UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Daniela Moraes Batistela

Estudo da atividade e estabilidade
de lacases em líquidos iônicos

São Paulo

05/04/2011

Daniela Moraes Batistela

Estudo da atividade e estabilidade de
lacases em líquidos iônicos

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Química (Química
Orgânica).

Orientador

Prof. Dr. Renato Sanches Freire

São Paulo

05/04/2011

Batistela, Daniela Moraes. **Estudo da atividade e estabilidade de lacases em líquidos iônicos.** Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química (Química Orgânica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico essa dissertação aos meus pais, Marli e Antônio Carlos;

Aos meus irmãos, Fabiana, Juliano e Janaina;

Às minhas sobrinhas Maria Fernanda e Mariana.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Renato, orientador, por me acompanhar por todo percurso da pesquisa e da execução do projeto e por todo conhecimento científico que foi consolidado. Agradeço por sua habilidade de orientar e motivar de forma ética e positiva.

Aos professores Cassius Stevani e Reinaldo Bazito pelas valiosas orientações que complementaram no desenvolvimento desse trabalho.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa em Química Verde e Ambiental (GPQVA) pelo tempo de convívio harmonioso e descontraído. A troca de experiências e conhecimentos dentro do grupo foi muito importante para o meu amadurecimento científico.

A todos os funcionários do Instituto de Química da USP pelos anos de agradável convívio (graduação e pós-graduação), pelo auxílio e serviços prestados com competência e responsabilidade. Em especial às funcionárias do GPQVA, Beatriz e Georgia.

Ao Fernando pela ajuda atenciosa e paciente prestada em vários momentos da minha pós-graduação.

Ao Luís Américo, à Ligia, à Denise, à Olivia e ao Fabio, que colaboraram em diferentes etapas do desenvolvimento desse trabalho.

Aos membros do laboratório de Sistemas Biomiméticos do Instituto de Química da USP, pela oportunidade da iniciação científica e colaboração durante o desenvolvimento do meu projeto de pós-graduação. Em especial à Iolanda, ao Flávio, à Kátia e o Filipe.

À minha irmã Janaina pela ajuda na preparação deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que permitiu que me dedicasse exclusivamente ao meu projeto.

ABSTRACT

Batistela, Daniela Moraes. Study of Activity and Stability of Laccases in ionic liquids. 2011. 98p. Master Thesis- Graduate Programa in Organic Chemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this study, the activity and stability of laccase of *T. versicolor* and *C. hirsutus* were studied in ionic liquid (IL)-containing aqueous systems to provide valuable information with regard to the effect of IL on the enzyme activity.

The effect of IL on the laccase performance was investigated by comparing the activity, stability, kinetic (such as K_m , V_{max}) and thermal denaturation. An excessive amount of these ILs in the reaction systems resulted in decline in enzymatic activity. Both activity and stability of the enzyme correlate well with the Hofmeister series in terms of the salt's kosmotropic/chaotropic properties. Proteins are usually found to be stabilized by a kosmotropic anion and a chaotropic cation and destabilized by a chaotropic anion and a kosmotropic cation. Laccases strong had been inhibited presence of chaotropic anions Br^- and BF_4^- . Among the IL used here, 1-ethyl-3-methylimidazolium methanesulfonate was the most promising IL for laccase. A detailed analysis of kinetic data in the presence of catecol and syringaldazine as substrate revealed that the decrease in the laccase activity was a result of increase in K_m . Equal stability the transition temperature for the thermal denaturation of laccase of *T. versicolor* in ionic liquids based in $MeSO_3^-$ (kosmotropic) was comparable to that of the control sample.

It was observed an ion effect on the laccase activity and stability, for cations this parameters values increased in the order $BMIM^+ \approx BuN^+ \approx BMPP^+ < EMIM^+$; while for anions the order is $Br^- \approx BF_4^- < MeSO_4^- < MeSO_3^-$. Also an increase in K_m is correlated with the decrease in the catalytic reaction efficiency (K_{cat}/K_m) in medium containing ionic liquid.

Design and use of water-mimicking IL composed of chaotropic cations and kosmotropic anions may facilitate the applications of IL in biotransformations.

Keywords: (enzymes, laccase, ionic liquid, alternative solvents)

RESUMO

Batistela, Daniela Moraes. **Estudo da atividade e estabilidade de lacases em líquidos iônicos**. 2011. 98 p. Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química (Química Orgânica).

Neste trabalho foram estudadas a atividade e a estabilidade de lacases dos fungos *Coriolus hirsutus* e *Trametes versicolor* em meio aquoso contendo líquidos iônicos (LI) como co-solventes, com o objetivo de se obter informações sobre os efeitos desses solventes na atividade enzimática. Foi avaliado o efeito de onze LI (cátions: tetrabutilamônio, 1-butil-3-metilpiperidina e 1-alkil-3-metilimidazólios; combinados com ânions: brometo, cloreto, metilsulfato, metanossulfonato e tetrafluorborato) em diferentes frações molares em meio aquoso tamponado com ácido acético ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,7 e 25°C).

De um modo geral, a atividade inicial das lacases nos diferentes líquidos iônicos foi inferior à obtida em solução aquosa somente tamponada. O aumento da concentração dos LI também resultou no decréscimo da atividade enzimática. Tanto os resultados obtidos para atividade, como para estabilidade enzimática, se correlacionaram bem com a série de Hofmeister, que ordena os íons de acordo com suas propriedades cosmotrópicas/caotrópicas. Ânions cosmotrópicos e cátions caotrópicos estabilizam proteínas, enquanto ânions caotrópicos e cátions cosmotrópicos as desestabilizam. As lacases estudadas foram fortemente inibidas na presença dos ânions caotrópicos Br^- e BF_4^- . Entre os LI utilizados neste trabalho, o metanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio foi co-solvente mais promissor para lacase. Os dados cinéticos das reações enzimáticas em metanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio e metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio, utilizando os substratos catecol e siringaldazina, revelaram que o decréscimo da atividade enzimática é resultado do aumento da constante michaeliana. Os resultados obtidos da estabilidade e temperatura de transição de desnaturação térmica da lacase em LI formado por MeSO_3^- , cosmotrópico, foram comparáveis aos obtidos em tampão.

A ordem crescente de atividade e estabilidade da lacase em líquidos iônicos para cátions foi $\text{BuN}^+ \approx \text{BMPP}^+ \approx \text{BMIM}^+ < \text{EMIM}^+$, enquanto para ânions foi $\text{Br}^- \approx \text{BF}_4^- < \text{MeSO}_4^- < \text{MeSO}_3^-$. A diminuição da eficiência catalítica da reação ($K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) em meio contendo líquido iônico foi proporcionada principalmente pelo aumento da K_{m} .

Líquidos iônicos têm se apresentado como potenciais solventes para utilização em biocatálise. As propriedades físico-químicas dos LI podem ser moduladas pela combinação de diferentes cátions e ânions, visando características diferenciais para atividade enzimática. O estudo do mecanismo catalítico e dos efeitos específicos dos íons é de fundamental importância para a utilização vantajosa desses solventes em reações enzimáticas.

Palavras-chave: (enzimas, lacase, líquidos iônicos, solventes alternativos)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMIM⁺ - 1-butil-3-metilimidazólio

BMPPDA - 1-butil-metilpiperidina

BuN⁺ - tetrabutilamônio

C. hirsutus - *Coriolus hirsutus*

DDMIM⁺ - 1-dodecil-3-metilimidazólio

DLVO - Drjaguin, Laundau, Verwey e Overbeek

DMP - 2,6 dimetoxifenol

DSC - Calorimetria Diferencial Exploratória

EMIM⁺ - 1-etil-3-metilimidazólio

FT-IR - infravermelho com transformada de Fourier

K_{cat} - constante catalítica

K_m - constante michaeliana

ITC - Titulação Calorimétrica Isotérmica

LI - líquido(s) iônico(s)

OMIM⁺ - 1-octil-3-metilimidazólio

MeSO₃⁻ - metanossulfonato

MeSO₄⁻ - metilsulfato

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

T. versicolor - *Trametes versicolor*

T_m - temperatura de transição térmica

TMS - tetrametilsilano

UV-Vis - ultravioleta visível

V_{máx} - velocidade máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Lacase (p-difenol:oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)	10
1.2. Líquidos iônicos	16
1.3. Biocatálise em solventes não convencionais	20
1.3.1. Líquidos iônicos: solventes alternativos para reações enzimáticas	23
1.3.1.1. Lacases em líquidos iônicos	24
1.4. Importância da natureza do líquido iônico em reações enzimáticas	27
1.4.1. Composição dos líquidos iônicos e impurezas	27
1.4.2. Propriedades físico-químicas: polaridade, hidrofobicidade e viscosidade	27
1.4.3. Proteínas, sais e água	28
1.4.3.1. Efeito da concentração de íons: teoria DLVO e o efeito de Hofmeister	30
2. OBJETIVOS	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1. Reagentes.....	36
3.2. Solventes	36
3.3. Equipamentos	37
3.4. Líquidos iônicos utilizados nos testes enzimáticos: preparo e caracterização	38
3.4.1. Preparo de metanossulfonato de butila	38
3.4.1.2. Preparo de metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio	38
3.4.1.3. Preparo de tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio	39
3.4.1.4. Preparo de metanossulfonato de 1-butil-metilpiperidina	40
3.5. Ensaio enzimático utilizando a enzima lacase	40
3.5.1. Otimização das condições experimentais da atividade enzimática	41
3.5.2. Lacases em solução LI/tampão	42
3.5.2.1. Atividade enzimática da lacase em diferentes líquidos iônicos.....	42
3.5.2.2. Constantes cinéticas das lacases em BMIM·MeSO ₃ e EMIM·MeSO ₃ ...	44
3.5.2.3. Estabilidade enzimática da lacase em solução contendo líquido iônico	44
3.5.2.4 Estabilidade térmica da enzima lacase em solução LI/tampão.....	45
3.5.2.5. Medida da atividade enzimática em líquidos iônicos cloretos de 1-alkil-3-metilimidazólios	45
3.5.2.6. Determinação da CMC para os líquidos iônicos	45

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. Preparo e caracterização dos líquidos iônicos	46
4.2. Otimização das condições experimentais da atividade enzimática.....	50
4.2.1. Atividade enzimática das enzimas lacases em meio aquoso	50
4.2.3. Discussão: parâmetros reacionais para reações de oxidação de compostos fenólicos catalisadas pela lacase	59
4.3. Medida da atividade das lacase dos fungos <i>Coriolus hirsutus</i> e <i>Trametes versicolor</i> em solução LI/tampão	60
4.4. Cinética da reação enzimática da lacase do fungo <i>Trametes versicolor</i> em BMIM MeSO ₃	68
4.5. Estabilidade da lacase do fungo <i>Trametes versicolor</i> em líquidos iônicos.....	73
4.6. Estabilidade térmica da lacase em líquidos iônicos	76
4.7. Atividade da Lacase do fungo <i>Trametes versicolor</i> em cloretos de aquilmetilimidazólios	79
5. CONCLUSÃO.....	82
6. REFERÊNCIAS.....	84
SÚMULA CURRICULAR.....	92

1. INTRODUÇÃO

As catálises enzimáticas são reações típicas de sistemas aquosos e, de um modo geral, possuem cinéticas e parâmetros reacionais bem conhecidos nesse meio. Entretanto, o uso exclusivo da água como solvente pode ser um fator limitante para aplicação em diversos processos catalíticos, principalmente aqueles que envolvem substratos hidrofóbicos. Além da tendência de apresentar melhor desempenho em ambiente aquoso, as reações catalíticas envolvendo enzimas tendem a ser mais eficientes em temperaturas abaixo de 40°C e baixa pressão osmótica. Durante a história da biocatálise, condições reacionais alternativas têm sido estudadas com o objetivo de solucionar problemas relacionados à solubilidade do substrato, seletividade (incluindo quimio-, régio- e enantio-especificidade), rendimento e estabilidade (Wasserscheid; Welton, 2002; Klibanov, 2001).

1.1. Lacase (p-difenol:oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)

Lacase é uma oxidase, cujo sítio ativo contém quatro átomos de cobre de três diferentes tipos e que catalisa a redução de oxigênio molecular a água – não havendo a etapa de produção de peróxido de hidrogênio - com a concomitante abstração de um elétron de um substrato doador (especialmente compostos aromáticos) (Reinhammar, 1984). Esta enzima foi primeiramente isolada em 1883 da árvore de laca japonesa (Yoshida, 1883), *Toxicodendron vernicifluum* (anteriormente *Rhus vernicifera*), da família do cajú. Embora ocorram em outras plantas, tais como tabaco (*Nicotiana tobacco*) e milho (*Zea mais*), a maioria das lacases é extraída de fungos superiores, especialmente dos basidiomicetos de podridão branca (que degradam lignina) e de alguns ascomicetos (Morozova, 2007). Embora a função das lacases em plantas e fungos ainda não esteja muito bem definida estipula-se que, em plantas elas estão envolvidas na síntese de lignina e catalisam a polimerização radicalar de unidades estruturais de álcoois *p*-cumarilílico, coniferílico e sinapílico. Já nos fungos, a função é inversa, ou seja, a degradação de lignina, além da destruição de patógenos, destoxificação e desenvolvimento morfológico do fungo (Thurston, 1994; Baldrian, 2006; Leonowicz, 2001).

Considerando a especificidade do substrato, as enzimas ligninolíticas em fungos (*i.e.* manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase) são extracelulares. Embora a maioria das lacases seja extracelulares, fungos de podridão branca, principalmente, produzem lacases intracelulares e extracelulares, porém a maioria (cerca de 95%) está localizada fora da célula (Blaich 1975). Lacases fúngicas intracelulares podem estar envolvidas na transformação de compostos fenólicos de baixo peso molecular produzidos pelas células, síntese de melanina e outras substâncias protetoras (Eggert, 1995; Galhaup, 2001).

Até agora, centenas de lacases foram isoladas e caracterizadas. Muitos fungos produzem várias isoformas, daí a comum menção desta enzima no plural. Tanto as lacases de plantas como as de bactérias ou fungos são glicoproteínas. As de fungos possuem massa molecular de 50-190 kDa, pI 3,2-7,5 e temperatura ótima de 20-80°C, geralmente possuindo temperaturas relativamente elevadas (Morozova, 2007). Como exemplo, pode-se citar o fungo *Coriolus hirsutus* com massa molecular de 73 kDa, 11% de carboidratos, pI 4,4 e $t_{\text{ótima}} = 45^{\circ}\text{C}$ (Shin, 2000). Na maioria das lacases de plantas a porção glicosídica consiste em manose, n-acetilglucosamina e galactose, que somam 45% da massa (Blaich; Esser, 1975). Em fungos as lacases geralmente possuem menor quantidade de carboidratos (10-20%). Entretanto, alguns fungos basidiomicetos podem conter até 49% (Shin, 2000). Muitos pesquisadores acreditam que os glicosídeos são responsáveis pela proteção contra a proteólise por radicais livres (Thurston, 1994) e estabilização da proteína na forma globular, a desglicosilação da lacase de *Ganoderma lucidum*, por exemplo, leva a completa inibição da atividade da enzima (Enguita, 2003).

O sítio ativo das lacases contém quatro átomos de cobre: um cobre “azul” mononuclear (sítio T1) e três cobres em um cluster (sítio T2/T3) consistindo de um cobre T2 e dois T3 (Figura 1.1). Os íons de cobre da lacase são classificados pela distribuição espectral no UV-Vis e características de EPR (Solomon, 1996; Malmstrom, 1982; Reinhammar; Vanngard, 1971). O sítio T1 confere cor azul clara à solução da lacase em água, sendo caracterizado por uma banda pronunciada em 600 nm ($\sim 5.000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e um fraco desdobramento paralelo superfino no espectro de EPR ($g_{\parallel} = 2,30$; $A_{\parallel} = 40-95 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$). O átomo de cobre do sítio T1 tem como ligantes dois grupos imidazólicos de histidina e um grupo sulfidrílico de cisteína, formando uma estrutura trigonal. O cobre do sítio T2 mononuclear não é

detectável por absorção no UV-Vis, mas exibe desdobramento superfino no espectro de EPR ($g_{\parallel} = 2,24$; $A_{\parallel} = 140-200 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$), típico de complexos tetraédricos (Solomon,1996). Por fim, o sítio T3 é binuclear, com os átomos de cobre pareados de forma antiferromagnética, via uma ponte de um grupo hidroxila, o que o torna diamagnético e impossibilita sua detecção por EPR. Ele é identificado como um ombro em 330 nm. Oito grupos imidazólicos de histidina são os ligantes do cluster T2/T3 (Solomon,1996). Deve-se ressaltar que lacases com diferentes arranjos de sítios ativos são descritas na literatura. Por exemplo, o sítio ativo da lacase do fungo *Phlebia radiata* contém dois átomos de cobre (em T1 e T2) e um grupo prostético de pirroquinolinaquinona (PQQ), que parece agir como sítio T3 (Karhunen, 1990).

