizados com tensão de 6 e 4 V, respectivamente. Nos experimentos de MS/MS, os íons de interesse foram selecionados no analisador de quadrupolo, fragmentados na célula de transferência usando argônio como gás de colisão (a transferência de energia foi otimizada para cada íon de interesse) e, em seguida os íons formados foram analisados por TOF.

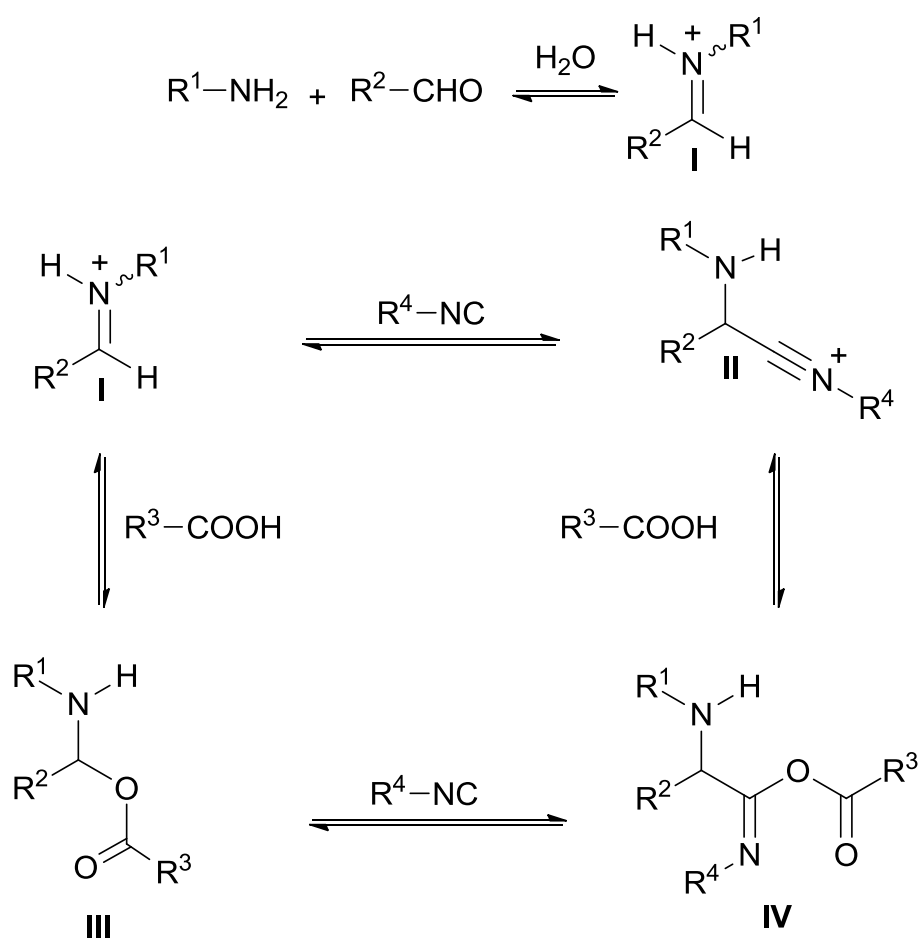
Os experimentos de *Traveling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry* (TWIM-MS – a mobilidade iônica em fase gasosa) foram realizados com o objetivo de se identificar possíveis intermediários isoméricos na reação. Para que fosse possível se realizar a separação pela mobilidade iônica, a célula de TWIM foi operada com um fluxo de  $\text{N}_2$  ou  $\text{CO}_2$  gasosos variável de 10-62  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os parâmetros para velocidade e altura de onda foram determinados como 200-250  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  e 30 V, respectivamente.

### 3.4 - Cálculos teóricos

Todos os cálculos realizados neste trabalho para determinação de estrutura eletrônica e parâmetros geométricos foram realizados utilizando a *Kohn-Sham Density Functional Theory* (DFT)<sup>102,103</sup> usando o funcional de correlação e troca M06-2X<sup>104</sup> combinado com a função de base 6-31+G(d,p) para otimização de geometria seguido de cálculos *single point* usando a função de base Pople *Split-valence* 6-311+G(2d,2p). Os estados de transição foram otimizados utilizando o algoritmo Berny.<sup>105</sup> Todas as estruturas foram otimizadas para assegurar a ausência de frequências imaginárias em mínimos locais, garantir a presença de uma única frequência imaginária para estados de transição e calcular a energia do ponto vibracional zero (ZPVE). A ZPVE foi calculada a 298,15 K e 1 atm. O metanol foi escolhido como meio reacional para as estruturas calculadas (tratamento explícito). Todos os cálculos teóricos foram realizados com o auxílio do programa Gaussian 09.<sup>106</sup>

## 4- Resultados e Discussão

Atualmente existem duas principais propostas mecanísticas para as reações de U4CR aceitas pela comunidade científica. O Esquema 16 ilustra essas duas possibilidades, partindo do intermediário chave **I**. A proposta via formação do intermediário **II** foi aceita por bastante tempo, entretanto, recentemente, uma proposta alternativa de mecanismo, via formação do intermediário **III**, fez com que ressurgisse um debate em torno desse assunto.

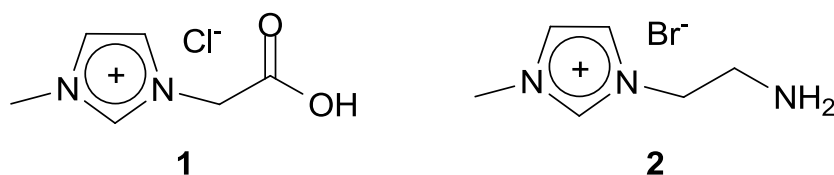


**Esquema 16** – Dois possíveis mecanismos da reação de U4CR antes do rearranjo de Mumm que leva ao aduto de Ugi.

A utilização da metodologia de detecção de intermediários carregados via ESI-MS seria uma boa alternativa para se analisar a formação dos intermediários da reação, entretanto apenas o intermediário catiônico **II** seria detectado uma vez que **III** é neutro. Haveria a possibilidade de se bombardear o a solução com  $H^+$  formando  $[III + H]^+$  (que

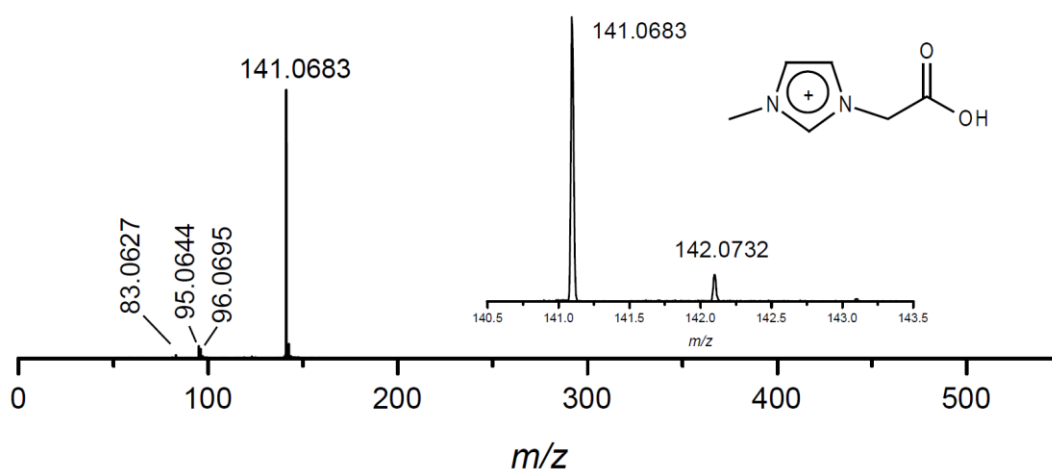
seria detectável), contudo a supressão do sinal (pico) gerada pelos intermediários catiônicos **I** e **II** dificultaria a detecção do intermediário **III** + H<sup>+</sup>. Outra problemática associada a técnica de bombardeio de H<sup>+</sup> a ser considerada é a interferência na reatividade de alguns reagentes envolvidos na reação.