Figura 1.1. Esquema simplificado do sítio ativo de lacase do *Bacillus subtilis*, com as distâncias (em Å) entre os átomos mais importantes (Enguita, 2003).

Os potenciais-padrão redox dos três sítios de cobre das lacases (T1, T2 e T3) são uma das principais características das cobre-oxidases, incluindo a lacase. Baseado no potencial-padrão redox do sítio T1 todas as oxidases contendo cobre são subdivididas em enzimas de potencial alto, médio ou baixo (Eggert, 1998; Shleev, 2005; Ferapontova, 2005). O sítio T1 da enzima é o aceptor primário dos elétrons do substrato, o qual será reduzido. As lacases conseguem oxidar somente compostos com potencial de ionização menores ou levemente maiores do que o

potencial redox do átomo de cobre do sítio T1 (Xu, 1997). O potencial de T1 também determina a eficiência da catálise na oxidação da maioria dos substratos da lacase, fazendo com que enzimas com alto potencial redox do sítio T1 sejam promissoras para aplicações biotecnológicas (Xu, 1997).

A estrutura completa da enzima lacase do fungo *Trametes versicolor* apresentada por Piontek et al. (2002) é apresentada na Figura 1.2. O modelo completo do polipeptídeo é apresentado com um monômero organizado em três domínios com dimensões de cerca de 65 x 55 x 45 Å. Na cavidade localizada no domínio 1 (D1) está localizado o cobre T1 (esfera isolada). Entre os domínios 1 e 3 (D3), que possuem resíduos para coordenação dos cobres, localiza-se o cluster trinuclear (T2/T3). O carbono C terminal finaliza o domínio 3. O 13º aminoácido da longa cadeia α -hélice é estabilizado por pontes dissulfeto com D1, e uma segunda ponte dissulfeto conectada aos domínios 1 e 2 (D2).

Figura 1.2. Diagrama da estrutura da lacase de *T. versicolor*. Disposições das cadeias polipeptídicas divididas em domínios estruturais apresentado em diferentes códigos (D1–D3). Íons cobres são representados por esferas. Carboidratos e pontes dissulfetos são postados como barras (“stick models”). (Piontek et al., 2002)

O sítio T2/T3 onde oxigênio é reduzido tem acesso ao solvente através de dois canais, o que leva para o sítio do cobre tipo 3 e o sítio do cobre tipo 2. A

distribuição de potencial eletrostático de superfície revela um domínio de carga negativa que está de acordo com o PI desta enzima que é cerca de 3,5. Pela estrutura cristalina do complexo enzima/substrato, sabe-se que a ligação ocorre em uma cavidade levemente negativa próximo ao sítio T1. A densidade de carga localizada neste sítio pode estabilizar os cátions radicais que são formados durante o ciclo catalítico (Piontek, 2002).

Embora existam muitos trabalhos com oxidases contendo cobre, incluindo lacases, não há opinião única sobre os mecanismos de transferência de elétrons e redução do oxigênio molecular. Assume-se que o sítio T1 da lacase recebe elétrons do substrato (gerando um cátion-radical ou cátion intermediário) e, então, os transfere para os três átomos de cobre do cluster T2/T3, onde o oxigênio molecular é reduzido a água (Solomon, 1996; Messerschmidt, 1992; Bento, 2005). A interação de uma lacase completamente reduzida com oxigênio molecular resulta em diferentes formas da enzima. Duas formas bem estudadas são: o intermediário peroxídico e o nativo (Figura 1.3) (Morozova, 2007). O intermediário nativo desempenha papel importante no ciclo catalítico da lacase, pois via reação com $^{17}\text{O}_2$, comprovou-se que este intermediário age como uma espécie radicalar de oxigênio (Reinhammar, 1984). Por EPR observa-se que os quatro íons de cobre no intermediário nativo estão oxidados, Cu(II) (Palmer, 2001). A estrutura deste intermediário é diferente da forma “dormente” oxidada, pois o cobre do sítio T2 não está conectado com o cobre de T3.

A gama de compostos potencialmente oxidáveis pela lacase pode ser ampliada com a utilização de mediadores químicos - substratos desta enzima que geram intermediários com alto potencial redox. Sob condições controladas por difusão estes intermediários oxidam outros compostos, cujo tamanho ou falta de afinidade impede a ação direta de lacases (Morozova, 2007), sendo reduzidos ao estado inicial e, então, continuando um ciclo catalítico.

O mecanismo de reação catalisado por lacases envolve a produção de radicais livres altamente reativos pela remoção de um elétron ou hidrogênio de grupos OH ou NH (Dec, 2001; Gianfreda, 2006). Esses radicais podem reagir entre si ou com outras moléculas, em reações catalisadas pela enzima ou não, como polimerização, hidratação ou abstração de hidrogênio. Para compostos fenólicos, a oxidação pela lacase resulta na formação de radicais aril, espécie ativa que é

convertida a uma quinona. Quinonas intermediárias podem sofrer reações adicionais para formar compostos oligômeros coloridos insolúveis dependendo do substrato e parâmetros reacionais. Além disso, pode haver reações de descarboxilação, desmetoxilação e desalogenação de compostos orto e para substituídos (Leonowicz, 1984; Schultz, 2001; Majeau, 2010).

Figura 1.3. Ciclo catalítico da enzima lacase, mostrando o mecanismo de redução e oxidação dos sítios de cobre (Shleev, 2006).

Diversos fatores podem influenciar a reação de oxidação de compostos fenólicos, principalmente a estrutura química dos fenóis: número, natureza e posição de substituintes no anel aromático. Substituintes doadores de elétrons ($-\text{CH}_3$ ou $-\text{CH}_2\text{CH}_3$) provocam a diminuição do potencial de oxidação da molécula e aumento da velocidade da reação, o contrário acontece com substituintes eletrofílicos (Gianfreda, 2006).

Vários compostos são descritos como inibidores da lacase. Entre os inibidores incluem-se pequenos ânions inorgânicos como azidas, cianidas, haletos e hidroxilas (Naqui; Varfolomeev, 1980; Xu, 1996; Xu et al., 1996). Esses íons ligam-se ao sítio T_2/T_3 impedindo a transferência de elétrons do sítio T_1 para os sítios T_2/T_3 , inibindo assim a atividade enzimática (Xu, 1996a; Xu, 1996b; Gianfreda, 1999). A ordem de inibição para os íons haletos ($F^- > Cl^- > Br^-$) é atribuída à diferença de acessibilidade aos átomos de cobre do sítio T_2/T_3 (Naki, Varfolomeev, 1981). Feng (Xu, 1996a) observou uma significativa diferença da I_{50} (concentração de inibidor onde há perda de 50% da atividade enzimática) para diferentes lacases e haletos. A lacase da planta *Rhus* apresentou valores de I_{50} similares para os haletos, devido a “larga abertura” que leva aos sítios T_2 e T_3 . A inibição por haletos não inclui I^- , pois este é substrato para a lacase (Xu, 1996b). Outros inibidores como íons metálicos (Hg^+), ácidos graxos, detergentes quaternários de amônio têm sido relatados devido à ligação com os íons cobres do sítio ativo da enzima ou devido à desnaturação protéica (Leonowicz, 1981).

1.2. Líquidos iônicos

Líquidos iônicos (LI) são sais, formados por um cátion orgânico e um ânion (orgânico ou inorgânico) que têm pontos de fusão abaixo de $100^\circ C$. A síntese de nitrato de etilamônio por Walden (1914) é geralmente apontada como marco inicial da produção deste tipo de composto. Esta espécie foi formada pela adição de ácido nítrico em etilamina, que depois de ter sua água removida por destilação deu origem a um sal puro, líquido a temperatura ambiente (Wasserscheid; Welton, 2002). A maioria dos LI é formada por cátions que não contêm prótons ácidos e sua síntese geralmente pode ser dividida em duas etapas: a síntese do cátion desejado e a troca iônica quando necessária. A maioria dos 1,3-alquilimidazólios, por exemplo, pode ser preparada através da alquilação de N-alquilimidazol empregando-se haletos de alquila, que é seguida da associação com o haleto. Pela reação de metátese, podem ser obtidos 1,3-alquilimidazólios formados por diferentes ânions (Cassol et al., 2006). O haleto do cátion desejado muitas vezes é comercialmente disponível a um custo razoável, requerendo somente a troca iônica (Wasserscheid; Welton,

2002). Os principais cátions utilizados para a formação de LI são derivados de amônio, sulfônio, imidazol e pirídínio (Figura 1.4).

Figura 1.4. Tipos mais comuns de cátions e ânions usados em líquidos iônicos.

O estado líquido é termodinamicamente favorável devido ao grande tamanho do cátion e flexibilidade conformacional dos íons (Krossing et al, 2006). A força dominante em líquidos iônicos é a de atração coloumbiana entre os íons (Equação 1.1), onde Z^+ e Z^- são as cargas dos íons e r o raio que os separam.

$$E_c = MZ^+Z^- / 4\pi\epsilon_0 r \quad (1.1)$$

A energia de rede total em sólidos, como tratado pela equação de Born-Landé ou Kaputinskii, depende do produto das cargas individuais dos íons, da separação entre os íons e eficiência do empacotamento (refletida pela constante de Madelung, M , em termos de energia coloumbiana). Portanto, íons grandes com carga unitária, tendem a apresentar pontos de ebulição menores. Em geral, o tamanho, a forma e a distribuição de carga são fatores significantes que influenciam no ponto de ebulição de sais. Em séries similares de sais, uma pequena mudança na estrutura, como aumento do caráter covalente, tem uma grande influência no ponto de ebulição. Como exemplo, têm-se o aumento do tamanho do ânion que proporciona a redução

do ponto de ebulição, devido ao aumento do caráter covalente dos íons, e a redução da contribuição da atração coloumbiana para energia de rede do cristal. Já cátions com baixa simetria, como imidazólios com suas diversas cadeias alquílicas, que distorcem a distribuição de carga coloumbiana, proporcionam uma variedade de compostos com características de não serem sólidos a temperatura ambiente. (Wasserscheid; Welton, 2002).

As propriedades físico-químicas dos líquidos iônicos como condutividade, viscosidade, hidrofobicidade, densidade e polaridade podem ser modificadas pela combinação de diferentes cátions e ânions. Essas propriedades são determinantes com relação às diferentes aplicações desses solventes (Moniruzzamana, 2010), como, por exemplo: extração, síntese orgânica, catálise, síntese inorgânica, separação, síntese de nanomateriais e reações enzimáticas.

Enquanto os LI apresentam viscosidade (μ) na faixa de 35-574 cP, a temperatura ambiente, a viscosidade da água e do tolueno são iguais a 0,9 cP e 0,6 cP, respectivamente. A viscosidade dos LI é dependente da capacidade de formação de ligações de hidrogênio, da basicidade do ânion e das interações de van der Waals, sendo esse último fator predominante. Líquidos iônicos formados por ânions fluorados, por exemplo, são menos viscosos por possuírem cargas deslocalizadas e fracas ligações de hidrogênio (Bonhote et al., 1996; Huddleston, 2001). A presença de impurezas também pode alterar a viscosidade dos LI. Água como contaminante provoca a diminuição da viscosidade desses solventes, enquanto cloreto provoca o aumento (Moniruzzamana et al., 2010).

A formação de estruturas ordenadas (domínios, cadeias, pares iônicos) é utilizada para explicar a alta viscosidade e densidade. Os LI derivados dos cátions 1,3-dialquilimidazólios organizam-se em um padrão estrutural polimérico supramolecular. Sendo que, possuem uma estrutura padrão análoga na fase sólida e líquida. (Schröder et al, 2000; Dupont, 2004). Além das interações eletrostáticas, outras interações também contribuem no ordenamento estrutural, como existência de ligações de hidrogênio, interações do tipo π entre os anéis aromáticos paralelos, interações fracas entre os hidrogênios dos grupos CH_2 e CH_3 e os orbitais do anel imidazólico, e interações do tipo de van der Waals entre as cadeias alifáticas (Consorti, 2001).

A condutividade específica dos líquidos iônicos (σ), a temperatura ambiente, é na maioria dos casos aproximadamente 10^{-1} S/m. O tamanho do íon, o grau de dissociação, viscosidade e densidade afetam a condutividade específica (Hagiwara; Ito, 2000). Além da alta condutividade iônica, LI possuem uma larga janela eletroquímica (cerca de 7,0 V), principalmente a classe baseada em cátions imidazólios. O que confere aos LI excelentes características para serem empregados em sistemas eletroquímicos e/ou eletroanalíticos.

Líquidos iônicos que possuem ânions não coordenantes (exemplo: PF_6^- e TF_2N^-) são menos polares que alcoóis de cadeia curta (Huddleston et al., 2001; Muldoon; Gordon; Dunkin, 2001; Kaar et al., 2003; Yang; Pan, 2005). A hidrofobicidade é geralmente relacionada à polaridade. Contudo, é importante não utilizar esse conceito para LI. Miscibilidade com água freqüentemente é relacionada à hidrofobicidade que depende da composição do LI. Ânions hidrofílicos como Cl^- , Br^- , I^- , e CHCOO^- formam líquidos iônicos que são capazes de se misturar com a água. Já a hidrofobicidade de LI contendo ânions trifluorometanossulfonato depende do cátion. Escalas empíricas tradicionais para caracterizar a polaridade de solventes (exemplo: corante solvatocrotômico vermelho do Nilo), que freqüentemente caracteriza os LI como tendo polaridades similares a muitos alcoóis de cadeia curta, não conseguem relacionar o fato de que LI com polaridades semelhantes tenham propriedades muito diferentes, uma vez que podem variar de super ácidos a básicos, hidrofóbicos a hidrofílicos. Isso porque essas escalas empíricas são válidas apenas para solventes que possuem poucas interações. Já para solventes como LI, que podem ter várias interações soluto-soluto, por exemplo, dipolares e pontes de hidrogênio, essa escala não é válida (Huddleston et al, 2001). Por causa da sua alta polaridade desses solventes são capazes de dissolver uma grande variedade de substâncias orgânicas polares e apolares, inorgânicas e compostos poliméricos, portanto, são meios propícios para reações químicas e bioquímicas.

1.3. Biocatálise em solventes não convencionais

Ao contrário do que em sistemas aquosos, o comportamento de enzimas em outros solventes é pouco conhecido. A primeira evidência da viabilidade da utilização de solventes orgânicos em biocatálise com impacto na comunidade científica foi apresentada por Zaks e Klibanov (1984). A partir deste trabalho, a idéia de que o meio aquoso é indispensável para a manutenção da conformação estrutural da enzima e sua atividade catalítica começou a ser questionada.

Os solventes não-convencionais podem ser utilizados em catálises como solventes anidros, co-solventes ou sistemas bifásicos. Quando a água é substituída por um solvente orgânico, alterações na conformação nativa da enzima podem ocorrer tanto na estrutura terciária como nas mais proeminentes estruturas secundárias (a α -hélice e a conformação β) acarretando, desta maneira, a sua desestabilização. Uma exceção seria a estabilização conformacional adquirida pela enzima em meios não-aquosos, por meio do "efeito gaiola". Neste caso, as moléculas das enzimas, no interior da proteína, estariam firmemente comprimidas pelas moléculas ao seu redor à semelhança das enzimas imobilizadas (Khmelnitsky et al, 1988).

Solventes altamente polares podem afetar a estabilidade enzimática ao interagir com a água e remover a camada de hidratação da enzima. A capacidade de solventes hidrofóbicos alterarem a camada de hidratação da enzima é menor, assim, este tipo de solvente afeta parcialmente a atividade enzimática (Lima; Angnes, 1999). A utilização de solventes não-aquosos anidros em reações enzimáticas é limitada pela mínima quantidade de água necessária para manter a camada de hidratação da enzima (Wasserscheid, Welton, 2002), sendo que, a atividade enzimática está relacionada à quantidade de água ligada a proteína e não a concentração de água nos solventes orgânicos (Zaks; Klibanov, 1988). A explicação mais provável para isso advém do fato de a água aumentar a mobilidade e a flexibilidade dos sítios ativos e, concomitantemente, a polarização da estrutura protéica. A quantidade de água necessária para catálise depende das características de cada enzima (Lima; Angnes, 1999). Sais hidratados e soluções salinas saturadas são utilizados para controlar a atividade de água em solventes não aquosos (Gupta; Roy, 2004).

Enzimas são normalmente instáveis termicamente em solução aquosa, devido ao desenrolamento parcial e alterações nas ligações covalentes causadas pela água na estrutura primária da proteína (Krishna, 2002). A diminuição dos efeitos hidrofóbicos, quando se tira a água da superfície da enzima, leva a uma reorganização estrutural e aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares, proporcionando uma maior rigidez conformacional e termoestabilidade em meio não aquoso (Kauzmann, 1959). O componente predominante destas ligações intramoleculares é eletrostático. Logo, a estabilidade dessas ligações deve aumentar em solventes com baixa constante dielétrica. Lípase pancreática, por exemplo, permaneceu estável a 100°C por 12 horas em solventes orgânicos (Klibanov; Zaks, 1984). A termoestabilidade é explicada também pelos processos covalentes envolvidos na inativação irreversível, tais como deamidação, hidrólise de peptídeos e decomposição da cistina, que são extremamente baixas em sistemas que não contem água (Krishna, 2002).

Reações enzimáticas em meio não-aquoso podem proporcionar maior solubilidade do substrato, maior estabilidade enzimática e a manipulação dos parâmetros cinéticos das reações. O produto final obtido em reações enzimáticas ocorridas em meios contendo solventes orgânicos pode ser diferente daquele obtido em meio aquoso. Maa (2009), por exemplo, observou que em meio contendo diclorometano a polimerização do catecol catalisada pela lacase de *Rhus vernificera* é desfavorecida. Sendo que, a reação de oxidação do catecol ocorre em duas etapas: primeiro é formada a quinona via a reação catalisada pela lacase; posteriormente é formado o polímero (catecol-melanina) via diversas reações não enzimáticas envolvendo os intermediários. Assim, o intermediário dopa-quinona que é utilizado para fim terapêutico pode ser isolado mais facilmente. Em outro estudo realizado por Haber e colaboradores (2000), as lacases de *P. Radiata* e *P. Oryzae* foram inibidas por todos os solventes estudados, entretanto, sem significativa desnaturação enzimática. Sendo que, a velocidade de formação do produto foi menor em reações utilizado o substrato siringaldazina do que a obtida em reações utilizando 2,6-dimetoxifenol.

O fato de enzimas permanecerem ativas em solventes orgânicos tem feito com que se buscassem cada vez mais novos solventes alternativos aos meios aquosos, tais como fluídos supercríticos (especialmente CO_{2sup}) e líquidos iônicos.

Os fluídos supercríticos são solventes alternativos com propriedades únicas: eles têm difusividades e compressibilidades similares a gases, baixa viscosidade, elevada difusividade e condutividade térmica, e suas densidades são similares a de líquidos, conjugando um bom poder de solvatação e transferência de calor, próprios dos líquidos, com uma transferência de massa mais eficaz, normalmente aliada aos gases (Kendall et al, 1999). Todas essas propriedades podem ser ajustadas por pequenas variações de pressão ou temperatura, ou pela adição de agentes modificadores (co-solventes, por exemplo).

Solventes alternativos aos compostos orgânicos voláteis (COV), líquidos iônicos são promissores devido à toxicidade e reatividade que os COV apresentam. Além de apresentarem baixa pressão de vapor, esses solventes verdes apresentam alta estabilidade térmica (decompõem a temperaturas que variam de 150 a 450°C), relativo baixo custo e excelente capacidade solubilizante (Dupont; Consorti; Spencer, 2000; Welton, 1999), que os tornam excelentes alternativas para utilização em reações químicas e bioquímicas em temperaturas elevadas. LI são considerados eletrólitos ideais para utilização em baterias, capacitores e biossensores devido a sua alta condutividade e larga janela eletroquímica. Por exemplo, nujol e parafina são os componentes de ligação mais comuns utilizados em eletrodos de pasta de carbono. Recentemente, estes agentes ligantes têm sido totalmente ou parcialmente substituídos por LI, indicando que eles oferecem uma alternativa eficiente e atrativa, devido à sensibilidade que conferem os eletrodos (Hagiwara; Ito, 2000; Franzoi; Vieira; Dupont 2010). Apesar de líquidos iônicos terem simplesmente sido utilizados como alternativa para solventes orgânicos, estes solventes se apresentam, muitas vezes, mais eficientes que os últimos (Park; Kazlauskas, 2003).

Lípases, que são conhecidas pela elevada tolerância em solventes orgânicos, foram candidatas ideais para o estudo de biocatálise em líquidos iônicos (Hernández-Fernández et. al., 2010). O grupo de Sheldon (Lau et al., 2000) foi o primeiro a apresentar síntese de ésteres em líquidos iônicos: lípase de *Candida Antarctica* foi utilizada em reações de alcoólises e aminólises usando BMIM·BF₄ e BMIM·PF₆ como meio reacional e as eficiências das reações foram comparáveis ou até melhores que aquelas ocorridas em solventes orgânicos.

O sistema bifásico LI/CO_{2sup}, também pode apresentar vantagens adicionais em relação a meios monofásicos: CO_{2sup} tem alta difusividade que resulta no

decréscimo da viscosidade dos LI e maior transferência de massa; aumento da seletividade; alta estabilidade da enzima em comparação com solvente contendo $\text{CO}_{2\text{sup}}$. Líquidos iônicos não são solúveis em $\text{CO}_{2\text{sup}}$, enquanto $\text{CO}_{2\text{sup}}$ são solúveis em LI, isso permite a extração de produtos hidrofóbicos pelo $\text{CO}_{2\text{sup}}$ sem contaminação pelo LI (Hernández-Fernández et. al., 2010).

1.3.1. Líquidos iônicos: solventes alternativos para reações enzimáticas

Diversas publicações buscam correlação entre as propriedades dos LI e suas aplicações em processos biotecnológicos, sendo esses solventes considerados solventes ou co-solventes convenientes para reações enzimáticas e estocagem de enzimas (Yang, 2005; van Rantwijk, Sheldon 2007; Roosen et al, 2008; Moniruzzamana, 2010; Muginova et al., 2010).

Como apresentado na Figura 1.5, lipases são as mais empregadas em processos biocatalíticos utilizando líquidos iônicos (Muginova, 2010). A síntese de ésteres é preferencialmente realizada em solventes anidros com o objetivo de impedir reações hidrolíticas secundárias indesejáveis. Lipases são largamente utilizadas em síntese orgânica em reações de transesterificação (alcoólises) e aminoólises, e são normalmente realizadas em solventes não aquosos para evitar processos hidrolíticos paralelos indesejáveis. Em LI, lipases catalisam reações de transesterificação mais eficientemente que em *tert*-butanol, dioxano e tolueno. Lipase de *Candida antarctica* foi dez vezes mais ativa em tetrafluorborato de 1-butil-3 metilimidazólio e bis(trifluormetanossulfonato) de 1-butil-3 metilimidazólio que em éter diisopropílico (Lau et al., 2000). Entretanto essa tolerância de lipases não é universal. Nos líquidos iônicos hidrofílicos nitrato de 1-butil-3 metilimidazólio, acetato de 1-butil-3 metilimidazólio e nitrato de etilamônio a catálise não ocorre (Muginova, 2010).

Uma característica particular dos LI é observada com relação a suas propriedades de solvatação, não somente para compostos hidrofóbicos como também para compostos hidrofílicos, como carboidratos. Park e Kazlauskas (2001) obtiveram um rendimento de 99% com 93% de seletividade na acilação regioseletiva da glicose em $\text{MOEMIM} \cdot \text{BF}_4$ ($\text{MOE} = \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2$), sendo esses valores muito

maiores daqueles obtidos em solventes orgânicos geralmente utilizados com esse propósito.

Além de lipases, outras enzimas apresentam elevada atividade, estabilidade e muitas vezes régio e enantioseletividades em LI, como por exemplo, hidrolases (van Rantwijk; Sheldon, 2007).

Figura 1.5. Dados estatísticos de enzimas utilizadas em LI (1) lipases, (2) glicosidases, (3) esterases, (4) fosfatases, (5) outras hidrolases, (6) citocromo c oxidase, (7) peroxidases, (8) desidrogenases, (9) glicose oxidases, (10) lacases (11) outras oxirredutases, (12) outras proteínas e (13) leveduras (Muginova et al. 2010).

1.3.1.1. Lacases em líquidos iônicos

As lacases ocorrem em todos os domínios dos seres vivos e são expressas pela maioria das espécies de fungos (Morozova et al, 2010). Entre outros fatores, a grande quantidade de compostos potencialmente oxidáveis pela lacase faz com que a enzima possua grande potencial em aplicações biotecnológicas. São capazes de oxidar, na presença e ausência de mediadores, uma grande variedade de compostos xenobióticos, alguns desses recalcitrantes, com elevado potencial redox, incluindo compostos fenólicos clorados, pesticidas e compostos policíclicos aromáticos (Call; Mücke, 1997; Baldrian, 2006; Gianfreda, 2006). A aplicação da lacase é extensa e abrange diferentes áreas: processos de deslignificação

(Camarero; Ibarra; Martínez, 2010); produção de etanol (Jurado et al., 2009); clareamento de corantes (Cristóvão, 2009), construção de biossensores (Freire; Duran; Kubota, 2001; Freire; Duran; Kubota, 2002; Oliveira; Fatibello, 2009); remediação de solos e águas contaminadas (principalmente efluentes nas indústrias de papel, têxteis e petroquímica) (Chakroun et al., 2010; Wesenberg; Kyriakides; Agathos, 2003; Majeau; Brar; Tyagi, 2010), indústria alimentos (ex.: clarificação de vinhos); síntese de produtos químicos e medicinais (Couto; Herrera, 2006).

Muitas lacases são enzimas extracelulares, o que facilita a purificação da enzima e faz com que tenham como característica uma considerável estabilidade no ambiente extracelular (Blaich; Esser, 1975). Além disso, ao contrário de algumas peroxidases, não depende de síntese ou adição de co-substratos de baixo peso molecular como o peróxido de hidrogênio, porque utiliza oxigênio como co-substrato (Baldrian, 2006).

Existem poucos dados bibliográficos sobre reações enzimáticas utilizando lacases em líquidos iônicos (Hinckley et al., 2002; Zhou et al., 2008; Tavares; Rodriguez; Macedo, 2008; Shipovskov et al., 2008). Os resultados obtidos são diversos quanto à ativação e inibição da lacase nesses solventes, sendo que, algumas publicações demonstraram que esses solventes possuem bom potencial como co-solventes em reações envolvendo essa oxirredutase (Tavares; Rodriguez; Macedo, 2008; Shipovskov et al., 2008).

Mozhaev e colaboradores (Hinckley et al., 2002) estudaram a reação de oxidação do substrato siringaldazina catalisada pela lacase de *Trametes spp* em solução tampão citrato-fosfato e na presença de 10-75% (v/v) de tetrafluorborato de 4-metil-N-butilpiridina (MBP·BF₄). Um decréscimo na atividade enzimática foi observado com aumento da concentração do líquido iônico. O decréscimo da atividade inicial foi resultado da diminuição da V_{max} e aumento de K_m (constante michaeliana). O mesmo grupo utilizou meios reacionais contendo 20% (v/v) de MBP·BF₄ e 20% (v/v) tert-butanol em reações de oxidação do substrato antraceno catalisadas pela lacase na presença de diferentes mediadores. A porcentagem de conversão do substrato foi relativamente maior em meio contendo líquido iônico quando comparado ao meio contendo solvente orgânico (Hinckley et al., 2002).

Já o grupo de Tavares, Rodriguez e Macedo (2008) observou que a lacase mostrou pequena perda da sua atividade em meios contendo 10-75% (v/v) de metanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (EMIM·MeSO₃) e 1-etil-3-metilimidazólio etilsulfato (EMIM·ETSO₄). Por outro lado, os autores observaram que a lacase teve uma redução de somente 10% em sua atividade, mesmo depois de 7 dias de incubação, em 1-etil-3-metil-2-(2-metoxietoxi)etilsulfato. Em outro estudo realizado pelo grupo de Stephens (Shipovskov et al., 2008), constatou-se que o desempenho das lacases em LI pode não ser igual para enzimas de diferentes origens. A velocidade inicial da reação de oxidação do catecol, catalisada pela lacase do fungo *Agaricus bisporus* em 10% (v/v) de tetrafluorborato de 1-etil-3-metilimidazólio (em tampão fosfato), foi maior que a obtida em tampão. Ao contrário, a lacase do fungo *Trametes versicolor* foi inibida mesmo em baixas concentrações desse líquido iônico.

A lacase do fungo *T. versicolor* apresentou maior atividade em microemulsão de H₂O em hexafluorfosfato de 1-butil-3-metilimidazólio, formada com o uso do surfactante não iônico Triton X-100, do que em IL puro ou água saturada com hexafluorfosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (Zhou et al., 2008).

Novos biossensores contendo lacase e líquidos iônicos para determinação de compostos orgânicos têm alta sensibilidade, boa reprodutibilidade, resposta rápida e boa estabilidade térmica (Franzoi et al, 2009a; Franzoi et al, 2009b; Franzoi; Vieira; Dupont, 2010). O grupo de Vieira (Franzoi et. al., 2009a) obteve sucesso quando LI hidrofóbicos formados por bis(trifluorometanosulfonil)amida e cátions 1,3-aquilimidazólios foram utilizados como ligantes na construção de biossensores para determinação de Rutina. O autor ressaltou que o método utilizado na construção do biossensor é simples e rápido, apresenta baixo custo e a resposta é satisfatória quando comparada ao método tradicional. O mesmo grupo também obteve êxito ao utilizar hexafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio ou hexafluorfosfato de 1-butil-3-metilimidazólio como agentes aglutinantes em biossensores para determinação de ácido rosmarínico (Franzoi et. al., 2009b).

Os líquidos iônicos podem ser considerados como potenciais substitutos aos solventes orgânicos em reações envolvendo a enzima lacase. Devido ao grande número de LI disponíveis com propriedades peculiares e a grande diversidade das

lacases, com diferentes características, outros estudos podem ser valiosos para se verificar a aplicabilidade dessas enzimas nesses solventes.

1.4. Importância da natureza do líquido iônico em reações enzimáticas

A ativação e inibição de enzimas em líquidos iônicos podem resultar de numerosas e complexas interações entre os diferentes componentes do sistema (enzima, LI, água, substrato e o sistema tampão). Contudo, os fatores mais utilizados para explicar o comportamento de enzimas em líquidos iônicos são suas propriedades físico-químicas (como polaridade, viscosidade e hidrofobicidade) e as interações dos íons com a água e as biomoléculas.

1.4.1. Composição dos líquidos iônicos e impurezas

Impurezas como água, haletos e sais orgânicos e inorgânicos podem alterar drasticamente o comportamento enzimático (van Rantwijk; Sheldon, 2007). O excesso de cloreto, por exemplo, foi causa de severa desativação de lipases (Lee et al. 2006). Alguns LI contaminados com água podem hidrolisar proporcionando uma drástica alteração do pH, inativando a enzima. Em alguns casos, uma simples correção do pH ou aumento da concentração do tampão pode resolver o problema. Outra causa de inibição enzimática pode ser consequência da habilidade de alguns componentes dos LI complexarem com os íons metálicos presentes no sítio ativo de algumas enzimas como o cobalto, o manganês e o cobre (Wasserscheid; Welton, 2002).

1.4.2. Propriedades físico-químicas: polaridade, hidrofobicidade e viscosidade

A polaridade dos LI pode afetar a estabilidade e seletividade da enzima. Em geral, solventes polares aumentam a solubilidade de substratos polares proporcionando reações mais rápidas. Em alguns casos, a polaridade não está

relacionada com a taxa de reação, mas sim pela mudança da viscosidade. Por exemplo, um líquido iônico com cadeia alquílica curta possui menor viscosidade e é mais polar. A viscosidade em LI imidazólico geralmente aumenta com o aumento da cadeia alquil do cátion imidazol para um mesmo grupo de ânions em função da forte interação de van der Waals. O aumento da cadeia alquílica também provoca uma leve diminuição da polaridade. Com aumento da viscosidade, a velocidade da reação diminui, pois há uma diminuição da transferência de massa (Mann; McLuskey; Atkin, 2009; Moniruzzamana, 2010).