Uma excelente alternativa para detecção dos intermediários é a utilização de marcadores de carga. Nesse caso optou-se pela utilização de dois LI com grupos funcionais tais quais os presentes nos reagentes de partida da reação de Ugi, um ácido carboxílico e uma amina. Pode-se observar na Figura 14 os dois LI utilizados na reação: MAI.Cl (1) e LI-NH<sub>2</sub> (2). Derivados do anel imidazólio foram escolhidos principalmente pela sua sensibilidade de detecção na técnica de ESI(+)-MS.



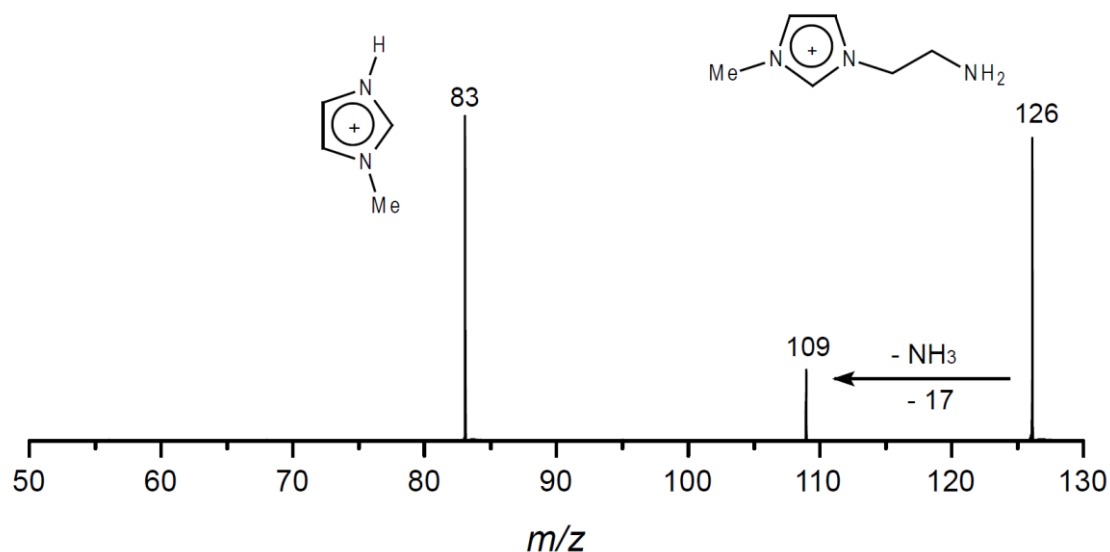
**Figura 14** - Líquidos iônicos utilizados na reação: cloreto de 1-metil-3-carboximetilimidazolio (MAI.Cl) (1) e brometo de 3-(2-aminoetil)-1-metilimidazolio (LI-NH<sub>2</sub>) (2).

Salienta-se que as tentativas de monitoramento da reação sem marcadores de carga não permitiu a detecção de nenhum intermediário chave para a reação de U4CR. Após a obtenção os LI com função específica como reagentes ionicamente marcados foram caracterizados por ESI(+)-MS/MS (Figura 15 e Figura 16).



**Figura 15** - ESI(+)-MS/MS da solução metanólica do marcador de carga MAI.Cl. O pico de *m/z* 141 é referente ao cátion MAI.

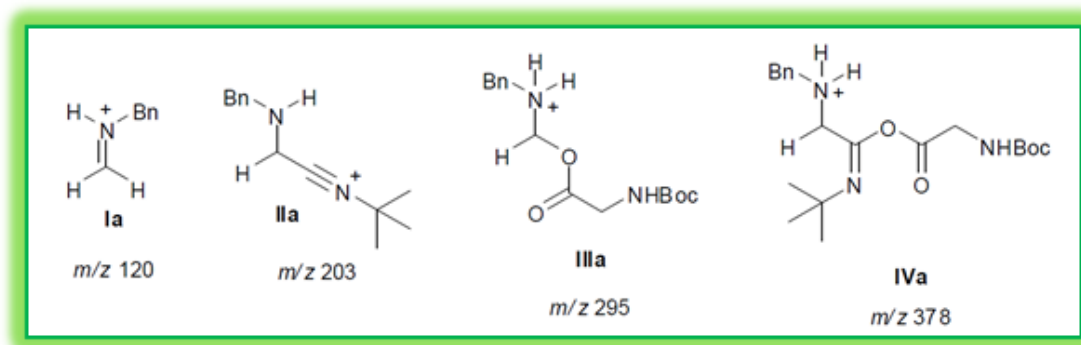
É possível observar no espectro de massas da Figura 15 um pico com razão massa carga de 141 referente ao cátion MAI. Ao aumentar a imagem é possível observar logo ao lado do pico base um pico (M+1) com razão massa carga de 142 que é referente a molécula com o isótopo menos abundante do carbono ( $^{13}\text{C}$ ). Algumas fragmentações da molécula também são observadas na análise. O sinal de  $m/z$  96 representa a perda de  $\text{CO}_2\text{H}$ . O sinal de  $m/z$  95 representa a perda de um ácido metanoico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ). E, por fim, o sinal de  $m/z$  83 representa a perda de  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 16** - ESI(+)-MS/MS da solução metanólica da amina marcada. O sinal de  $m/z$  126 é referente ao cátion da amina marcada.

É possível observar, na **Figura 16**, um sinal com  $m/z$  126 referente ao cátion do LI-NH<sub>2</sub>. Também são observados dois sinais referentes a fragmentação do LI-NH<sub>2</sub>, o sinal com  $m/z$  109 representa a perda de uma amônia ( $\text{NH}_3$ ) e o sinal com  $m/z$  83 representa a perda de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ .

Primeiramente uma reação de U4CR sem nenhuma molécula ionicamente marcada foi preparada (como descrito no item 3.2) e monitorada por ESI-MS(/MS) (como descrito no item 3.3). A Figura 17 mostra todos os possíveis intermediários que podem ser formados na reação quando se utiliza apenas moléculas neutras.

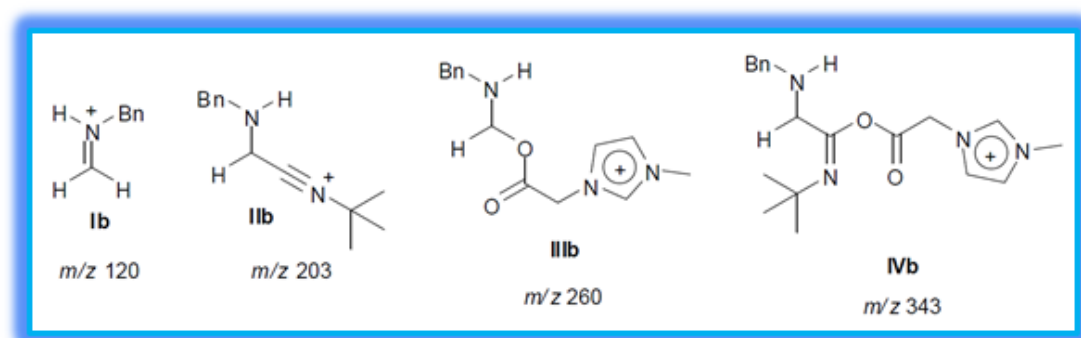


**Figura 17** - Possíveis intermediários da reação U4CR utilizando reagentes "neutro".

Na análise do espectro de massas dessa reação foi possível observar apenas o intermediário catiônico **Ia** ( $m/z$  120), nenhum outro intermediário reacional pode ser detectado. A formação desse íon característico da U4CR é a etapa determinante da velocidade da reação.