Em solventes orgânicos, o logaritmo do coeficiente de partição de um solvente em mistura octanol/água, o termo $\log P$, é utilizado para relacionar a atividade enzimática com a hidrofobicidade. Sugere-se que solventes como hexano ($\log P = 3,5$), mais hidrofóbicos, são mais favoráveis para reações enzimáticas do que solventes com baixos valores de $\log P$ como etanol ($\log P = -0,24$), existindo algumas exceções (Yang; Pan, 2005). A primeira determinação de $\log P$ para LI foi realizada para derivados de dialquilimidazólios (Kaar et al., 2003). Os valores de $\log P$ encontrados foram extremamente baixos ($-2,90$ a $-2,39$), o que sugere que os LI são intrinsicamente altamente hidrofílicos, portanto, deveriam inativar as enzimas, o que não é verdade. O líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio, por exemplo, possui $\log P$ igual a $-2,3$, entretanto é hidrofóbico. Lipase de *Candida rugosa* é inativa nos líquidos iônicos miscíveis com água nitrato de 1-butil-3-metilimidazólio e acetato de 1-butil-3-metilimidazólio com $\log P$ igual a $-2,77$ e $-2,90$, respectivamente, mas é ativa no líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (Kaar et al., 2003).

1.4.3. Proteínas, sais e água

A proteína nativa é mantida por um balanço de forças que incluem entre outras, ligações dissulfetos covalentes (S-S), interações coulombianas entre íons (dependem do grau de protonação dos grupos), ligação de hidrogênio, interação de van der Waals e interações hidrofóbicas. Quando essas interações são perdidas a proteína desdobra.

A formação de aglomerados apolares no interior de uma proteína (enovelamento), que resulta na sua estrutura nativa, é conduzida principalmente por interações hidrofóbicas. Essas interações diminuem a tendência ao desdobramento protéico, tornando a molécula menos flexível e menos expostas a degradação por altas temperaturas (Egorova; Antranikian, 2005). Quando resíduos hidrofóbicos, que normalmente ficam no interior da molécula nativa, são expostos ao solvente, em consequência do desdobramento, grupos reativos também são expostos, acarretando modificações químicas irreversíveis como, por exemplo a desamidação da Asparagina (Asn) e da Glutamina (Gln), oxidação da Metionina (Met) ao seu sulfóxido, racemização de resíduos Asp, mudança da Serina (Ser) para sua forma D, reação da Lisina (Lys) com açúcar redutor (reação de Maillard) e autólise de proteases decorrentes de alterações das dobras da estrutura secundária, o desordenamento monomolecular e agregação. Esses agregados precipitam caracterizando a enzima desnaturada. Proteínas são relativamente sensíveis a desnaturação térmica e química. Embora a razão para a baixa estabilidade das proteínas ainda não seja bem conhecida, sabe-se que a resposta reside em um equilíbrio delicado de todas as interações intra e intermoleculares que permitem a uma proteína dobrar para sua conformação ativa (Atkins, 2008; Lima; Angnes, 1999; Gomes et al., 2007). Dentre os fatores que afetam a estabilidade e cinética das proteínas, têm-se o pH, detergentes, agentes caotrópicos e calor. O principal fator que promove modificações da proteína para sua adaptação, dentro do contexto biológico, é o calor. A termoestabilidade de uma enzima refere-se tanto à termoestabilidade dinâmica quanto à estabilidade cinética. A termoestabilidade dinâmica (T_m) representa 50% da enzima desdobrada e a termoestabilidade cinética reflete a meia vida ($T_{1/2}$) da enzima em determinada temperatura. Essa termoestabilidade está diretamente relacionada a um equilíbrio entre forças de dobramento e de desdobramento (energia de estabilização da enzima ΔG_{stab}) (Gomes et al., 2007).

Líquidos iônicos que dissolvem completamente em água dão origem a cátions e ânions livres em água como qualquer outra solução salina. Em geral, íons interagem fortemente com água de acordo com a natureza e concentração. O íon pode afetar o desempenho da enzima de diversas maneiras, tais como; agir como substrato, um cofator ou inibidor para a enzima. Entretanto, o efeito do íon pode ser

entendido melhor quando considerada a sua habilidade em alterar a estrutura da água, afetando a interação proteína-água, e interagir diretamente com a enzima.

Em baixas concentrações de sais (abaixo de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$), a atividade enzimática é afetada principalmente pela interação eletrostática. Com o aumento da concentração, o efeito do íon da série de Hofmeister torna-se importante (Lima, 2008).

A solubilidade de proteínas é uma função bastante sensível a concentração de sais dissolvidos no meio. No entanto, a solubilidade, numa determinada força iônica, varia com o tipo de íons presentes em solução. Esta especificidade iônica é atribuída aos efeitos de Hofmeister (Lima, 2008). O aumento da solubilidade de uma macromolécula biológica a baixa concentração salina é chamada “*salting in*”. A fonte mais importante da estabilidade cinética dos colóides é a carga elétrica na superfície das partículas. Graças a essa carga, os íons com carga de sinais opostos tendem a se agrupar em torno dela e forma-se uma atmosfera iônica (dupla camada elétrica). O papel protetor da dupla camada é a razão da importância de não se removerem todos os íons quando um colóide é purificado por diálise. Na ausência de íons as macromoléculas precipitam porque predominam as interações atrativas entre elas. Já em altas concentrações de sal, a solubilidade de proteínas, assim como da maioria das substâncias, diminui com o aumento da força iônica do meio, efeito conhecido como “*salting out*”. Esse efeito ocorre em princípio devido à solvatação dos íons por moléculas do solvente, o que leva a diminuição da concentração efetiva de água na camada de solvatação da proteína. Neste caso, a solubilidade da proteína é governada principalmente por efeitos hidrofóbicos (Atikns, 2008; Lima, 2008).

1.4.3.1. Efeito da concentração de íons: teoria DLVO e o efeito de Hofmeister

Proteínas estão dentre os sistemas coloidais mais pesquisados. A caracterização dos sistemas coloidais passa pela descrição das forças intermoleculares entre as macro-partículas em solução. Estas interações chamadas não covalentes ou intermoleculares são interações físicas. As energias envolvidas

em tais tipos de interações são muito menores que aquelas envolvidas em processos reativos (Lima, 2008).

A teoria conhecida como DLVO (Drjaguin, Laundau, Verwey e Overbeek), que foi desenvolvida por B. Drjaguin e L. Laundau, e independentemente por E. Verwey e J.T. Overbeek, forneceu à ciência dos colóides e de superfície os fundamentos de um modelo quantitativo para as interações entre macro-partículas (Atkins, 2008). No modelo teórico, admiti-se que há equilíbrio entre as interações repulsivas das cargas das duplas camadas elétricas sobre as partículas vizinhas e a interação atrativa da força de van der Waals entre as moléculas nas partículas (Atkins, 2008). As interações coulombianas da dupla camada têm origem nas interações elétricas das partículas carregadas. A força destas interações é diretamente proporcional à carga e inversamente proporcional ao quadrado da distância que as separa. A força de van der Waals tem origem nas interações elétricas das partículas, que atuam em todas as partículas, estejam elas carregadas ou não, enquanto as interações coulombianas atuam apenas em partículas formalmente carregadas (Lima, 2008).

Diferentemente das interações coulombianas, o potencial de interação de van der Waals é altamente insensível a variações na concentração de eletrólitos e pH do meio, podendo ser considerado constante a uma dada distância, em primeira aproximação. Além disso, essas interações tendem a predominar a pequenas distâncias, pois se trata de uma lei de potências ($W \propto 1/r^n$), enquanto as interações de dupla camada permanecem finitas quando a distância tende a zero (Israelachvili, 1992).

A dupla camada elétrica é formada por duas regiões distintas e seu papel primário é conferir estabilidade cinética aos colóides. A primeira camada é formada por íons quase imóveis que aderem firmemente à partícula coloidal e que pode incluir moléculas de água (nos meios aquosos). A segunda região é formada por íons móveis de carga oposta atraídos pela unidade carregada e com sinal da carga oposto. O papel protetor da dupla camada é a razão da fácil coagulação das proteínas nos respectivos pontos isoelétricos (Atkins, 2008).

As cargas das partículas dispersas em sistemas coloidais têm origem na formação de uma dupla camada de íons em sua superfície, devido à adsorção seletiva de um dos íons do eletrólito ou devido à ionização de suas moléculas

superficiais. As proteínas adquirem carga elétrica principalmente por ionização dos grupos carboxila e amina, resultando nos íons COO^- e NH_3^+ (Lima, 2008).

A carga superficial em partículas coloidais pode ser adquirida por meio da adsorção de íons. Superfícies em contato com meio aquoso têm maior tendência a se tornarem negativamente carregadas. Isso porque os cátions geralmente estão mais hidratados que os ânions e assim tendem a continuar no seio da fase, enquanto os ânions, menos hidratados e mais polarizáveis, têm uma maior tendência em serem adsorvidos na superfície. Superfícies que estejam previamente carregadas (por ionização, por exemplo) normalmente mostram uma tendência preferencial em adsorver contra-íons, quando as interações eletrostáticas predominam. É possível que a adsorção desses contra-íons cause uma inversão da carga superficial (Lima, 2008).

A teoria DLVO é insuficiente para descrever a especificidade iônica comumente observada experimentalmente. No entanto, efeitos de especificidade iônica encontram-se disseminados por diversos campos da ciência como biologia, bioquímica, química e engenharia química. O fato da atividade enzimática em soluções salinas seguir uma determinada série foi observado 40 anos atrás (Warren; Stowring; Morales; 1966). O primeiro pesquisador a estudar, sistematicamente, este efeito foi Hofmeister em 1887, que observou a habilidade de interação dos íons com o meio e formulou uma série de íons conhecida como série liotrópica ou série de Hofmeister a qual classifica qualitativamente o efeito dos íons sobre a precipitação de proteínas (Kunz; Henle; Ninham, 2004).

A série que classifica os íons de acordo com seus efeitos sobre macromoléculas em solução aquosa ainda não é claramente entendida, mas é considerada sua habilidade em alterar a estrutura da água, afetar a interação enzima-água e interagir diretamente com a proteína (Yang, 2009).

Estudos revelaram que o efeito de íons na atividade e estabilidade enzimática segue a série de Hofmeister e que a solução enzimática é normalmente estabilizada por ânions cosmotrópicos e cátions caotrópicos, mas desestabilizada por ânion caotrópico e cátion cosmotrópicos (Zhao, 2005; Yang, 2009). Ânions e cátions cosmotrópicos são formadores da estrutura da água (“water structure-makers”), fortemente hidratados, possuem uma forte interação com as moléculas de água.

Esses íons proporcionam uma camada de hidratação muito bem estruturada e coesa e levam ao efeito cujo termo em inglês é “salting-out”, ou seja, solubilizam proteínas. Por outro lado, os caotrópicos são “quebradores de estruturas da água”, desestabilizam e precipitam proteínas (“salting-in”). A estabilização pelo ânion cosmotrópico pode ser ilustrada, portanto, pela hidratação preferencial (van Rantwijk; Sheldon, 2007; Swatloski; Holbrey; Rogers 2003).

A posição de um íon na série de Hofmeister é determinada essencialmente pelo seu grau de hidratação. A ordem típica da série e algumas propriedades é apresentada na Figura 1.6. As espécies à esquerda do ânion Cl^- são chamadas de cosmotrópicos, enquanto que as da direita são chamadas de caotrópicos (Yang, 2009).

Figura 1.6. A série de Hofmeister que classifica os íons como cosmotrópicos e caotrópicos (Yang, 2009).

Devido à forte interação com a água, um ânion cosmotrópico igual ao SO_4^{2-} compete eficientemente com moléculas de água inicialmente associadas com superfície da enzima. Isto leva a enzima a minimizar a área da enzima exposta ao solvente favorecendo o estado compacto da enzima devido ao efeito hidrofóbico. Ao contrário do cosmotrópico, um ânion caotrópico como SCN^- possui baixa afinidade pela água e alta polarizabilidade, preferindo assim ligar-se à interface água-proteína, desestabilizando a estrutura proteica (Collins; Neilson; Enderby, 2007). Cátions possuem um efeito relativamente menos dominante que ânions com mesma densidade de carga, pois, os últimos são mais polarizáveis e mais fortemente hidratados (Combariza; Kestner; Jortner, 1994; Grossfield; Ren; Ponder, 2003). Cátions parecem agir indiretamente através da interação com o ânion. O efeito

cosmotrópico de ânions é menos pronunciado na presença de cátions cosmotrópicos, pois, os últimos possuem menor tendência em formar pares iônicos com ânions do que os cátions caotrópicos (Eggers; Valentine, 2001).

O parâmetro físico-químico mais utilizado para descrição quantitativa da série de Hofmeister é o coeficiente de viscosidade β . Além do coeficiente β de viscosidade, Zhao (2006) utilizou outros parâmetros termodinâmicos como entropia estrutural e mobilidade iônica para avaliar a propriedade cosmotrópica de LI.

Contudo, a especificidade atribuída a capacidade iônica em alterar estrutura da água é questionada (Zhang; Cremer 2006). As primeiras tentativas em explicar a especificidade de íons fizeram referência a sua habilidade em realizar ou quebrar ligações de hidrogênio, levando em conta somente forças de hidratação e eletrostática. Uma das maiores aproximações na teoria DLVO é o uso da equação de Poisson-Boltzmann para descrever a interação eletrostática. Este método trata os íons como cargas pontuais, e, portanto, perdem a especificidade, podendo ser utilizada somente em baixas concentrações de sal ($\sim 0,01 \text{ mol L}^{-1}$) (Zhang; Cremer 2006). Uma última aproximação considera a polarizabilidade do íon em solução, porque próximo a interface do íon existe não só um potencial eletrostático, mas também um alto potencial de dispersão iônica. Em altas concentrações de sais a polarizabilidade é determinante na especificidade dos íons (Collins, 1997; Bostrom; Williams; Stewart, 2003; Bostrom; Williams; Ninham, 2004). Portanto, os potenciais de hidratação e a polarizabilidade dos íons – também incluída nos potenciais iônicos – são apontados como as principais fontes de efeitos de especificidade iônica (efeitos de Hofmeister) (Lima, 2008).

Íons podem afetar a enzima não só pela modificação do meio ao redor das moléculas enzimáticas, mas, por interagir diretamente com a enzima. Uma proteína dissolvida em solução aquosa tem muitas superfícies hidrofílicas e polares, grupos carregados, responsáveis pela hidratação e interação com íons em solução. Aminas e amidas, que são consideradas caotrópicas e grupos carboxílicos cosmotrópicos por exemplo, interagem diretamente com os íons da série de Hofmeister (SedláK et al., 2008).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi verificar o comportamento das enzimas lacases dos fungos *Coriolus hirsutus* e *Trametes versicolor* em meios contendo líquidos iônicos como co-solventes.

As metas específicas deste trabalho foram:

- Sintetizar parte dos líquidos iônicos que foram utilizados nas reações enzimáticas.
- Empregar um planejamento estatístico para obter condições reacionais, de pH e temperatura, em que a lacase apresente maior atividade enzimática.
- Medir a atividade inicial das lacases dos fungos *Coriolus hirsutus* e *Trametes versicolor* em diferentes concentrações de líquidos iônicos.
- Obter parâmetros cinéticos de afinidade enzimática (K_m) e eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) da lacase do fungo *T. versicolor* em metanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio e metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio.
- Verificar a estabilidade da lacase do fungo *T. versicolor* em líquidos iônicos formados por ânions metanossulfonato e metilsulfato.
- Obter a temperatura de desnaturação térmica da lacase do fungo *T. versicolor* em líquidos iônicos formados por metanossulfonato, ânion cosmotrópico, e cátions de diferentes propriedades liotrópicas.

3. METODOLOGIA

3.1. Reagentes

Lacase de *Trametes versicolor* (Fluka) e lacase de *Coriolus hirsutus* 1,82 mg de proteína por mL em tampão Na_2HPO_4 0,2 mol L^{-1} pH 6,84 (SunectiQ Corporation).

Catecol (Sigma) foi purificado previamente por recristalização em tolueno e sublimação. Metilimidazol (Aldrich) foi destilado a pressão reduzida (Armarego; Perrin, 1996). 1-etil-3-metilimidazol metilsulfato foi purificado utilizando coluna de sílica. Os demais reagentes foram utilizados como recebido: cloreto de metanossulfonila (Fluka, e98); tetrafluorborato de Sódio (Aldrich, 98%); n-butanol (Vetec, PA); 1-butil-3-metilimidazólio metilsulfato (Aldrich, 97%), brometo de 1-butil-3-metilimidazólio (sigma, $\geq 98.5\%$); cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (Iolitec, 99%); cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio (Iolitec, 98%); cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio (Iolitec, 99%); metanossulfonato de tetrabutylamônio (Sigma, $\geq 97\%$); metanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio; etanol 95% (Vetec, PA); oxigênio medicinal (99,5%); siringaldazina (Aldrich); 2,6 dimetoxifenol; (Sigma) sulfato de amônio (Vetec, PA-ACS); carbonato de sódio anidro (Vetec, PA), pentóxido de difósforo (Aldrich, PA), diclorometano.