As condições reacionais que possibilitaram a detecção de **Ia** também poderiam ter favorecido a detecção de **IIa** (caso tivesse sido formado), entretanto o intermediário **IIIa** é neutro e pode ter sido formado mesmo não sendo detectado pela metodologia. Sendo assim, a utilização de reagentes ionicamente marcados foi uma alternativa proposta para se contornar esse inconveniente.

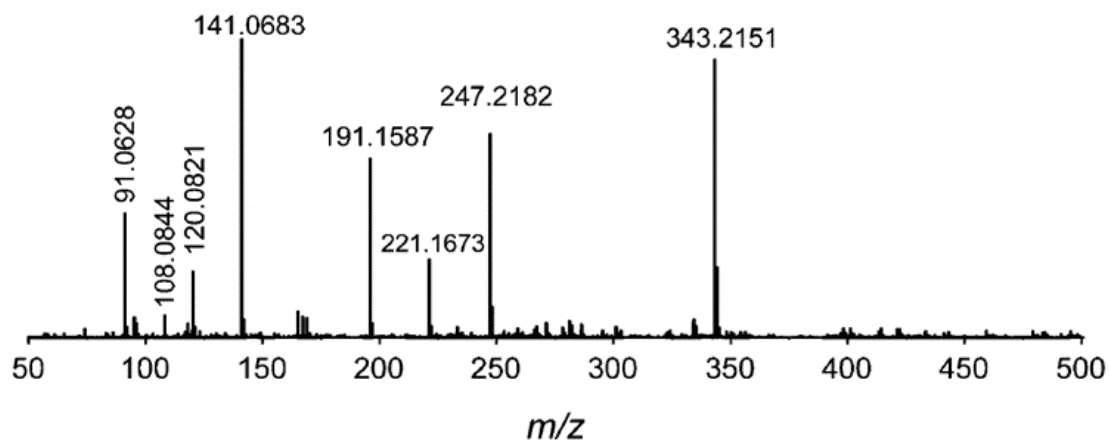
A Figura 18 mostra os possíveis intermediários (mais importantes) da reação quando o MAI.Cl é utilizado como ácido carboxílico, reagente de partida necessário para reação de U4CR.



**Figura 18** - Possíveis intermediários da reação U4CR utilizando o MAI.Cl como o ácido carboxílico da reação.

O espectro de massas obtido a partir da análise da reação com o MAI.Cl (Figura 19) foi analisado e alguns sinais de  $m/z$  característicos da reação U4CR foram

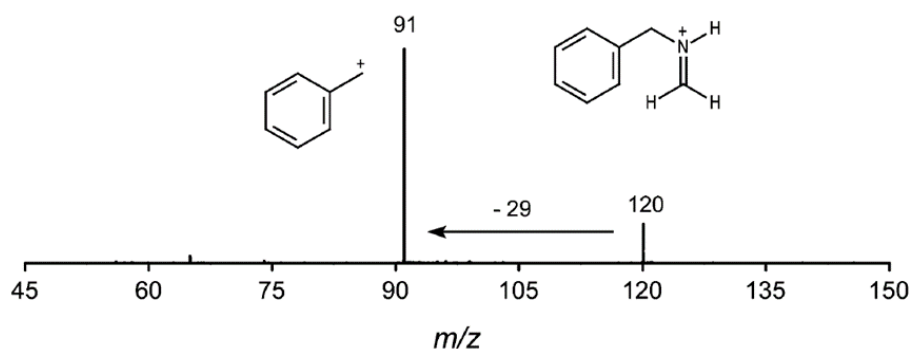
identificados. O cátions de  $m/z$  108 é referente a benzilamina protonada, chegou-se a essa conclusão porque não foi observado um sinal referente ao isocianeto protonado ( $m/z$  84).



**Figura 19** – ESI(+)-MS de alta resolução da reação U4CR utilizando o MAI.Cl como o ácido carboxílico da reação ( $m/z$  141).

A detecção do cátion **Ib** ( $m/z$  120, Figura 19) só foi possível após 18 h de reação a 20 °C, como consequência disso, todos os outros intermediários também só foram formados e detectados após esse tempo reacional, uma vez que a formação de **Ib** é a etapa determinante da reação. O acompanhamento temporal da reação foi realizado para precisar o tempo em que os primeiros íons seriam detectados.

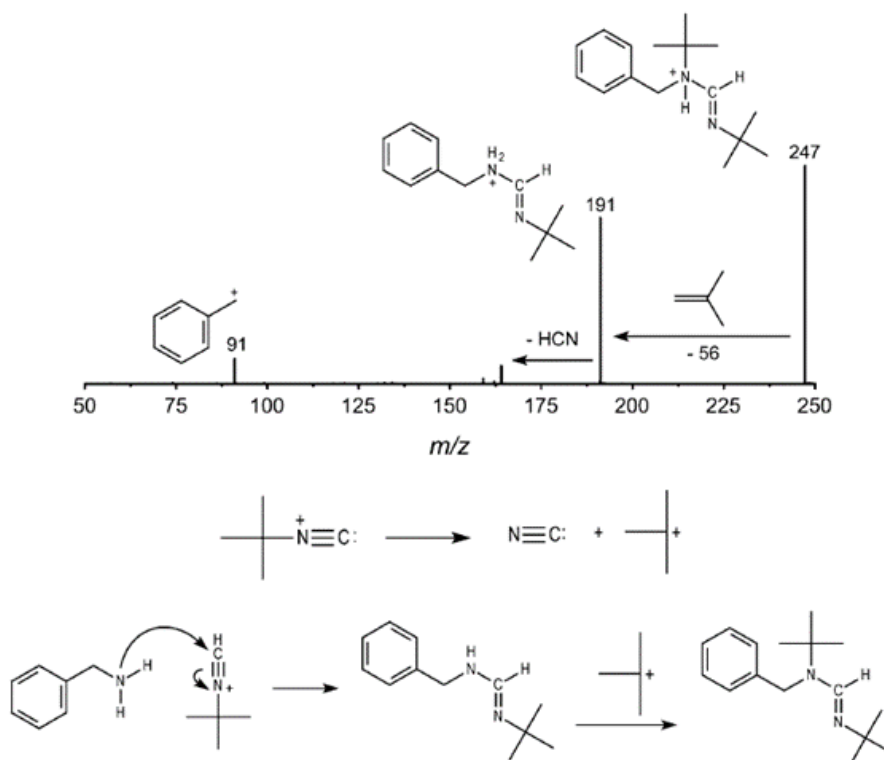
A análise de ESI(+)-MS/MS do intermediário **Ib** foi realizada. A **Figura 20** ilustra o espectro obtido. Esse tipo de análise é realizada para se confirmar a composição do intermediário em questão.



**Figura 20** – Espectro de ESI(+)-MS/MS do intermediário catiônico **Ib** ( $m/z$  120).

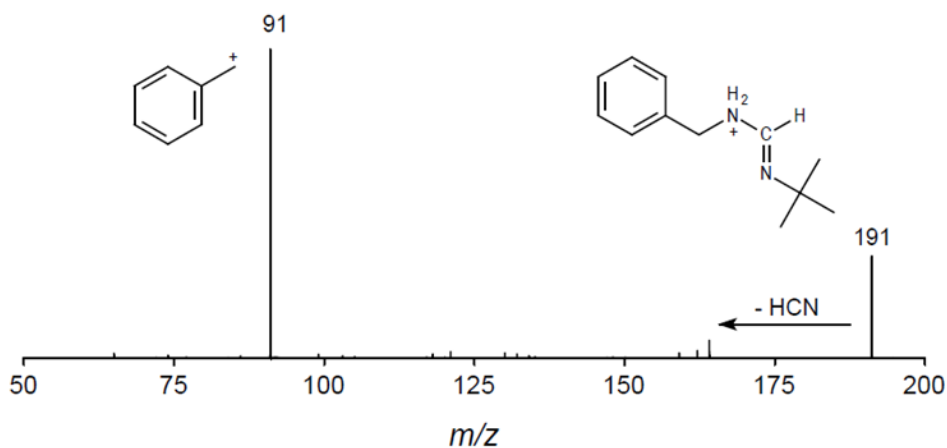
No espectro de ESI(+)-MS apresentado na **Figura 19** são observados sinais referentes a formação de subprodutos da reação, são eles:  $m/z$  247,  $m/z$  221 e  $m/z$  191.

Para compreender como se deu a formação desses intermediários, eles foram submetidos a outra análise de massas em sequência (*tandem* – MS/MS ou MS<sup>2</sup>). O **Esquema 17** contém o espectro de ESI(+)-MS/MS do subproduto de  $m/z$  247 e uma proposta mecanística para sua formação no meio reacional.



**Esquema 17** - ESI(+)-MS/MS do sinal de  $m/z$  247 (um subproduto da reação).

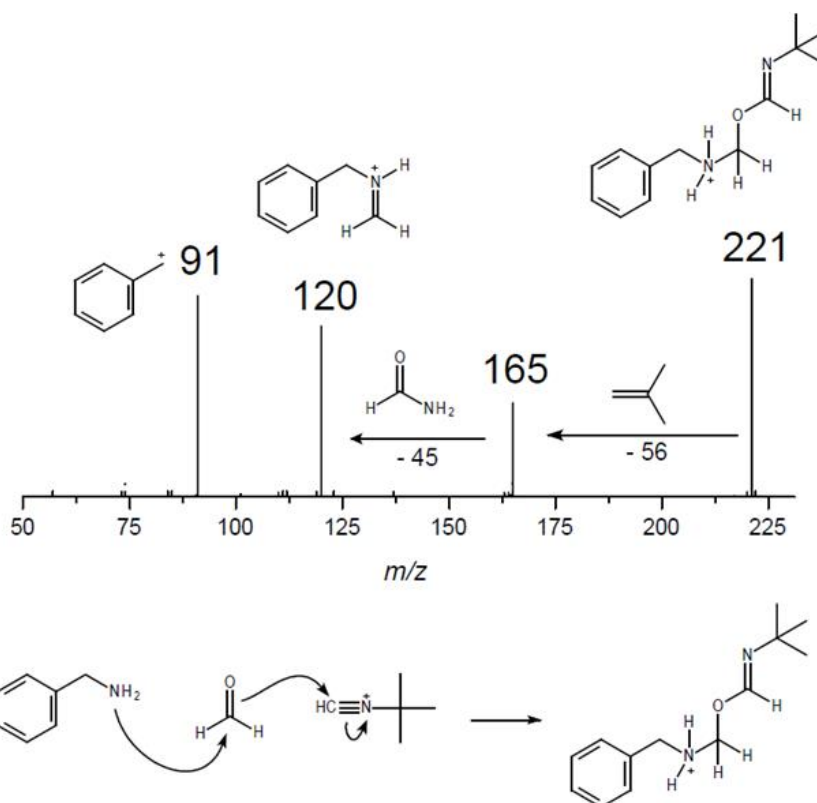
O subproduto de  $m/z$  191, então, representa uma fragmentação do subproduto de  $m/z$  247. A Figura 21 mostra o espectro da fragmentação do cátion de  $m/z$  191.



**Figura 21** - ESI(+)-MS/MS do sinal de  $m/z$  191 (um fragmento da molécula de  $m/z$  247).



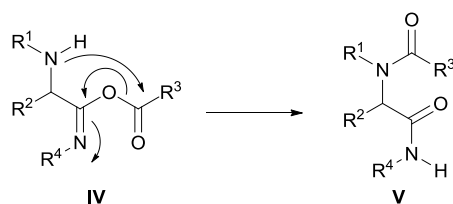
O **Esquema 18** apresenta o espectro de fragmentação do subproduto catiônico reacional de  $m/z$  221 e uma proposta mecanística para formação desse subproduto. Para sua formação o par de elétrons do nitrogênio da benzilamina ataca o carbono do formaldeído, disponibilizando um par de elétrons para o oxigênio, que, por sua vez, ataca o carbono da ligação C-N do isocianeto disponibilizando um par de elétrons para o nitrogênio (anteriormente carregado positivamente).



**Esquema 18** - ESI(+)-MS/MS do subproduto do intermediário catiônico de  $m/z$  221 e, na parte inferior, uma proposta mecanística para sua formação.

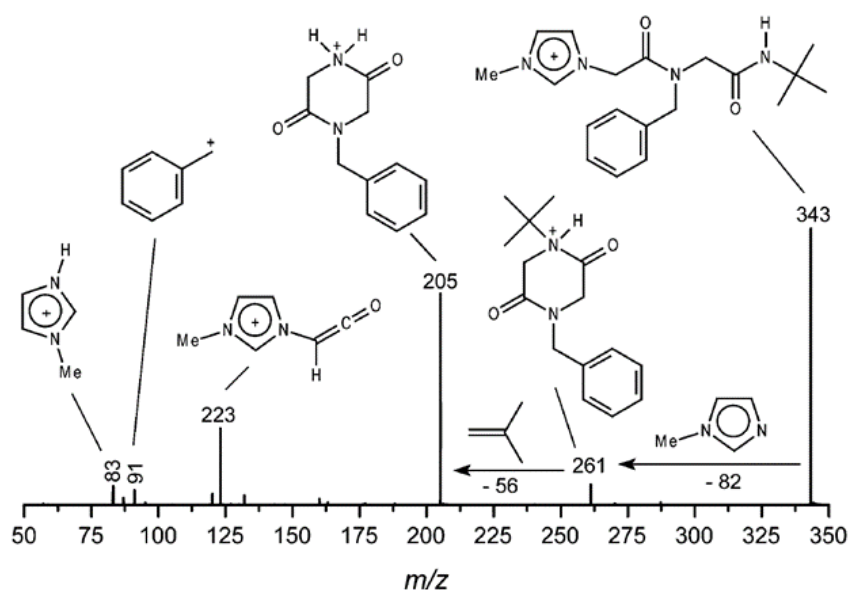
O sinal de maior massa carga observado na Figura 19 ( $m/z$  343) foi atribuído ao cátion **IVb**, que só foi detectado por ser utilizada uma molécula ionicamente marcada como reagente de partida, caso contrário a estrutura seria neutra e não detectável pelo experimento de massas.

Um importante fato a ser destacado é a possibilidade da molécula **IV** se rearranjar (rearranjo de Mumm) formando a molécula **V**, como ilustrado no **Esquema 19**.



**Esquema 19** – Ilustração do mecanismo de conversão da molécula **IV** para **V** via rearranjo de Mumm.

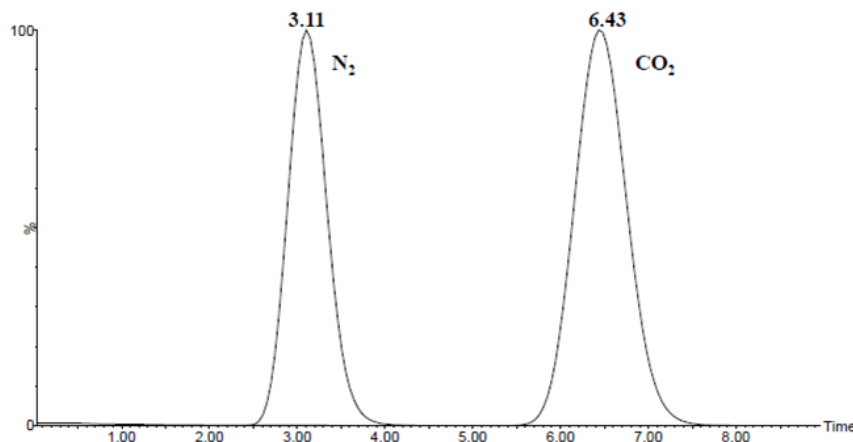
Analisando o espectro da fragmentação do íon de  $m/z$  343 (Figura 22) é possível afirmar que o padrão de fragmentação é mais coerente com a estrutura **Vb** do que com a **IVb**.