Os substratos foram caracterizados por ^1H e ^{13}C -RMN. O solventes deuterados CDCl_3 (0,05% TMS, Cambridge Isotope Laboratories) e $\text{DMSO}-d^6$ também foram usados como recebidos nas análises de RMN.

3.2. Solventes

As soluções tampão foram preparadas utilizando ácido cítrico (Vetec, PA), citrato de sódio (Vetec, PA), fosfato de sódio anidro (Vetec, PA), ácido acético (Vetec; PA) e acetato de sódio (Synth; PA ACS). Os valores de pH foram corrigidos utilizando solução de ácido clorídrico 1 mol L^{-1} , preparadas a partir de ácido

clorídrico concentrado (Merck, 37%). A acetona (Vetec, PA) foi seca com sulfato de cálcio. Trietilamina foi purificada por destilação.

Toda a água utilizada nos experimentos foi purificada pelos sistemas de osmose reversa e eletrodeionização Elix 10 e de ultrapurificação Milli-Q Gradient; ambos da Millipore.

Os demais solventes foram utilizados como recebidos.

3.3. Equipamentos

Para as medidas de pH foi utilizado o pHmêtro da marca Marccone (modelo PA 200), o qual utiliza um eletrodo de vidro combinado (modelo 1880/405). Espectrofotômetro UV-Vis Hitachi U-2010, munido de banho termostatizador e agitador magnético para cubeta foi utilizado nos ensaios enzimáticos. Thermomixer Comfort Eppendorf AG foi utilizado para incubar as enzimas.

Espectros de FT-IR foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu IR Prestige -21. Para os espectros de FT-IR obtidos, foram reportadas as principais absorções, sempre em cm^{-1} . As atribuições foram baseadas na literatura (Socrates, 2001). Os espectros de ^1H e ^{13}C -RMN foram registrados no espectrômetro Varian Gemini 200, operando a 200 MHz para ^1H e a 50 MHz para ^{13}C , a temperatura ambiente. Foram usadas, sempre que possível, concentrações da ordem de 10 mg de analito para 0,7 mL de solvente deuterado contendo 0,05% de TMS como padrão interno. Foram utilizados os tubos Wilmad 735PP, de 5 mm de diâmetro, para todas as amostras. As atribuições dos espectros foram baseadas em valores encontrados na literatura e foram feitas com o software MestReC, versão 4.8.11. Para facilitar a atribuição, os átomos de hidrogênio foram indicados com números.

Tensiômetro Fisher Scientific-SurfacenTensiomat 21; Banho (RMG Lauda Brinkmann); Microcalorímetro VP-ITC (Microcal LCC, Northampton, MA) foram utilizados para determinar a concentração micelar crítica.

Para medidas de calorimetria diferencial isotérmica foi utilizado DSC Q10 V9.9 Build 303 (Universal V4.5A TA).

3.4. Líquidos iônicos utilizados nos testes enzimáticos: preparo e caracterização

Metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio, tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazol, metanossulfonato de 1-butil-metilpiperidina foram preparados através do método descrito pelo grupo de Dupont (Cassol et al, 2006). Os produtos foram caracterizados por ^1H RMN, ^{13}C RMN e análise elementar. Os LI BMIM- BF_4 e BMIM- MeSO_3 foram caracterizados também por FT-IR.

3.4.1. Preparo de metanossulfonato de butila

Cloreto de metanossulfonila (38 mL; 0,5 mol) foi adicionado lentamente (aproximadamente 45 minutos), com vigorosa agitação, a uma solução de n-butanol (37 mL; 0,5 mol) e trietilamina (EtN_3 ; 50,3 mL; 0,5 mol) em 470 mL de diclorometano (DCM). Depois da adição do $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ a reação foi mantida sob agitação por mais 3 horas a temperatura ambiente (3.1). O produto cloreto de trietilamonio foi extraído com 100 mL de água destilada. A camada orgânica foi novamente lavada com 70 mL de água destilada e seca com carbonato de sódio. A solução foi rotoevaporada para retirada solvente. O produto foi então destilado a pressão reduzida.

3.4.1.2. Preparo de metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio

Primeiramente 1-metilimidazol foi destilado a pressão reduzida para ser utilizado. Metanossulfonato de butila (42,41 g; 0,3 mol) foi misturado com 1-

metilimidazol (22,77g; 0,3 mol) e manteve-se a reação a temperatura ambiente sob agitação por 4 dias (3.2). O produto permaneceu no freezer a -18°C por 24 horas. Após esse procedimento foi recristalizado duas vezes em acetona. Foram obtidos cristais brancos higroscópicos que foram mantidos sob pressão reduzida.

3.4.1.3. Preparo de tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio

Manteve-se sob agitação por 30 minutos uma mistura de metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio (26,18 g; 0,1 mol), tetrafluorborato de sódio (13,57g; 0,12 mol) e água destilada (26 mL) (3.3). A camada aquosa foi separada e descartada. Foi adicionado tetrafluorborato de sódio (0,96 g; 8,7 mmol) e água destilada (5 mL). Depois de mantida a agitação por mais 15 minutos adicionou-se 64 mL de diclorometano. A fase orgânica foi separada, seca com carbonato de sódio e purificada utilizando uma coluna básica de alumina (3 cm). O solvente foi separado por rotoevaporação. Obteve-se um líquido incolor que foi caracterizado por ^1H e ^{13}C -RMN, FT-IR e análise elementar.

3.4.1.4. Preparo de metanossulfonato de butila (22 g; 0,15 mol) com 1-metilpiperidina

Misturou-se metanossulfonato de butila (22 g; 0,15 mol) com 1-metilpiperidina (15 g; 0,15mol) (3.4) e manteve-se a reação a temperatura ambiente sob agitação por 72 horas. O produto foi recristalizado duas vezes em acetona e mantidos em dessecador sob pressão reduzida, utilizando P_2O_5 como secante. Foram obtidos cristais brancos que foram caracterizados por 1H e ^{13}C -RMN, e análise elementar.

3.5. Ensaio enzimático utilizando a enzima lacase

Os substratos catecol e 2,6 dimetoxifenol (DMP) foram preparados em solução aquosa na concentração de 0,2 mol L⁻¹, enquanto o substrato 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-benzaldeído (siringaldazina) foi preparado em etanol na concentração de 2,0 mmol L⁻¹. Soluções da lacase do fungo *Trametes versicolor* foram preparadas em água milli-Q (0,5 mg mL⁻¹) (Litthauer, 2007 et al.; Zlateva, et al.1996). As soluções enzimáticas, quando necessário, sofreram sucessivas diluições para se obter melhores curvas cinéticas para os diferentes substratos. As soluções foram mantidas em gelo durante os ensaios. A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, contendo 970 µL da solução utilizada como solvente, foi adicionado 20 µL da solução do substrato e logo em seguida foi adicionado 10 µL da solução da enzima. Logo que a amostra foi adicionada, a absorbância foi monitorada em 400 nm, 470nm e 530nm para o ensaio utilizando siringaldazina (3.5), catecol (3.6) e DMP respectivamente.

A atividade da lacase foi determinada multiplicando-se o valor da inclinação da reta por 1000 (ajuste do volume de L para mL) e pelo fator de diluição de 100 vezes (10 mL de amostra em 1,0 mL) e dividindo-se pelo coeficiente de absorvidade molar do produto da reação ($\epsilon_{\text{siringaldazina}} = 65000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{catecol}} = 1417 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{\text{DMP}} = 49600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), para, finalmente, se obter a atividade em unidade min^{-1} (Leonowicz; Grzywnowicz, 1981). Uma unidade de lacase foi definida como a quantidade necessária de enzima para a formação de 1 mmol de produto (quinona dos substratos) por minuto. A atividade específica para lacase do fungo *Coriolus hirsutus* foi obtida utilizando a quantidade de proteína (mg) contida na amostra e que foi fornecida pelo fabricante. A atividade da enzima lacase do fungo *Trametes versicolor* foi obtida em função da quantidade em mg de enzima pesada. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.5.1. Otimização das condições experimentais da atividade enzimática

As condições experimentais ótimas para lacases dos fungos *Trametes versicolor* e *Coriolus hirsutus* foram obtidas através das medidas de atividade inicial. Para obter condições de máxima atividade enzimática foi realizado um planejamento

experimental 3^2 . Os níveis dos fatores foram: temperatura com um nível inferior de 25 °C (-1), um nível superior de 65 °C (1) e um ponto central de 42 °C (0); e pH com um nível inferior 2.9 (-1), um nível superior 7.0 (1) e um ponto central no valor de 4.7 (0), totalizando 9 experimentos (Tabela 3.1). Foram utilizados os substratos catecol, DMP e siringaldazina e as enzimas lacases dos fungos *T. versicolor* e *C. hirsutus*, totalizando 54 experimentos. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

As medidas da velocidade inicial foram realizadas de acordo com ensaio enzimático descrito no item 3.5. A resposta do planejamento foi atividade por miligrama de proteína (U mg^{-1}) para a enzima do fungo *C. hirsutus*, e para enzima do fungo *T. versicolor* foi utilizada a massa do reagente (U mg^{-1}). Os resultados foram expressos em gráficos de superfície de resposta e tabelas de análises de variância (ANOVA). Os resultados foram analisados utilizando o software Stastistica 8.

Tabela 3.1. Níveis de variáveis em cada experimento (valores codificados).

Experiência	1	2	3	4	5	6	7	8	0
Temperatura	1	1	1	0	0	0	-1	-1	-1
pH	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1

3.5.2. Lacases em solução LI/tampão

3.5.2.1. Atividade enzimática da lacase em diferentes líquidos iônicos

As medidas foram realizadas de acordo com o ensaio enzimático descrito no Item 3.5. Foram utilizados os substratos catecol e siringaldazina. Saturou-se o meio reacional com oxigênio por meio do borbulhamento do gás por 20 minutos. A medida do pH final da reação foi realizada utilizando eletrodo de vidro. As medidas foram realizadas a 25 °C em triplicata.

A atividade da enzima lacase do fungo *Coriolus hirsutus* foi medida em soluções líquido iônico/tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7 em frações molares 0,02,

0,05, 0,1 e 0,4. Foram utilizados metanossulfonato de n-butil-metilpiperidina (BMPPDA·MeSO₃), metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM·MeSO₃) e 1-butil-3-metilimidazólio tetrafluorborato (BMIM·BF₄).

A atividade da enzima lacase do fungo *Trametes versicolor* foi medida em soluções com frações molares de 0,0125 a 0,1 de líquido iônico em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7. Os líquidos iônicos utilizados foram metanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (EMIM·MeSO₃), metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM·MeSO₃), metanossulfonato de tetrabutilamônio (Bu₄N·MeSO₃), 1-etil-3-metilimidazólio metilsulfato (EMIM·MeSO₄), 1-butil-3-metilimidazólio metilsulfato (BMIM·MeSO₄), 1-butil-3-metilimidazólio tetrafluorborato (BMIM·BF₄) e brometo de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM·Br). Os cátions e os ânions utilizados são apresentados na Figura 3.1.

Figura 3.1. Cátions e ânions que formaram os LI utilizados como co-solventes nas medidas de atividade inicial da lacase.

3.5.2.2. Constantes cinéticas das lacases em BMIM·MeSO₃ e EMIM·MeSO₃

A determinação das constantes cinéticas da enzima lacase do fungo *Trametes versicolor* (0,5 µg mL⁻¹), utilizando os substratos siringaldazina e catecol, foram obtidas em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7 e em solução contendo 0,0125 fração molar de metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio em tampão. Foram realizadas as medidas das velocidades iniciais das reações em diferentes concentrações de substrato. A concentração de catecol variou de 0,25 a 12 mmol L⁻¹, quando foi utilizado tampão como solvente; e de 0,04 a 16 mmol L⁻¹, quando foi utilizado o LI/tampão. A concentração de siringaldazina variou de 0,5 a 77 µmol L⁻¹. As constantes michaelianas (K_m) e as constantes catalíticas (K_{cat}) foram obtidas pela linearização da equação da hipérbole retangular de Michaelis-Menten (Equação 3.1) para a velocidade inicial da reação. A equação de Hanes (Equação 3.2) foi utilizada para linearização.

$$V_0 = k_2[E]_0[S]_0/([S]_0 + K_M) = V_{\max} [S]_0/([S]_0 + K_M) \quad (3.1)$$

$$[S]_0/V_0 = [S]_0/V_{\max} + K_M/V_{\max} \quad (3.2)$$

3.5.2.3. Estabilidade enzimática da lacase em solução contendo líquido iônico

A estabilidade da enzima lacase foi verificada em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7 e soluções de diferentes líquido iônico/tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7; em diferentes frações molares: 0,0125; 0,025 e 0,05. Os líquidos iônicos utilizados foram metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM.MeSO₃); metanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (EMIM.MeSO₃); metanossulfonato de tetrabutylamônio (BuN.MeSO₃) e 1-etil-3-metilimidazólio metilsulfato (EMIM.MeSO₄). As medidas foram realizadas no intervalo de 1 minuto a 48 horas, depois da adição da solução aquosa da enzima no solvente. As medidas de velocidade inicial realizadas em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7 foram utilizadas como referência.

3.5.2.4 Estabilidade térmica da enzima lacase em solução LI/tampão

Utilizou-se a técnica de calorimetria diferencial isotérmica (DSC) para obter os valores da estabilidade térmica da enzima lacase do fungo *T. versicolor* em solução tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 4,7 e em soluções contendo frações molares de 0,0125 de BMIM·MeSO₃ e EMIM·MeSO₃ no mesmo tampão. Foram utilizadas de 2,0-2,5 mg mL⁻¹ de enzima. As temperaturas variaram de 25 a 110 °C, com um aquecimento de 1 °C por minuto.

3.5.2.5. Medida da atividade enzimática em líquidos iônicos cloretos de 1-alquil-3-metilimidazólios

A atividade da enzima lacase do fungo *Trametes versicolor* foi medida em soluções que variaram de 5 a 250 mmol L⁻¹ de líquido iônico em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7. Foram utilizados os líquidos iônicos: cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM·Cl), cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio (OMIM·Cl) e cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio (DDMIM·Cl). As medidas foram realizadas de acordo com o ensaio enzimático descrito no item 3.5.

3.5.2.6. Determinação da CMC para os líquidos iônicos

A concentração micelar crítica (CMC) do líquido iônico cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio em solução tampão acetato foi determinada através da medida de tensão superficial, enquanto a CMC do cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio foi determinada por titulação calorimétrica isotérmica (ITC). As medidas foram realizadas a 25 °C. Para medidas de tensão superficial foram avaliadas as concentrações de cloreto de 1-metil-3-octilimidazólio (OMIM·Cl) que variaram de 0,023 a 0,26 mol L⁻¹. A ITC consistiu em injeções sequenciais de volumes fixos de solução 0,2 mol L⁻¹ do (DDMIM·Cl) em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7. A solução tampão foi degaseificada sob vácuo por 10 minutos antes. Na célula foi utilizado volume de tampão igual 1,5 mL. Foram realizadas 30 injeções, sendo a primeira de 1 µL (para eliminar efeitos causados pela difusão do material da seringa para célula) e as demais foram de 5 µL. As injeções duraram 2 segundos com intervalos de 450 segundos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparo e caracterização dos líquidos iônicos

Para a síntese do líquido iônico metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio foi utilizado um protocolo já conhecido (Cassol, 2005). Para obtenção de metanossulfonato de 1-butil-3-metilpiridina foi adotado o mesmo procedimento, sendo o 1-metilimidazol substituído por metilpiperidina.