**Figura 22** - ESI(+)-MS/MS do íon de  $m/z$  343, que evidencia que a fragmentação é coerente apenas com o produto formado após o rearranjo de Mumm.

Com o objetivo de analisar se o sinal de  $m/z$  343 era constituído por dois isômeros (**IVb** e **Vb**) ou apenas por um deles foi realizado o experimento de mobilidade iônica (TWIM-MS). Foram realizadas diversas análises variando os parâmetros da metodologia. As análises foram realizadas em dois gases diferentes ( $N_2$  e  $CO_2$ ), pois o comportamento dos isômeros poderiam ser diferentes em cada um deles, uma vez que a polaridade, a mobilidade molecular e a sessão de choque variam de acordo com o tamanho da molécula do gás utilizado. Entretanto apenas um sinal foi observado nas análises, tanto em  $N_2$  quanto em  $CO_2$  (Figura 23). O que é uma forte evidencia de que o rearranjo de Mumm acontece de maneira muito rápida, não sendo possível detectar o isômero antes do rearranjo acontecer. Como o padrão de fragmentação apresentado na Figura 22 é mais

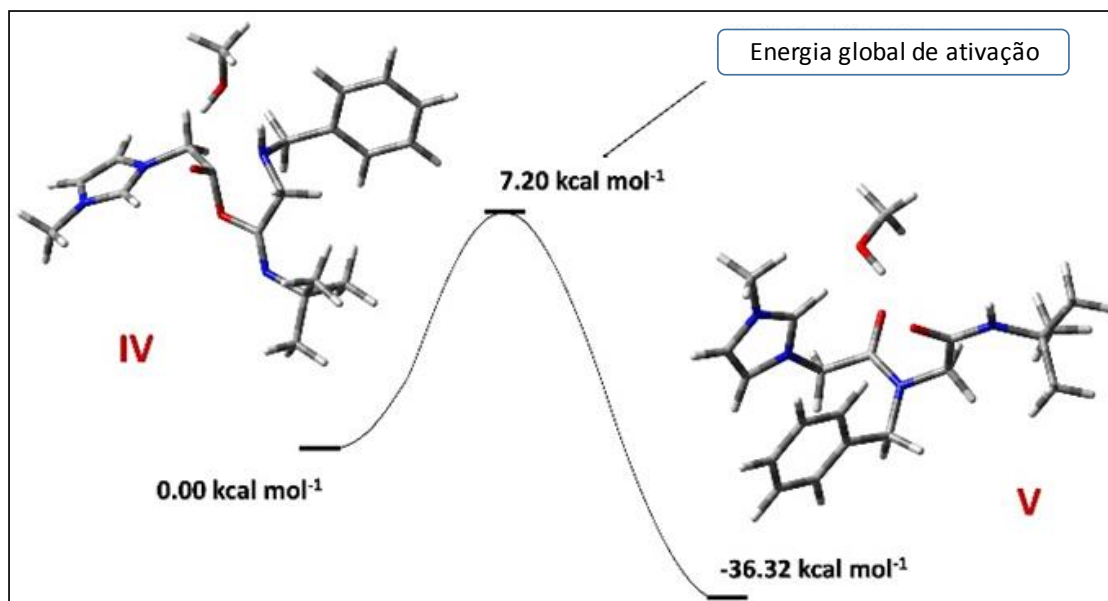
coerente para o íon **Vb**, acredita-se que o isômero observado no experimento de TWIM-MS também é o **Vb**.



**Figura 23** – Tempo de vôo do íon de  $m/z$  343 na *drift cell*. Para o nitrogênio ( $N_2$ ) o fluxo de gás foi igual a  $45 \text{ mL min}^{-1}$  (2,19 mbar), a velocidade da onda foi de  $250 \text{ ms}^{-1}$  e a altura de onda foi de 30 V. Para  $CO_2$  o fluxo de gás foi igual a  $50 \text{ mL min}^{-1}$  (1,54 mbar), a velocidade da onda foi de  $200 \text{ ms}^{-1}$  e altura de onda foi igual a 30 V.

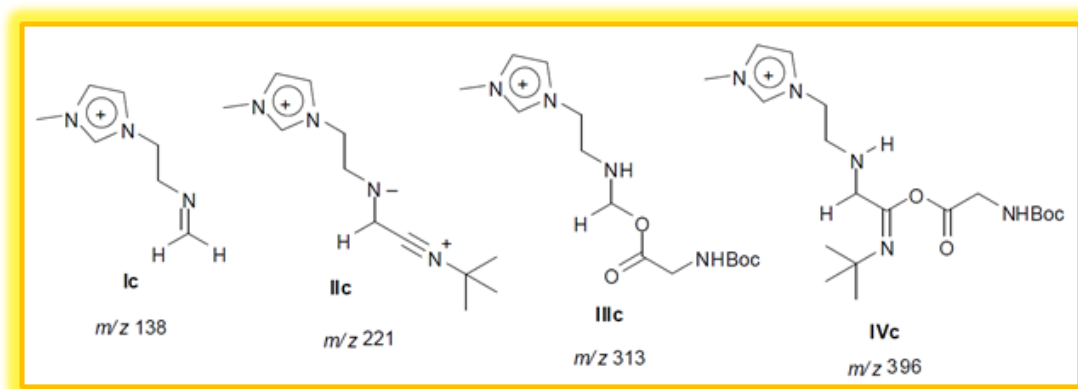
Visando melhor compreender o perfil energético do rearranjo de Mumm (**IVb** → **Vb**), foi realizado o cálculo DFT das energias relativas inerentes a cada conformação isomérica. As geometrias dos isômeros foram otimizadas levando em consideração o solvente utilizado na reação (metanol). De acordo com os cálculos o rearranjo seria altamente improvável caso não fosse levado em consideração os efeitos do solvente. Como é possível observar na Figura 24, há uma transferência de baixa energia do H do solvente para o isômero **IV**, favorecendo sua interconversão em **V**. Esse resultado ajuda a entender o fato de a reação não ter alcançado bons rendimentos em acetonitrila (solvente polar aprótico) e só alcançar bons rendimentos em solventes próticos.

Quando apenas uma molécula de metanol foi incluída nos cálculos (com o objetivo de simular os efeitos de solvente na reação) o rearranjo de Mumm se tornou extremamente favorável do ponto de vista energético, uma vez que a energia do isômero **Vb** é inferior à do **IVb**. Outro fator que embasa a proposta da ocorrência do rearranjo de forma bastante rápida é a baixa energia de ativação ( $7,20 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ) necessária para interconversão. Sendo assim os cálculos teóricos reforçaram as evidências de que de fato o isômero **IVb** sofre um rearranjo, gerando uma estrutura energeticamente mais estável, **Vb**.



**Figura 24** - M062X/6-311+G(2d,2p)//M062X/6-31+G(d,p) perfil da energia relativa do rearranjo de Mumm (**IVb** → **Vb**) em metanol.