A reação de n-alquilimidazol com alquilsulfonatos, a temperatura ambiente, fornece alcanossulfonatos de 1,3-dialquilimidazólios como sólidos cristalinos com alto rendimento (Cassol et al., 2006). O rendimento obtido no preparo do BMIM·MeSO₃ foi bom (Tabela 4.1). Quando o metilimidazol foi substituído por metilpiperidina, na reação de alquilação, o rendimento foi 2 vezes menor. No preparo do BMIM·BF₄, metanossulfonato foi substituído por BF₄⁻ pela simples reação do sal (NaBF₄) com BMIM·MeSO₃, que foi realizada em água e a temperatura ambiente. A maioria dos 1,3-alquilimidazólios é preparada através da n-alquilação de n-alquilimidazol empregando-se cloretos de alquila, que é seguida da associação com o haleto. Entretanto, o processo de purificação dos LI obtidos por metátese do ânion é trabalhoso e o Cl⁻ remanescente é dificilmente quantificado (Cassol et al., 2006; Wasserscheid; Welton, 2002). O método utilizado no preparo dos LI BMIM·MeSO₃, BMPPDA·MeSO₃ e BMIM·BF₄ é relativamente simples. Os reagentes foram previamente purificados com o objetivo de garantir um produto com poucos traços de impurezas. Líquidos iônicos geralmente são muito higroscópicos e a água presente no produto final pode dificultar muito o processo de purificação. Por isso, sempre que possível os solventes utilizados foram destilados e secos. Os métodos de purificação utilizados foram extração e cristalização.

Os produtos foram caracterizados por ¹H RMN, ¹³C RMN e análise elementar. Os LI BMIM·BF₄ e BMIM·MeSO₃ foram caracterizados também por FT-IR.

Tabela 4.1. Rendimento obtido e aspecto dos LI preparados.

Produto	Rendimento (%)	Aspecto
BMIM·MeSO ₃	65,2	Cristais brancos
BMIM·BF ₄	32,4	Líquido incolor
BMPPDA·MeSO ₃	33,4	Cristais brancos

Os resultados da análise elementar referente aos líquidos iônicos foram satisfatórios (Tabelas 4.2-4.4). Os desvios calculados para os resultados das análises elementares dos LI preparados foram quase sempre menores que 10%. Esses resultados somados as identificações espectrais realizadas nas análises de ¹H RMN, ¹³C RMN e infravermelho indicam que foram obtidos líquidos iônicos relativamente puros. Os deslocamentos químicos observados nos espectros de ¹³C-RMN e ¹H-RMN são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.2. Análise elementar do BMIM·MeSO₃.

	%C	%H	%N
Teórico	46,1	7,8	12,0
Encontrado	44,2	7,6	11,4
Desvio	4,1	2,6	5,0

Tabela 4.3. Análise elementar do BMIM·BF₄.

	%C	%H	%N
Teórico	42,5	6,7	12,4
Encontrado	40,4	5,8	11,7
Desvio	4,94	13,4	5,6

Tabela 4.4. Análise elementar do BMPPDA·MeSO₃.

	%C	%H	%N
Teórico	53,0	9,2	5,6
Encontrado	43,9	10,2	4,9
Desvio	17,2	10,9	12,5

Tabela 4.5. RMN dos líquidos iônicos metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio e tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio preparados neste trabalho. Análises realizadas a 25 °C em CDCl₃-d¹.

BMIM·MeSO ₃			
¹ H-RMN		¹³ C-RMN	
	δ (ppm) 200 Hz, CDCl ₃ -d ¹		δ da literatura (ppm) ^a , CDCl ₃
1	0,96 (t; J=7,2 Hz; CH ₃)	13,2 (CH ₃)	13,0 (CH ₃)
2	1,36 (sext; 7,2 Hz; CH ₂)	19,3 (CH ₂)	19,0 (CH ₂)
3	1,88 (quint; J= 7,4; CH ₂)	31,9 (CH ₂)	31,7 (CH ₂)
4	2,78 (s; CH ₃ SO ₃)	36,3 (NCH ₃)	35,9 (NCH ₃)
5	4,05 (s; NCH ₃)	39,5 (CH ₃ SO ₃)	39,4 (CH ₃ SO ₃)
6	4,27 (t; J=7,4 Hz; NCH ₂)	49,6 (NCH ₂)	49,2 (NCH ₂)
7	7,3 (d; J=3,6 Hz; C-H imidazol)	121,5 (CH)	121,8 (CH)
8	7,40 (d; J=3,6 Hz; C-H imidazol)	123,1 (CH)	123,5 (CH)
9	9,94 (s; C-H imidazol)	138,3 (N(H)CN)	137,4 (CH)

Continuação: Tabela 4.5. RMN dos líquidos iônicos metanossulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio e tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio preparados neste trabalho. Análises realizadas a 25 °C em CDCl_3-d^1 .

BMIM·BF₄

¹ H-RMN		¹³ C-RMN	
δ (ppm) CDCl ₃ -d ¹ , 200 MHz	δ da literatura (ppm) ^b 300 MHz, acetona-d ₆	δ (ppm) CDCl ₃ -d ¹ , 200 MHz	δ da literatura (ppm) ^b 75 MHz, acetona-d ₆
1 0,97 (t; J=7,2 Hz; CH ₃)	0,92 (t; J=7,4; CH ₃)	13,61 (CH ₂)	13,2 (CH ₂)
2 1,37 (sext; J= 7,2 Hz; CH ₂)	1,36 (sext; J=7,7; CH ₂)	19,67 (CH ₃)	19,4 (CH ₃)
3 1,87 (quint; J= 7,4; CH ₂)	1,90 (quint; J=7,4; CH ₂)	32,30 (CH ₂)	32,2 (CH ₂)
4 3,96 (s; NCH ₃)	4,02 (s; 3H)	36,70 (NCH ₂)	36,0 (NCH ₂)
5 4,19 (t; J=7,4; NCH ₂)	4,33 (t; J= 7,3; NCH ₂)	50,03 (NCH ₃)	49,6 (NCH ₃)
6 7,32 (s; C-H imidazol)	7,70 (s; C-H imidazol)	121,75 (CH)	122,8 (CH)
7 7,43 (s; C-H imidazol)	7,77 (s; C-H imidazol)	123,41 (CH)	124,2 (CH)
8 8,85 (s; C-H imidazol)	9,09 (s; C-H imidazol)	138,85 (N(H)CN)	137,1 (N(H)CN)

^a(Cassol et al., 2008)

^b(Petit et al., 2008)

O espectro de IV do LI BMIM·MeSO₃ apresentou bandas em 2935 cm⁻¹, que caracteriza o estiramento simétrico do ânion metanossulfonato, e em 2960 cm⁻¹, referente ao estiramento assimétrico do ânion metanossulfonato. O espectro também apresentou bandas em 3142 e 3077 cm⁻¹, referente ao estiramento assimétrico e simétrico do anel imidazol, e em 3019 cm⁻¹, referente ao estiramento assimétrico do anel imidazol. O espectro IV referente ao produto BMIM·BF₄ apresentou bandas de estiramento C-H aromático em 3161 cm⁻¹ e 3122 cm⁻¹ e

estiramento alifático em 2870 cm^{-1} . Outras bandas identificadas foram: 2964, 2938 e 2878 cm^{-1} (C-H; 1576 cm^{-1} (C=C) ; 1171 cm^{-1} (C=C) e 1061 cm^{-1} (BF).

4.2. Otimização das condições experimentais da atividade enzimática

Com a finalidade de definir as condições experimentais, nas quais seria avaliado o comportamento das lacase em LI, foram primeiramente otimizadas as condições experimentais em meio aquoso tamponado. As condições de pH e temperatura mais favoráveis para reações catalisadas pelas lacases dos fungos *Trametes versicolor* e *Coriolus hirsutus* foram obtidas através das medidas de atividade inicial. Foi realizado um planejamento fatorial 3^2 que foi analisado estatisticamente utilizando a metodologia de superfície de resposta.

4.2.1. Atividade enzimática das enzimas lacases em meio aquoso

A atividade da enzima lacase dos fungos *Trametes versicolor* e *Coriolus hirsutus* foram medidas em tampão citrato-fosfato em três diferentes valores de pH (4,7; 5,0 e 7,0) e temperaturas ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $65\text{ }^{\circ}\text{C}$). Foram utilizados três substratos: catecol, siringaldazina e 2,6 dimetoxifenol.

As interações entre os fatores pH e temperatura nas reações enzimáticas da enzima lacase do fungo *Trametes versicolor* estão descritas na Tabela 4.6. Em todas as análises realizadas nesta primeira etapa, a significância dos efeitos estimados foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA), considerando 95% de intervalo de confiança. Baixos valores de p indicam um coeficiente muito significativo.

As respostas apresentadas indicam que os fatores pH e temperatura exercem grande efeito na atividade máxima da lacase, enquanto suas interações são menos significativas. Os efeitos que são estatisticamente importantes na atividade são apresentados via diagrama de Pareto na Figura 4.1. A divisória ($p = 0,05$) delimita os efeitos a serem considerados no modelo matemático, sendo que aqueles cujos retângulos estiverem à direita da linha são considerados estatisticamente relevantes.

Tabela 4.6. Teste Anova para atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo *T.versicolor* utilizando como substrato siringaldazina.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
pH	2312	2	1156	98,09	0,000000
Temperatura	119	2	59	5,08	0,015891
pH versus temperatura	2	1	2	0,24	0,631586
Erro	247	21	11		
Soma quadrática total	2682	26

Figura 4.1. Diagrama de Pareto dos Efeitos Estimados Padronizados para atividade (U mg^{-1}) da lacase de *T.versicolor* na oxidação da siringaldazina.

O diagrama de Pareto claramente indica que o fator pH apresenta o efeito mais pronunciado na atividade, sendo que o efeito quadrático é maior que o linear. Ao contrário do efeito linear o efeito quadrático da temperatura também é significativo na atividade da enzima, mas inferior ao do pH. A interação entre esses dois fatores não apresenta significância estatística neste estudo cinético. Os valores ao lado do retângulo representam os valores estimados para os efeitos dos fatores e suas interações.

A fim de determinar as melhores condições reacionais, ponto de ótimo, realizou-se análise pela Metodologia de Superfície de Resposta. Através do gráfico de superfície de resposta (Figura 4.2) é apresentado o efeito da variação da temperatura e do pH na atividade da lacase.

Figura 4.2. Superfície de resposta para variável atividade (U mg^{-1}) da lacase de *T. versicolor* na oxidação da siringaldazina para os fatores pH e temperatura.

Tanto a variação da temperatura como a do pH afetaram a atividade enzimática. A região de atividade máxima é melhor definida pelas curvas de nível do gráfico de contornos na Figura 4.2. A análise estatística indica que em pH igual a 5,0 quando utilizada uma temperatura de 45°C essa enzima possui maior atividade. A função que representa estas figuras é dada pela Equação 4.1.

$$\text{Atividade (U mg}^{-1}\text{)} = -119,89 + 47,84 \text{ pH} + 1,09 \text{ T} - 4,75 \text{ pH}^2 - 0,01 \text{ T}^2 \quad (4.1)$$

De forma análoga, estão descritas na Tabela 4.7 as interações entre os fatores da análise da atividade da lacase *Coriolus hirsutus* utilizando o substrato siringaldazina. As repostas destacam um grande efeito dos fatores pH e temperatura na atividade máxima da lacase.

Através do diagrama de Pareto apresentado na Figura 4.3, observa-se que o fator pH apresenta o efeito mais pronunciado na atividade, sendo o efeito linear

maior que o quadrático. Nesse caso, o efeito linear da temperatura é significativo na atividade da enzima, enquanto o efeito quadrático não é. A interação entre os dois fatores (pH e temperatura) não é relevante. A atividade máxima é alcançada num valor de pH igual a 5,3 (Figura 4.4).

Tabela 4.7. Teste Anova para atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo *C. hirsutus* utilizando como substrato siringaldazina.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
pH	324697	2	162348	5,81	0,00981
Temperatura	206448	2	103224	3,69	0,04219
pH versus temperatura	9731	1	9730	0,35	0,56139
Erro	586748	21	27940		
Soma quadrática total	1126203	26

Figura 4.3. Diagrama de Pareto dos Efeitos Estimados Padronizados para atividade (U mg^{-1}) da lacase de *C. hirsutus* na oxidação da siringaldazina.

Figura 4.4 Superfície de resposta para a variável atividade (U mg^{-1}) da lacase de *C. hirsutus* na oxidação da siringaldazina para os fatores pH e temperatura.

A temperatura de maior atividade enzimática indicada pela análise de superfície de resposta está fora da região estudada, pois é inferior a temperatura mínima utilizada. Sendo assim, a temperatura de 25 °C (menor utilizada) será considerada a melhor resposta.

A análise realizada da atividade da lacase do fungo *C. hirsutus* utilizando substrato como catecol também apresentou forte dependência para os fatores analisados (Tabela 4.8).

Tabela 4.8. Teste Anova para atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo *C. hirsutus* utilizando como substrato catecol.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
pH	2152389	2	1076194	861,2	0,000000
Temperatura	85893	2	42946	34,37	0,000000
pH versus temperatura	28941	1	28941	23,16	0,000093
Erro	26243	21	1250		
Soma quadrática total	2282532	26			

Ao contrário dos resultados anteriormente obtidos a interação entre os fatores pH e temperatura possuem significância estatística (Figura 4.5). O pH ótimo obtido neste estudo foi 5,3 (Figura 4.6). O valor da temperatura ótima foi superior a região analisada, portanto, foi indicada como 65⁰C a temperatura em que se observou maior atividade.

Figura 4.5. Diagrama de Pareto dos Efeitos Estimados Padronizados para a atividade da lacase (U mg⁻¹) de *C.hirsutus* na oxidação do catecol.

Figura 4.6. Superfície de resposta para a variável atividade (U mg⁻¹) da lacase de *C.hirsutus* na oxidação do catecol para os fatores pH e temperatura.

Resultados das medidas da atividade analisados para enzima *T. versicolor* utilizando substrato catecol apresentam respostas que indicam novamente grande efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática (Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Teste Anova para atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo *T. versicolor* utilizando como substrato catecol.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
pH	1287	2	644	22,22	0,000007
Temperatura	552	2	276	9,54	0,001126
pH versus temperatura	31	1	31	1,08	0,310895
Erro	608	21	28		
Soma quadrática total	2484	26			

O pH é o fator com maior relevância e a interação entre os fatores não é significativa (Figura 4.7). O valor para o pH ótimo foi 4,4. Já o valor da temperatura ótima foi superior a região analisada. Sendo assim, a temperatura de 65 °C foi considerada a que proporcionou maior atividade enzimática (Figura 4.8).

Figura 4.7. Diagrama de Pareto dos Efeitos Estimados Padronizados para atividade da lacase (U mg^{-1}) de *T.versicolor* na oxidação do catecol.

Figura 4.8. Superfície de resposta para variável atividade (U mg^{-1}) da lacase de *T.versicolor* na oxidação do catecol para os fatores pH e temperatura.

Na Tabela 4.10 são apresentados os resultados da ANOVA para os experimentos utilizando a lacase do fungo *Coriolus hirsutus* e na Tabela 4.10 para lacase do fungo *Trametes versicolor*, ambos utilizando o substrato DMP. A temperatura, o pH e a interação entre esses fatores apresentaram valores de p que indicam que essas variáveis e suas interações tem grande influência na atividade da enzimática.

Tabela 4.10. Teste Anova para atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo *C. hirsutus* utilizando como substrato DMP.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
pH	1153817	2	576908	51,07	0,000000
Temperatura	200744	2	100371	8,89	0,002068
pH versus temperatura	290507	4	72626	6,43	0,002140
Erro	203317	18	11295		
Soma quadrática total	1779051	26			

Tabela 4.11. Teste Anova para atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo *T. versicolor* utilizando como substrato DMP.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
pH	54083	2	27041	64,62	0,000000
Temperatura	16067	2	8033	19,20	0,000018
pH versus temperatura	4520	1	4520	10,80	0,003517
Erro	8787	21	418		
Soma quadrática total	82721	26			

Na Figura 4.9 é apresentado o diagrama de Pareto relacionado aos experimentos utilizando a lacase do fungo *C. hirsutus*. Neste caso, um efeito considerável da interação entre os fatores pH e temperatura foi observado. Essa interação também foi observada quando foi utilizada a lacase do fungo *T.versicolor*

Figura 4.9. Diagrama de Pareto dos Efeitos Estimados Padronizados para atividade da lacase (U mg^{-1}) do fungo *C. hirsutus* na oxidação do substrato DMP.

A temperatura pela primeira vez apresentou uma influência maior na atividade enzimática do que o pH. As lacases dos fungos *C.hirsutus* e *T. versicolor* apresentaram o pH de máxima atividade enzimática abaixo de 2,9 (nível inferior) e temperaturas acima de 65⁰C (nível superior).

4.2.3. Discussão: parâmetros reacionais para reações de oxidação de compostos fenólicos catalisadas pela lacase

Até o momento mais de 100 lacases foram isoladas e caracterizadas (Giardina et al., 2010) e devido à grande diversidade das lacases, as propriedades catalíticas das enzimas são diversas.

O pH ótimo da maioria das lacases produzidas por fungos está entre 3,5 e 5,0, sendo que, quando compostos orgânicos doadores de hidrogênio são usados como substrato a dependência com pH apresenta curva campaniforme (Morozova et al., 2007). A oxidação de compostos fenólicos como DMP e siringaldazina por lacases de diferentes origens exibem valores ótimo de pH entre 3,0 e 7,0; sendo que para o substrato siringaldazina são encontrados valores mais elevados que para DMP (Baldrian, 2006). O pH ótimo para lacases utilizando substrato catecol está entre 3,5 e 6,2 (Baldrian, 2006; Shleev, 2004; Ko; Leem; Choi, 2001). A lacase do fungo *Trametes versicolor* apresenta pH ótimo igual a 3,5 e 4,0 quando utiliza DMP e siringaldazina como substrato, respectivamente (Baldrian, 2006). Os resultados obtidos, empregando-se metodologia de superfície de resposta, indicam que as condições experimentais de máxima atividade das enzimas lacases dos fungos *Trametes versicolor* e *Coriolus hirsutus* não diferem muito, sendo essas condições influenciadas pelo substrato.

Dois efeitos são considerados com relação à influência do pH na atividade da lacase, em reações de oxidação de compostos fenólicos. Com o aumento do pH da solução o potencial de oxidação dos compostos fenólicos decresce como resultado da produção do ânion fenolato ($\Delta E/\Delta pH = 50\text{mV}$ a 25⁰C) que promove um aumento velocidade da reação enzimática. Por outro lado, com o aumento do pH da solução as reações catalisadas pela lacase decrescem porque o íon OH⁻ liga-se ao sítio T2/T3 do sítio ativo da enzima. Durante a oxidação de substratos que são doadores

de elétrons a atividade da lacase decresce sistematicamente com o aumento do pH da solução. Isto ocorre porque prótons não estão envolvidos na oxidação dos substratos, sendo assim, o potencial redox é pouco influenciado pelo pH, prevalecendo a interação do íon OH^- com o sítio ativo da enzima (Morozova et al., 2007).

A temperatura ótima para a maioria das enzimas lacases está limitada a 50-70 °C (Morozova et al., 2007), embora a atividade da lacase *G. lucidum* é máxima a 25 °C (Kumari; Sirsi, 1972; Ko; Leem; Choi, 2001). Já a atividade da lacase do fungo *Trametes versicolor* é máxima a 55 °C (Baldrian, 2006). A estabilidade térmica de diferentes lacases é muito variável. O tempo de meia vida das lacases varia de poucos minutos a 50 °C obtido para a lacase de *B. cinnerea* para até 3 horas a 75 °C para lacase de *Pynoporus sanguineus* (Litthauer, 2007). Neste trabalho, a temperatura de atividade máxima apresentada pelas lacases dos fungos *Trametes versicolor* e *Coriolus hirsutus* foi igual a 65 °C, quando utilizado os substratos catecol e DMP, enquanto para o substrato siringaldazina a temperatura ótima foi de 25 °C.

Os valores de pH ótimo dos substratos siringaldazina e catecol são próximos (aproximadamente 5). Esses resultados foram utilizados para definir o meio reacional dos experimentos em que líquidos iônicos foram utilizados como co-solventes. Siringaldazina e catecol foram utilizados como substrato, pois assim foi possível padronizar os experimentos, utilizando uma solução tampão definida. Além disso, esses substratos apresentam características hidrofóbicas diferentes, sendo um fator adicional a ser avaliado. Como já discutido, a temperatura ótima da atividade das lacases utilizando o substrato siringaldazina foi igual a 25 °C. Embora a temperatura ótima da atividade das lacases utilizando o substrato catecol foi de 65 °C, sabe-se que enzimas são fortemente desestabilizadas com o aumento temperatura. Por isso, optou-se por realizar os experimentos a 25 °C.

4.3. Medida da atividade das lacase dos fungos *Coriolus hirsutus* e *Trametes versicolor* em solução LI/tampão

A medida da atividade enzimática da lacase do fungo *Coriolus hirsutus* foi realizada em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7 e em soluções de líquido

iônico/tampão em frações molares que variaram aproximadamente de 0,02 a 0,4 líquidos iônicos utilizados foram BMIM·MeSO₃ (Figura 4.14), BMPPDA·MeSO₃ (Figura 4.15) e BMIM·BF₄. A atividade da enzima em tampão acetato foi igual a $9,1 \times 10^2 \text{ U mg}^{-1}$, quando utilizado o substrato catecol e igual a $4,7 \times 10^2 \text{ U mg}^{-1}$ quando utilizado o substrato siringaldazina. Os resultados das atividades da lacase em BMPPDA·MeSO₃ e BMIM·MeSO₃ foram normalizados em relação à atividade da enzima em tampão. Quando foi utilizado o substrato catecol em solução com fração molar de 0,02 de BMPPDA·MeSO₃ e de BMIM·MeSO₃ a lacase manteve 56,6% e 57,7% da sua atividade, respectivamente. A atividade da lacase foi de 23,2% em fração molar 0,1 de BMPPDA·MeSO₃. Enquanto, em fração molar 0,1 de BMIM·MeSO₃ a lacase manteve 6,3 % da sua atividade. Em fração molar 0,4 de LI não foi observada nenhuma atividade da enzima.

Figura 4.14. Atividade normalizada da lacase do fungo *C. hirsutus* em diferentes concentrações de BMIM MeSO₃. Tampão: acetato 100 mmol L⁻¹; pH 4,7. Substrato: siringaldazina 4×10^{-2} mmol L⁻¹; catecol 4 mmol L⁻¹.

Figura 4.15. Atividade normalizada da lacase do fungo *C. hirsutus* em diferentes concentrações de BMPPDA·MeSO₃. Tampão: acetato 100 mmol L⁻¹; pH 4,7. Substrato: siringaldazina 4 x 10⁻² mmol L⁻¹; catecol 4 molL⁻¹.

Quando utilizado o substrato siringaldazina, a atividade da lacase diminuiu de forma mais acentuada, mantendo apenas 15,5% da atividade em fração molar 0,02 BMPPDA·MeSO₃/tampão e 16,1% em igual fração molar de BMIM·MeSO₃. Em 0,1 e 0,4 dos LI a enzima foi completamente inibida com relação a atividade obtida em tampão. Nas condições experimentais utilizadas para o ensaio enzimático neste trabalho não foi possível observar qualquer atividade da enzima lacase nas diversas frações molares de BMIM·BF₄.

A atividade da enzima lacase do fungo *Trametes versicolor* foi medida em soluções de diferentes líquido iônico/tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7 em frações molares 0,0125; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1. Os líquidos iônicos utilizados foram BMIM·BF₄, BMIM·Br, BMIM·MeSO₃, EMIM·MeSO₃, EMIM·MeSO₄ e Bu₄N·MeSO₃. A atividade da enzima em tampão foi igual a 20,4 ± 13 U mg⁻¹. Nas condições experimentais utilizadas para o ensaio enzimático neste trabalho, novamente não foi observada atividade da lacase nas diversas frações molares de BMIM·BF₄ e BMIM·Br. Os demais líquidos iônicos proporcionaram perda gradual da atividade da lacase em função do aumento da fração molar dos LI, sendo que os resultados variaram nas diversas concentrações em relação aos substratos e LI utilizados. Os valores percentuais da atividade inicial da lacase em relação a atividade inicial em tampão acetato foram utilizados para apresentar os resultados. Os resultados apresentados indicam que melhor desempenho da enzima foi observado em

EMIM·MeSO₄ e EMIM·MeSO₃. Em fração molar de 0,0125 a enzima apresentou em média uma perda de 33,5%.

Nas Figuras 4.15 e 4.16 são apresentados os valores percentuais da atividade da lacase em EMIM·MeSO₃ e EMIM·MeSO₄ utilizando os substratos siringaldazina e catecol, respectivamente. Os resultados obtidos da atividade enzimática nas diversas frações molares de LI formados pelo cátion EMIM⁺ foram muito semelhantes.

A atividade inicial da enzima lacase decresceu nas diversas concentrações de em BMIM·MeSO₃, Bu₄N·MeSO₃ e EMIM·MeSO₃, independentemente do substrato utilizado: siringaldazina (Figura 4.17) e catecol (Figura 4.18).

O EMIM·MeSO₃ foi o co-solvente que proporcionou melhor desempenho enzimático. Em frações molares mais elevadas de BMIM·MeSO₃ foi possível observar uma atividade residual da enzima, o contrário ocorreu em relação a Bu₄N·MeSO₃ que em maiores frações molares inibiu completamente atividade da enzima. Em geral, os resultados da atividade da enzima lacase do fungo *T. versicolor* em LI indicam maior dependência em relação ao solvente do que ao tipo de substrato utilizado.

Figura 4.15. Atividade da enzima lacase do fungo *T. versicolor* em diferentes concentrações de LI formados pelo cátion 1-etil-3-metilimidazólio. Tampão: acetato 100 mmol L⁻¹; pH 4,7. Substrato: siringaldazina 4 x 10⁻² mmol L⁻¹.

Figura 4.16. Atividade da enzima lacase do fungo *T. versicolor* em diferentes concentrações de LI formados pelo cátion 1-etil-3-metilimidazólio. Tampão: acetato 100 mmol L⁻¹; pH 4,7. Substrato: catecol 4 mol L⁻¹.

Figura 4.17. Atividade da enzima lacase do fungo *T. versicolor* em diferentes concentrações de LI formados pelo ânion metanossulfonato. Tampão: acetato 100 mmol L⁻¹; pH 4,7. Substrato: siringaldazina 4 x 10⁻² mmol L⁻¹.

Figura 4.18. Atividade da enzima lacase do fungo *T. versicolor* em diferentes concentrações de LI formados pelo ânion metanossulfonato. Tampão: acetato 100 mmol L⁻¹; pH 4,7. Substrato: catecol 4 mmol L⁻¹.

A atividade residual da lacase nas diversas frações molares de BMIM·MeSO₃ foi maior quando comparado com BMIM·MeSO₄. Em fração molar de 0,0125 do LI formado pelo ânions MeSO₃⁻, a lacase manteve 65% da atividade, enquanto no LI formado por MeSO₄⁻ manteve apenas 6% (Figura 4.19).

Figura 4.19. Atividade da enzima lacase do fungo *T. versicolor* em diferentes concentrações de LI formados pelo cátion BMIM⁺. Tampão: acetato 100 mmol L⁻¹; pH 4,7. Substrato: siringaldazina 4 x 10⁻² mmol L⁻¹.

O aumento da concentração dos LI utilizados foi acompanhado de um decréscimo da atividade das enzimas lacases dos fungos *C. hirsutus* e *T. versicolor*.

As propriedades físico-químicas (polaridade, viscosidade e hidrofobicidade) são largamente utilizadas para explicar o comportamento de enzimas em líquidos iônicos.

Líquidos iônicos são muito mais viscosos que a maioria dos solventes orgânicos. A viscosidade do BMIMBF₄, por exemplo, é similar a do etileno glicol, 19,6 cP a 25 °C (Heintz; Klasen; Lehmann, 2002). A alta viscosidade pode prejudicar a reação devido à limitação da difusão dos componentes no meio reacional.

Solventes com alta polaridade tendem a aumentar a solubilidade de substratos polares, podendo levar a reações mais rápidas e seletivas. Como exemplo, temos a acilação do ácido ascórbico com ácido oléico, catalisada por lipase de *Candida antarctica*. Em líquido iônico houve uma conversão de 83%, enquanto em solventes orgânicos a conversão foi de 50%. Essa diferença foi atribuída a alta solubilidade de ácido ascórbico em líquido iônico (Park et al., 2003). Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando dois substratos com diferentes hidrofobicidades. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho foram diversos e não permitem fazer qualquer referência a características dos substratos e a alta polaridade dos LI. As diferentes concentrações de Bu₄N·MeSO₃, por exemplo, proporcionaram uma atividade residual da enzima lacase, levemente maior quando foi utilizado o substrato catecol. O contrário ocorreu em BMIM·MeSO₃, onde siringaldazina proporcionou melhores resultados.

Mais importante que as propriedades físico-químicas dos LI são as interações dos íons com a água e biomoléculas. Vários estudos e revisões abordam o efeito de íons na estabilidade de proteínas, incluindo estudos que revelam que a atividade e estabilidade enzimática seguem a série de Hofmeister (Yang et al. 2009; Yang et al., 2010; Zhao, 2006; Zhao et al., 2006).

A solução enzimática é normalmente estabilizada por ânions cosmotrópicos e cátions caotrópicos, mas desestabilizada por ânion caotrópico e cátion cosmotrópicos. Uma revisão apresentada por Zhao (2006) classifica os líquidos iônicos por suas propriedades cosmotrópicas não somente pelo coeficiente β de viscosidade ou coeficiente β' NMR, mas utilizando outros parâmetros termodinâmicos como entropia de hidratação, entropia estrutural e mobilidade iônica. O coeficiente β de cátions imidazólios não é bem conhecido, entretanto, alguns resultados

termodinâmicos preliminares, baseados em suas interações com moléculas de água, implicam que EMIM⁺ é um fraco caotrópico, enquanto BMIM⁺ e n-Bu₄N⁺ são cosmotrópicos (desestabilizam proteínas) (Zhao, 2006; Zhao et al., 2006). Neste trabalho, maior atividade da lacase foi observada em EMIM·MeSO₃, resultado que pode ser explicado pelo efeito estabilizador desse par de íons. Da mesma maneira, a menor atividade enzimática da lacase em BMIM·MeSO₃, e Bu₄N·MeSO₃ pode ser resultado do caráter cosmotrópicos desses cátions. O coeficiente β de cátion BMPP⁺ não é conhecido, mas resultados similares àqueles obtidos para BMIM·MeSO₃ foram obtidos quando utilizado BPPA·MeSO₃.

Resultados similares aos obtidos aqui foram observados por Tavares; Rodriguez e Macedo (2008). O grupo observou um decréscimo da atividade da lacase do *Aspergillus*, modificado geneticamente, nos LI metanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio, 1-etil-3-metilimidazólio etilsulfato e 1-etil-3-metilimidazólio 2(2-metoxietoxi)etilsulfato, sendo que em concentrações acima de 75%(v/v) ocorria precipitação da enzima.

A lacase foi acentuadamente inibida na presença de BMIM·Br e BMIM·BF₄. Já a atividade dessa enzima foi relativamente menor em BMIM·MeSO₄ do que em BMIM·MeSO₃. O íon BF₄⁻ (coeficiente $\beta = -0.073$) tem caráter fortemente caotrópico e o íon brometo (coeficiente $\beta = -0.033$) é um caotrópico fraco, explicando, portanto, a alta inativação das enzimas lacase (Zhao, 2006; Zhao et al., 2006). Além disso, o íon Br⁻ inibe a enzima devido à ligação ao sítio T2/T3, embora essa inibição seja mais acentuada para cloretos e fluoretos. (Naki, Varfolomeev, 1981).

O coeficiente β para MeSO₄⁻ não é conhecido, mas acredita-se que seja um cosmotrópico igual aos ânions SO₄²⁻ e MeSO₃⁻ (com coeficiente β igual a +0.206 e +0.127, respectivamente) (Jenkins, 1995). A menor atividade em BMIM·MeSO₄ do que em BMIM·MeSO₃ leva a supor que MeSO₃⁻ tenha maior caráter cosmotrópico que MeSO₄⁻. Os ânions, por serem mais polarizáveis, possuem maior efeito estabilizador/desestabilizador em proteínas, portanto, uma pequena diferença do coeficiente de viscosidade pode proporcionar efeito pronunciado na atividade e estabilidade da proteína. Além disso, cátions cosmotrópicos como BMIM⁺ e n-Bu₄N⁺ possuem grande tendência em formar par iônico com ânions cosmotrópicos, diminuindo ainda mais o efeito dos ânions na estabilização da proteína (Yang, 2009). O pI da lacase de *T. versicolor* é igual a 3,5. Portanto, em pH 4,7 a enzima

apresenta carga superficial negativa, atraindo e acumulando mais íon BMIM^+ ao redor da enzima. A interação do cátion do LI cosmotrópico com ânion cosmotrópicos (como contra-íons) pode fazer com que os grupos cosmotrópicos trabalhem juntos para desestabilizar a enzima.