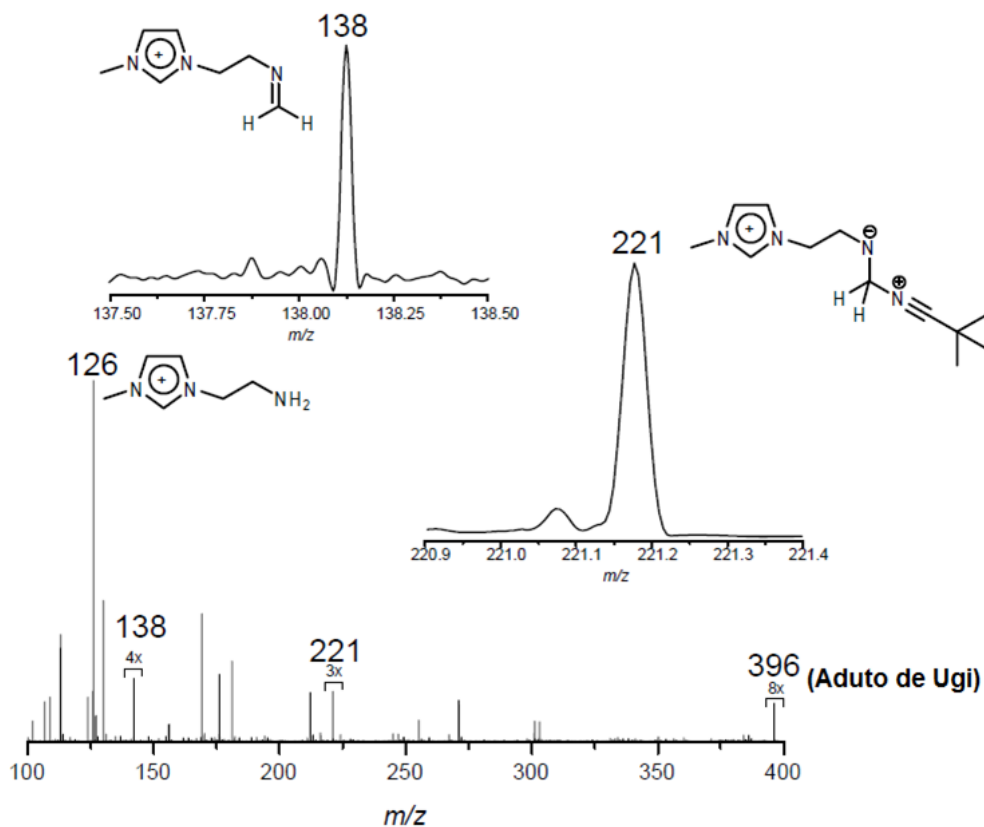
Com a utilização do MAI.Cl foi possível detectar apenas os íons **Ib** e **Vb**, não sendo possível identificar os íons mais importantes para a indicação da possível via mecanística para a U4CR (**IIb** e **IIIb**). Sendo assim, a amina LI-NH<sub>2</sub> foi utilizada com o objetivo de detectar a formação dos intermediários **IIc** e **IIIc** (Figura 25) que não puderam ser detectados quando o MAI.Cl foi usado. Para isso uma nova U4CR foi preparada como descrito no item 3.2, substituindo a benzilamina pela amina marcada (LI-NH<sub>2</sub>).



**Figura 25** - Possíveis intermediários da reação U4CR utilizando o LI-NH<sub>2</sub> como a amina da reação.

A Figura 26 expõe o espectro de massas da U4CR. Os sinais de  $m/z$  138 e  $m/z$  221 foram detectados 2 min após a injeção. Apesar de suas baixas intensidades foi possível se realizar o ESI(+)-MS/MS dos dois íons, o mesmo não foi possível para o sinal de  $m/z$  396,

pois sua concentração estava muito mais baixa (pico bem menos intenso). Além da baixa intensidade de alguns íons chaves para U4CR foi observado a formação de diversos picos referentes a degradação dos reagentes e de alguns produtos.



**Figura 26** - ESI(+)-MS da reação de U4RC usando a amina marcada (LI-NH<sub>2</sub>,  $m/z$  126), boc-glicina, formaldeído e t-butil isocianeto.

Mais uma vez o intermediário catiônico determinante da velocidade reacional pode ser identificado com  $m/z$  138 (**Ic**), entretanto, dessa vez, o que possibilitou sua detecção foi a utilização de uma molécula ionicamente marcada (LI-NH<sub>2</sub>). O espectro da fragmentação de **Ic** é exposto na Figura 27.

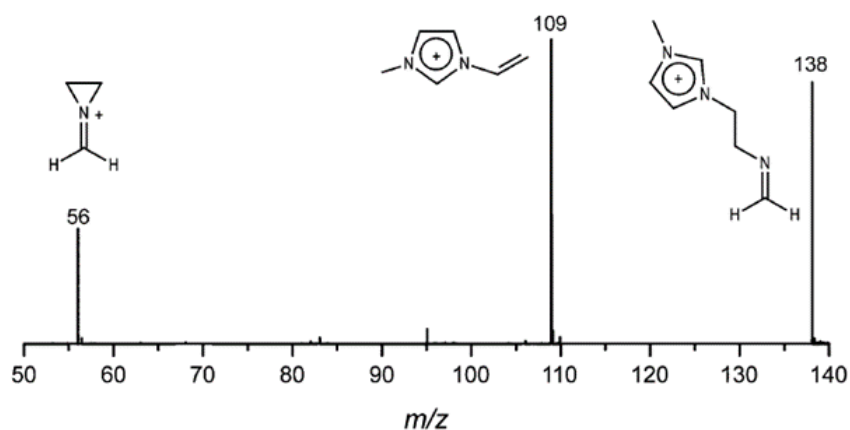


Figura 27 - ESI(+)-MS/MS do íon de  $m/z$  138.

A parte mais importante do trabalho em questão foi a detecção do intermediário catiônico de  $m/z$  221, nomeado de **IIc** na Figura 25. O espectro de fragmentação do cátion **IIc** foi exposto na Figura 28.

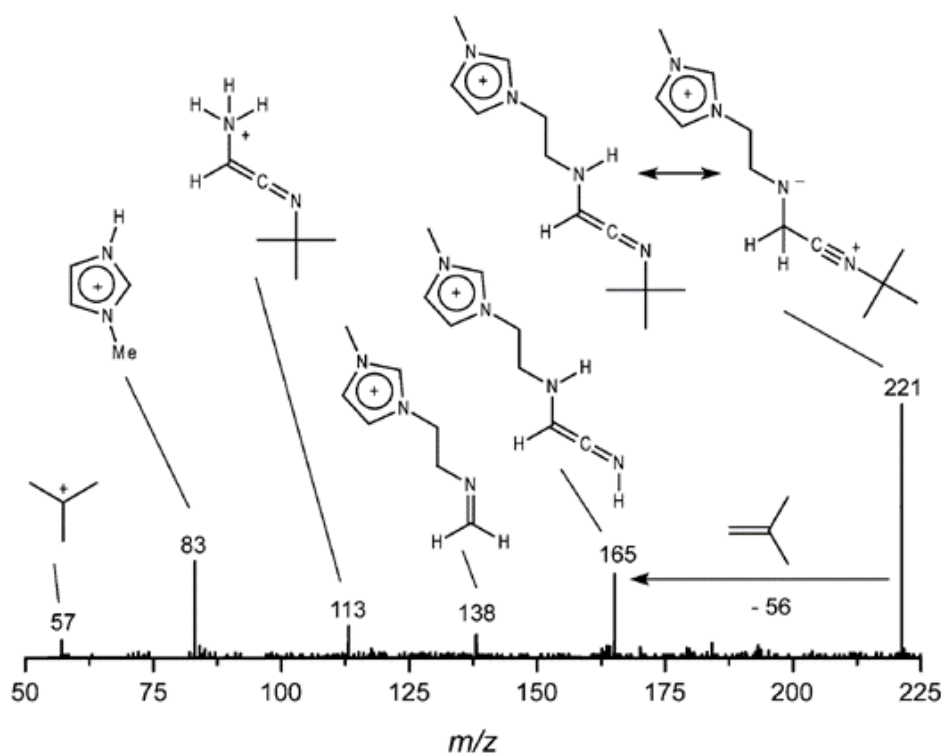


Figura 28 - ESI(+)-MS/MS do íon de  $m/z$  221.

O fato de a detecção dos intermediários reacionais **II** e **III** ser realizada apenas quando a amina marcada foi utilizada pode ser explicado pelo possível consumo cinético lento do reagente ionicamente marcado em relação aos reagentes neutros.

É importante destacar que como o intermediário reacional catiônico **IIIc** não foi detectado, então é possível afirmar que a via mecanística preferencial para U4CR é via formação do intermediário **IIc**, ou seja, via formação do íon imínio.

## 5 - Conclusão e Perspectivas

A reação e U4CR foi monitorada por ESI-MS(/MS) com auxílio de dois TSILs como reagentes ionicamente marcados. A utilização do MAI se mostrou eficiente para a detecção de alguns intermediários e do aduto da U4CR e, utilizando-se o LI-NH<sub>2</sub>, foi possível detectar os intermediários complementares não detectados anteriormente. Desta forma pode-se indicar que a adição de isocianeto ao intermediário imínio é o caminho reacional preferencial da reação. Cálculos teóricos corroboraram com os indicativos obtidos por ESI-MS(/MS) de que o rearranjo de Mumm é muito rápido e leva à formação do aduto de Ugi que é significativamente mais estável do que o intermediário isomérico.

Como perspectivas tem-se a possibilidade da utilização dos reagentes ionicamente marcados para o estudo mecanístico de outras RMC.



# Referências

### 3 - Referências

- (1) Osullivan, A. C. *Cellulose* **1997**, *4*, 173-207.
- (2) Lynd, L. R. *Annual Review of Energy and the Environment* **1996**, *21*, 403-465.
- (3) Ogeda, T. L.; Petri, D. F. S. *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1549-1558.
- (4) Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Ato2011-2014/2011/Lei/L12490.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2011-2014/2011/Lei/L12490.htm) Acessado: 09/12/2013
- (5) Hill, J.; Nelson, E.; Tilman, D.; Polasky, S.; Tiffany, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 11206-11210.
- (6) Fairley, P. *Nature* **2011**, *474*, S2-S5.
- (7) Fargione, J.; Hill, J.; Tilman, D.; Polasky, S.; Hawthorne, P. *Science* **2008**, *319*, 1235-1238.
- (8) Pacheco, T. F Circular Técnica 04, Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?, 2011, Disponível em: ISSN 2177-4420.
- (9) Sanderson, K. *Nature* **2011**, *474*, S12-S14.
- (10) Alvira, P.; Tomas-Pejo, E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4851-4861.
- (11) Hahn-Hagerdal, B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Liden, G.; Zacchi, G. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 549-556.
- (12) Galbe, M.; Zacchi, G. In *Biofuels*; Olsson, L., Ed.; Springer-Verlag Berlin: Berlin, 2007; Vol. 108, p 41-65.
- (13) Corma, A.; Iborra, S.; Velty, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2411-2502.
- (14) de Clippel, F.; Dusselier, M.; Van Rompaey, R.; Vanelderden, P.; Dijkmans, J.; Makshina, E.; Giebler, L.; Oswald, S.; Baron, G. V.; Denayer, J. F. M.; Pescarmona, P. P.; Jacobs, P. A.; Sels, B. F. J. *Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10089-10101.
- (15) Marques, S.; Santos, J. A. L.; Gírio, F. M.; Roseiro, J. C. *Biochem. Eng. J.* **2008**, *41*, 210-216.
- (16) Santos, F. A.; Queiróz, J. H. d.; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. M.; Rezende, S. T. *Quim. Nova* **2012**, *35*, 1004-1010.
- (17) Cranston, E. D.; Gray, D. G. In *Model Cellulosic Surfaces*; Roman, M., Ed.; Amer Chemical Soc: Washington, 2009; Vol. 1019, p 75-93.
- (18) Klemm, D.; Philipp, B.; Heinze, T.; Heinze, U.; Wagenknecht, W. *Comprehensive Cellulose Chemistry, Volume 1: Fundamental and Analytical Methods*. 1st ed; Wiley-VCH: Weinheim, 1998.
- (19) Ranby, B. *Advances in Chemistry Series* **1969**, 139-&.
- (20) Masarin, F.; Gurpilhares, D. B.; Baffa, D. C. F.; Barbosa, M. H. P.; Carvalho, W.; Ferraz, A.; Milagres, A. M. F. *Biotechnol. Biofuels* **2011**, *4*, 10.
- (21) Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzaple, M.; Ladisch, M. *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 673-686.
- (22) Shill, K.; Padmanabhan, S.; Xin, Q.; Prausnitz, J. M.; Clark, D. S.; Blanch, H. W. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 511-520.
- (23) Montane, D.; Salvado, J.; Farriol, X.; Chornet, E. *Biomass & Bioenergy* **1993**, *4*, 427-437.
- (24) VanWalsum, G. P.; Allen, S. G.; Spencer, M. J.; Laser, M. S.; Antal, M. J.; Lynd, L. R. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *57-8*, 157-170.
- (25) Beltrame, P. L.; Carniti, P.; Visciglio, A.; Focher, B.; Marzetti, A. *Bioresour. Technol.* **1992**, *39*, 165-171.
- (26) Brownell, H. H.; Saddler, J. N. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *29*, 228-235.
- (27) Grethlein, H. E.; Converse, A. O. *Bioresour. Technol.* **1991**, *36*, 77-82.

- (28) Ramos, L. P.; Breuil, C.; Saddler, J. N. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1992**, 34-5, 37-48.
- (29) Schell, D. J.; Torget, R.; Power, A.; Walter, P. J.; Grohmann, K.; Hinman, N. D. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1991**, 28-9, 87-97.
- (30) Sun, Y.; Cheng, J. Y. *Bioresour. Technol.* **2002**, 83, 1-11.
- (31) Holtzapple, M.; Jun, J.-H.; Ashok, G.; Patibandla, S.; Dale, B. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1991**, 28-29, 59-74.
- (32) Holtzapple, M. T.; Lundeen, J. E.; Sturgis, R.; Lewis, J. E.; Dale, B. E. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1992**, 34-5, 5-21.
- (33) Yachmenev, V.; Condon, B.; Klasson, T.; Lambert, A. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* **2009**, 3, 25-31.
- (34) Sun, R. C.; Tomkinson, J. *Carbohydr. Polym.* **2002**, 50, 263-271.
- (35) Sasmal, S.; Goud, V. V.; Mohanty, K. *Energ. Fuel* **2012**, 26, 3777-3784.
- (36) Zhu, S.; Wu, Y.; Yu, Z.; Wang, C.; Yu, F.; Jin, S.; Ding, Y.; Chi, R. a.; Liao, J.; Zhang, Y. *Biosystems Engineering* **2006**, 93, 279-283.
- (37) Nomanbhay, S. M.; Hussain, R.; Palanisamy, K. J. *Sust. Bioener. Syst.*, 2013, 3, 7-17.
- (38) Canam, T.; Town, J.; Iroba, K.; Tabil, L.; Dumonceaux, T. *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Microorganisms: Approaches, Advantages, and Limitations*, 2013.
- (39) Singh, P.; Suman, A.; Tiwari, P.; Arya, N.; Gaur, A.; Shrivastava, A. K. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2008**, 24, 667-673.
- (40) Chen, R. F.; Lee, Y. Y.; Torget, R. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, 57-8, 133-146.
- (41) Torget, R.; Walter, P.; Himmel, M.; Grohmann, K. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1991**, 28-9, 75-86.
- (42) Kumar, P.; Barrett, D. M.; Delwiche, M. J.; Stroeve, P. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, 48, 3713-3729.
- (43) Koullas, D. P.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B. J.; Koukios, E. G. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, 39, 113-116.
- (44) Zhu, J. Y.; Pan, X. J.; Zalesny, R. S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 87, 847-857.
- (45) Zhao, X. B.; Cheng, K. K.; Liu, D. H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 82, 815-827.
- (46) da Costa Lopes, A.; Joao, K.; Morais, A. R.; Bogel-Lukasik, E.; Bogel-Lukasik, R. *Sustainable Chemical Processes* **2013**, 1, 3.
- (47) Qiu, Z. H.; Aita, G. M.; Walker, M. S. *Bioresour. Technol.* **2012**, 117, 251-256.
- (48) Ha, S. H.; Ngoc, L. M.; An, G. M.; Koo, Y. M. *Bioresour. Technol.* **2011**, 102, 1214-1219.
- (49) Zhang, Z. Y.; O'Hara, I. M.; Doherty, W. U. S. *Bioresour. Technol.* **2012**, 120, 149-156.
- (50) Ooshima, H.; Burns, D. S.; Converse, A. O. *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, 36, 446-452.
- (51) Yu, H. B.; Guo, G. N.; Zhang, X. Y.; Yan, K. L.; Xu, C. Y. *Bioresour. Technol.* **2009**, 100, 5170-5175.
- (52) Taniguchi, M.; Suzuki, H.; Watanabe, D.; Sakai, K.; Hoshino, K.; Tanaka, T. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 100, 637-643.
- (53) Tejjirian, A.; Xu, F. *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, 48, 239-247.
- (54) MACHADO, C.M.M. (Ed.) *Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos*. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. 319 p.
- (55) Bubner, P.; Plank, H.; Nidetzky, B. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, 110, 1529-1549.
- (56) Pereira Ramos, L.; Domingos Fontana, J. In *Environ. Microbiol.*; Walker, J., Spencer, J. T., Ragout de Spencer, A., Eds.; Humana Press: 2004; Vol. 16, p 219-233.
- (57) Kaar, J. L.; Jesionowski, A. M.; Berberich, J. A.; Moulton, R.; Russell, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4125-4131.

- (58) Shipovskov, S.; Gunaratne, H. Q. N.; Seddon, K. R.; Stephens, G. *Green Chem.* **2008**, *10*, 806-810.
- (59) Tee, K. L.; Roccatano, D.; Stolte, S.; Arning, J.; Bernd, J.; Schwaneberg, U. *Green Chem.* **2008**, *10*, 117-123.
- (60) Basso, A.; Cantone, S.; Linda, P.; Ebert, C. *Green Chem.* **2005**, *7*, 671-676.
- (61) Para exemplo ver: (a) Salvador, A. C.; Santos, M. C.; Saraiva, J. A. *Green Chem.* **2010**, *12*, 632-635. (b) Engel, P.; Mladenov, R.; Wulfhorst, H.; Jager, G.; Spiess, A. C. *Green Chem.* **2010**, *12*, 1959-1966 (c) Bose, S. Armstrong, D. W.; Petrich, J. W. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8221-8227.
- (62) vanRantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2757-2785.
- (63) Dupont, J.; de Souza, R. F.; Suarez, P. A. Z. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3667-3691.
- (64) Earle, M. J.; Esperanca, J.; Gilea, M. A.; Lopes, J. N. C.; Rebelo, L. P. N.; Magee, J. W.; Seddon, K. R.; Widegren, J. A. *Nature* **2006**, *439*, 831-834.
- (65) Pilli, R. A.; Robello, L. G.; Camilo, N. S.; Dupont, J.; Lapis, A. A. M.; Neto, B. A. D. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1669-1672.
- (66) Petkovic, M.; Seddon, K. R.; Rebelo, L. P. N.; Pereira, C. S. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1383-1403.
- (67) Dupont, J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1223-1231.
- (68) Plechkova, N. V.; Seddon, K. R. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 123-150.
- (69) Para exemplos ver: (a) Chauvin, Y.; Musmann, L.; Olivier, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *34*, 2698. (b) Dullius, J. E. L.; Suarez, P. A. Z.; Einloft, S.; de Souza, R. F.; Dupont, J. *Organometallics* **1998**, *17*, 815. (c) Carmichael, A. J.; Earle, M. J.; Holbrey, J. D.; McCormac, P. B.; Seddon, K. R. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 997. (d) de Bellefon, C.; Pollet, E.; Grenouillet, P. J. *Mol. Catal. A: Chem.* **1999**, *145*, 121.
- (70) Neto, B. A. D.; Spencer, J. J. *Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 987-1007.
- (71) Tao, G.; Zou, M.; Wang, X.; Chen, Z.; Evans, D. G.; Kou, Y. *Aust. J. Chem.* **2005**, *58*, 327-331.
- (72) Ab Rani, M. A.; Brant, A.; Crowhurst, L.; Dolan, A.; Lui, M.; Hassan, N. H.; Hallett, J. P.; Hunt, P. A.; Niedermeyer, H.; Perez-Arlandis, J. M.; Schrems, M.; Welton, T.; Wilding, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 16831-16840.
- (73) Umpierre, A. P.; de Jesus, E.; Dupont, J. *ChemCatChem* **2011**, *3*, 1413-1418.
- (74) Medeiros, G. A.; Gonçalves, S. B.; Rodrigues, D. S.; Neto, B. A. D. *Rev. Virtual Quim.* **2013**, *5*, 74-94.
- (75) Ghose, T. K. *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 257-268.
- (76) Tese de doutorado do aluno Wellington Sabino Adriano - Universidade Federal de São Carlos - 2008.
- (77) Xiao, Z. Z.; Storms, R.; Tsang, A. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *88*, 832-837.
- (78) Gouveia, E. R.; Nascimento, R. T. d.; Souto-Maior, A. M.; Rocha, G. J. d. M. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1500-1503.
- (79) Dupont, J.; Suarez, P. A. Z.; Consorti, C. S.; deSouza, R. F. *Org. Synth.* **2002**, *79*, 236-246.
- (80) Cassol, C. C.; Ebeling, G.; Ferrera, B.; Dupont, J. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 243-248.
- (81) Bhunia, A.; Porwal, D.; Gonnade, R. G.; Biju, A. T. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4620-4623.
- (82) Yu, J.; Shi, F.; Gong, L. Z. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1156-1171.
- (83) Kumaravel, K.; Vasuki, G. *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*, 1820-1841.
- (84) Biggs-Houck, J. E.; Younai, A.; Shaw, J. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 371-382.
- (85) Dondoni, A.; Massi, A. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 451-463.
- (86) Brauch, S.; van Berkel, S. S.; Westermann, B. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4948-4962.
- (87) Guillena, G.; Ramon, D. J.; Yus, M. *Tetrahedron-Asymmetry* **2007**, *18*, 693-700.

- (88) Slobbe, P.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1189-1218.
- (89) Esquea adaptado da dissertação de mestrado de Haline Gerica de Oliveira Alvim, Instituto de Química, Universidade de Brasília - 2013
- (90) Singh, M. S.; Chowdhury, S. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 4547-4592.
- (91) Domling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3169-3210.
- (92) Ugi, I. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 187-191.
- (93) Cano-Herrera, M. A.; Miranda, L. D. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10770-10772.
- (94) Brauch, S.; Gabriel, L.; Westermann, B. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3387-3389.
- (95) La Spisa, F.; Feo, A.; Mossetti, R.; Tron, G. C. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6044-6047.
- (96) Hebach, C.; Kazmaier, U. *Chem. Commun.* **2003**, 596-597.
- (97) Cheron, N.; Ramozzi, R.; El Kaim, L.; Grimaud, L.; Fleurat-Lessard, P. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1361-1366.
- (98) Kusebauch, U.; Beck, B.; Messer, K.; Herdtweck, E.; Domling, A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4021-4024.
- (99) Lu, F.; Gao, X. P.; Yan, X. J.; Gao, H. J.; Shi, L. J.; Jia, H.; Zheng, L. Q. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 7626-7632.
- (100) Shi, L. J.; Jing, X. X.; Gao, H. J.; Gu, Y. Q.; Zheng, L. Q. *Colloid Polym. Sci.* **2013**, *291*, 1601-1612.
- (101) Oliveira, F. F. D.; dos Santos, M. R.; Lalli, P. M.; Schmidt, E. M.; Bakuzis, P.; Lapis, A. A. M.; Monteiro, A. L.; Eberlin, M. N.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10140-10147.
- (102) Hohenberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev. B* **1964**, *136*, B864-B871.
- (103) Kohn, W.; Sham, L. J. *Phys. Rev. B* **1965**, *137*, A1697-A1705.
- (104) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215-241.
- (105) Schlegel, H. B. *J. Comput. Chem.* **1982**, *3*, 214-218.
- (106) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Wallingford CT, 2009.