A inibição das lacases dos fungos *Trametes versicolor* e *Agaricus bisporus* em $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ e $\text{BMIM}\cdot\text{Br}$ também foi observada por Stephens e colaboradores (Shipovskov et al., 2008). A inibição da lacase do fungo *T. versicolor* em $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ foi mais acentuada, entretanto, reteve a atividade em 99,4% de LI e tampão citrato-fosfato 25 mmol L^{-1} (v/v). Outro LI utilizado neste trabalho foi $\text{BMIM}\cdot\text{N}(\text{CN}_2)$. O autor abordou a incompatibilidade dos resultados obtidos com a classificação dos íons segundo a série de Hofmeister. Em outro estudo, Mozhaev apresentou a inibição da lacase de *Trametes SP* em tetrafluorborato de 4-metil-n-butilpiridínio, no qual foram obtidos menores valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m em 25% (v/v) de LI. Em concentrações maiores que 50% (v/v), a enzima precipitou (Hinckley et al., 2002).

Quase todos os fatores que causam a inibição de enzimas em LI provavelmente estão relacionados com as mudanças na estrutura enzimática. A relação da estrutura com a atividade de lipase, por exemplo, foi investigada por Lau et al. (2004). Os LI que solubilizaram a enzima $\text{EMIM}\cdot\text{EtSO}_4$, $\text{BMIM}\cdot\text{NO}_3$, $\text{EtNH}_3\cdot\text{NO}_3$, e $\text{Et}_3\text{MeN}\cdot\text{MeSO}_4$ proporcionaram uma significativa redução na velocidade de transesterificação quando comparado ao $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$, no qual a enzima foi insolúvel. Entretanto, maior atividade enzimática foi mantida na presença de $\text{Et}_3\text{MeN}\cdot\text{MeSO}_4$. Estudos de espectroscopia de infravermelho indicaram que a enzima sofre perda de estruturas α -helixes e β turn devido ao desdobramento da estrutura protéica na presença de todos os LI que a dissolvem, exceto $\text{Et}_3\text{MeN}\cdot\text{MeSO}_4$, que manteve a estrutura nativa. Neste caso, a atividade da enzima está diretamente relacionada à perda da estrutura nativa.

4.4. Cinética da reação enzimática da lacase do fungo *Trametes versicolor* em BMIM MeSO_3

Alguns parâmetros cinéticos da enzima da lacase do fungo *T. versicolor* foram obtidos para reações enzimáticas utilizando o substrato siringaldazina e catecol. As

medidas foram realizadas a 25 °C em soluções tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 4,7 e em solução com fração molar 0,0125 dos LI BMIM·MeSO₃ e EMIM·MeSO₃. Na Figura 4.20 é apresentada a hipérbole retangular obtida por meio da equação de Michaelis Menten para a reação enzimática utilizando o substrato catecol.

A linearização dos gráficos foi obtida via a equação de Michaelis Menten e empregando-se equação de Hanes (Figuras 4.21 e 4.22).

Os valores das constantes michaelianas (K_m) em reações utilizando os substratos siringaldazina e catecol em tampão foram iguais a 5,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 683 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A constante michaeliana (K_m) está relacionada ao equilíbrio de formação do complexo enzima-substrato e indica que a afinidade da enzima em relação aos substratos diminuiu em solução contendo LI (Tabela 4.14).

Figura 4.20. Hipérbole da equação de Michaelis-Menten: cinética da reação realizada em fração molar de 0,0125 LI/tampão. Substrato: catecol 4 mmol L⁻¹.

O valor da K_m , quando comparado ao obtido em tampão, aumentou 57% no LI formado pelo cátion cosmotrópico BMIM·MeSO₃. Já com relação ao catecol, o maior valor da K_m foi obtido no LI formado pelos cátions caotrópico EMIM·MeSO₃, com um aumento de 67%. Para o cálculo da constante catalítica, K_{cat} ($V_{m\acute{a}x}/[E_t]$), foi utilizada a massa molar média encontrada na revisão feita por Baldrian (2006). Para as lacases do fungo *T. versicolor* o valor é igual a 68 KDa.

Figura 4.21. Cinética da reação realizada em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,0125$ de $\text{BMIM} \cdot \text{MeSO}_3$ e $\text{EMIM} \cdot \text{MeSO}_3$: linearização da equação de Michaelis-Menten através da equação de Hanes. Substrato: catecol 4 mmol L^{-1} .

Figura 4.22. Cinética da reação realizada em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{BMIM} \cdot \text{MeSO}_3$ e $\text{EMIM} \cdot \text{MeSO}_3$ utilizando siringaldazina: linearização da equação de Michaelis-Menten através da equação de Hanes.

A razão K_{cat}/K_m , eficiência catalítica da enzima, relaciona-se tanto com a afinidade da ligação do substrato com a enzima, como a capacidade catalítica desta. A eficiência catalítica da enzima é menor em solução contendo LI do que em solução tampão, independentemente do substrato utilizado.

Tabela 4.14. Constantes cinéticas obtidas para lacase do fungo *T. versicolor*.

		$V_{\max}$ (mmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_m (μmol)	K_{cat}/K_m mmol ⁻¹ min ⁻¹)	R
Substrato catecol	Tampão	12,4	683	1,23 x 10 ⁶	0,99
	BMIM·MeSO ₃	14,9	1053	9,6 x 10 ⁵	0,99
	EMIM·MeSO ₃	9,5	1138	5,68 x 10 ⁵	0,99
Siringaldazina Substrato	Tampão	10,9	5,2	1,42 x 10 ⁸	0,99
	BMIM·MeSO ₃	8,14	11,9	4,65 x 10 ⁷	0,98
	EMIM·MeSO ₃	10,4	8,1	8,73 x 10 ⁷	0,99

O grupo de Stephens obteve maiores valores de $V_{\max}$ em reações da lacase do fungo *T. versicolor* ocorridas em 10-20% de BMIM·Br (v/v), entretanto o valor de $V_{\max}/K_m$ diminuiu devido ao aumento da K_m . O líquido iônico tetrafluorborato de 4-metil-n-butlpiridínio, formado por cátion cosmotrópico e ânion caotrópico, também provocou uma drástica redução da velocidade máxima e um aumento significativo da K_m na reação catalisada pela lacase de *Trametes spp* utilizando o substrato siringaldazina.

Alguns estudos apresentam relação entre a flexibilidade do sítio ativo e da estrutura enzimática com a ordem liotrópica (Žoldák; Sprinzl; Sedlák, 2004; Toth, et al., 2008). Ânion e cátions cosmotrópico tendem a proporcionar um estado mais rígido, enquanto um ânion caotrópico a proporcionar uma conformação mais flexível. Zoldak et al. (2004) apresentaram uma relação entre atividade da NADH oxidase e a posição do ânion na série de Hofmeister. Segundo os autores, a atividade é modulada por ânions cosmotrópicos e caotrópicos por mecanismos diferentes: os ânions caotrópicos decrescem o K_{cat} aparente e aumentam a K_m , enquanto ânions cosmotrópicos provocam a diminuição de ambos. Entretanto, foi observado neste trabalho um aumento da K_m em reações da lacase ocorridas em LI formados pelos ânions cosmotrópicos. Em relação ao BMIM·MeSO₃, a menor afinidade da enzima pode ser atribuída em parte ao seu par iônico, que é cosmotrópico. Tavares; Rodriguez e Macedo (2008) também observaram uma redução de 33% na $V_{\max}$ e um aumento de 16% da K_m na reação de oxidação do substrato ABTS catalisada pela lacase em 25%(v/v) de EMIM·MeSO₃. Tanto a elevada rigidez como a elevada

flexibilidade pode afetar a afinidade da enzima pelo substrato e a constante catalítica da reação. Outra função atribuída ao ânion cosmotrópico, devido à sua polaridade, é a de proporcionar maior estabilidade ao estado complexo do estado de transição (enzima-substrato) e menor estabilidade ao substrato hidrofóbico, diminuindo assim a energia de ativação (Yang, 2009).

Contudo, os diversos resultados em relação à variação dos parâmetros cinéticos de enzimas em LI reforçam a idéia que os mecanismos envolvidos são complexos e vão além do simples caráter liotrópico dos íons (Tavares; Rodriguez; Macedo, 2008; Hinckley et al., 2002).

Ao interagirem diretamente com a enzima, os íons, preferencialmente os caotrópicos, podem alterar a carga superficial e/ou líquida, entretanto, é incerto se isso afetará a atividade enzimática e em que proporções (Yang, 2009). Alterações físicas e químicas na molécula enzimática podem alterar a atividade catalítica e seu mecanismo. Mais importante ainda é a interação direta de íons com grupos funcionais do sítio ativo da enzima que são indispensáveis para o evento catalítico. Mecanismos complexos estão envolvidos no desempenho enzimático como nucleofilicidade e a basicidade de Lewis. Ânions com alta nucleofilicidade, por exemplo, possuem maior tendência em interagir com grupos carregados da enzima, enquanto ânions com elevada basicidade possuem maior tendência em realizar ligações de hidrogênio com a molécula enzimática (De los Ríos et al., 2007; Yang, 2009).

Nas lacases o Cu1 é o acceptor primário de elétrons que são transferidos através de um tripeptídeo altamente conservado His-Cis-His (histidina-cisteína-histidina) para o cluster trinuclear, onde O₂ é reduzido à água. O Cu1 ocupa uma depressão da superfície da enzima que faz com que seja possível ser o acceptor primário. A cavidade é larga acomodando uma grande variedade de substratos. Os resíduos de His458 e Asp206 (aspargina) são considerados os mais importantes da interação do grupo do substrato reduzido e a enzima. O anel de His 458 coordenado ao Cu1 é altamente conservado em cobre-oxidases e sugere-se que His458 é a porta de entrada de elétrons durante a transferência para o Cu1. A interação da Asp206 com o substrato reduzido também tem papel importante na dependência da atividade da lacase com o pH. O grupo funcional carboxílico da Asp206 está dissociado em pH 5 conferindo carga negativa ao sítio ativo, favorecendo a interação

com grupos funcionais -OH ou -NH₂ do substrato. A interação dos grupos funcionais de compostos fenólicos com o grupo carboxílico, por exemplo, favorece a perda de prótons em pH no qual esse processo não é favorecido devido aos seus pK_as (Piontek, 2002, Giardina, 2010). Íons com elevada polarizabilidade, como MeSO₃⁻, provocam acúmulo de H⁺ próximo à superfície da enzima levando à redução do pH de superfície (Yang, 2009). Esse evento pode levar a protonação de grupos funcionais essenciais para a catálise. Íons menores podem interagir com sítio ativo da enzima, enquanto íons maiores tendem a interagir com a superfície, como por exemplo, com cadeias de aminoácidos como histidina, arginina e lisina. A lacase de *T. versicolor* possui oito resíduos de lisina, sendo que quatro delas se localizam próximo à superfície da enzima (Qiu et al., 2009; Ters, Kuncinger; Srebotnika, 2009).

4.5. Estabilidade da lacase do fungo *Trametes versicolor* em líquidos iônicos.

A estabilidade da enzima lacase do fungo *Trametes versicolor* foi obtida em tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 4,7 e em soluções de diferentes líquidos iônicos/tampão em frações molares de 0,0125 a 0,05 (Tabela 4.15). Os líquidos iônicos utilizados foram BMIM·MeSO₃, EMIM·MeSO₃, Bu₄N·MeSO₃ e BMIM·MeSO₄. As medidas foram realizadas até 48 horas depois da adição da enzima no solvente. As medidas de velocidade inicial realizadas em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7 foram utilizadas como referência. A maior perda percentual de atividade da enzima foi observada nas primeiras 4:30 horas de incubação da enzima.

A estabilidade da enzima em tampão e soluções de BMIM·MeSO₃ são apresentados graficamente na Figura 4.23. Nas primeiras 4:30 horas, a atividade da lacase diminuiu acentuadamente (45-50% da atividade inicial). Houve menor variação da estabilidade enzimática durante as 48 horas.

Maior estabilidade da enzima foi observada nas frações molares de EMIM·MeSO₃, enquanto menor estabilidade enzimática foi observada em soluções de Bu₄N·MeSO₃.

Qualquer inativação da lacase nos LI BMIM·MeSO₃, EMIM·MeSO₃, Bu₄N·MeSO₃ e EMIM·MeSO₄, relacionada a mudanças estruturais da enzima é

provavelmente reversível, pois diferente dos resultados das medidas de atividade inicial, o aumento da concentração do LI não foi acompanhado do aumento da inibição enzimática. Novamente observa-se efeito menos pronunciado dos cátions na estabilidade enzimática que pode ser atribuído a sua baixa polarizabilidade e por serem fracamente hidratados. Menor estabilidade da lacase foi observada em EMIM·MeSO₄. Isso reforça a idéia de que MeSO₄⁻ é menos cosmotrópico que MeSO₃⁻.

Tabela 4.15. Estabilidade normalizada da enzima lacase do fungo *T.versicolor* em LI durante 48 horas.

		Atividade(U mg ⁻¹)				
		Inicial	1 min.	4,5 hrs	12 hrs	24hrs
Tampão		100 ± 6,0	83,6 ± 1,9	60,4± 2,2	52,7 ± 6,3	51,7 ± 3,0
BMIM·MeSO ₃	0,0125		93,4 ± 1	58,7± 0,5	51,3 ± 1,1	42,0 ± 13
	0,025		92,4 ± 6,0	56,9± 3,8	52,1 ± 4,7	46,9 ± 4,4
	0,05		94,2 ± 5,7	54,6± 4,4	44,0 ± 1,3	47,2 ± 3,6
EMIM·MeSO ₃	0,0125		82,3 ± 0,5	73,6 ± 6,8	66,7 ± 1,2	49,8 ± 0,6
	0,025		96,5 ± 7,2	84,8 ± 3,2	70,5 ± 5,3	64,4 ± 5,2
	0,05		97,14 ± 3,7	76,4 ± 3,1	70,0 ± 3,9	66,9 ± 4,0
Bu ₄ N·MeSO ₃	0,0125		96,1 ± 3,2	53,8 ± 1,9	50,0 ± 3,8	41,3 ± 2,9
	0,025		94,2 ± 5,3	55,8 ± 2,9	53,8 ± 6,7	64,4 ± 8,6
	0,05		94,2 ± 5,2	62,5 ± 4,0	25,0 ± 1,0	39,4 ± 2,0
EMIM·MeSO ₄	0,0125		91,3 ± 4,8	40,4 ± 10	56,7 ± 0,3	33,6 ± 2,0
	0,025		91,3 ± 1,0	54,8 ± 9,0	35,6 ± 2,0	36,0
	0,05		102,9 ± 1,9	57,7 ± 5,7	51,9 ± 5,8	21,15 ± 2,8

Assim como para outras moléculas a adição de sais a água geralmente reduz a solubilidade de solutos apolares. A explicação para isso é o efeito direto do sal na

redução do volume livre da solução devido ao overlap com os íons salinos, e o efeito indireto na mudança da estrutura da água. A série de Hofmeister segue em parte essa redução de solubilidade de compostos apolares (Hummer et al., 1998). A diminuição de solutos polares pode proporcionar um aumento do efeito hidrofóbico.

O grupo de Iborra tem conduzido alguns trabalhos pioneiros de estudo de mudanças estruturais que revelam o poder estabilizante de LI, como EMIM·Tf₂N, para quimitripisina (de Diego et al., 2004) e lipase (de Diego et al., 2005). Os resultados de espectroscopia de fluorescência apresentam uma proteína mais compacta na presença dos LI, enquanto a evolução de alfa-hélices para folhas beta na estrutura secundária da proteína foi observada por espectro dicróismo circular (CD). Os resultados de CD e espectroscopia fluorescente indicaram uma conformação compacta, flexível e com alto nível de atividade e estabilidade. Já estudos realizados por Toth et al. (2008) sobre a atividade e estabilidade da flavoproteína NADH oxidase de *Thermus thermophilus* em LI indicou que na presença de cátions cosmotrópicos a enzima é mais estável e possivelmente mais rígida que na presença de cátions caotrópicos. A estabilidade enzimática, portanto, parece ser governada tanto por ânions como cátions.

Fujita e Ohno (2010) apresentaram resultados de estudos no qual o comportamento de diversas metaloproteínas foi avaliado no líquido iônico hidrato colina dihidrogenofosfato. Através de espectroscopia Raman e dicróismo circular, observaram que as proteínas que se dissolveram no LI apresentaram a mesma estrutura secundária e sítio ativo daquela apresentada em tampão. Entretanto, as medidas de atividade indicaram que o aumento da concentração de sal provocou desativação da enzima. Segundo os autores, a interação eletrostática pode reduzir a atividade enzimática mesmo daquelas enzimas que se encontram no estado nativo. Isto pode ser causado pelo decréscimo da interação entre a enzima e o substrato e a dissociação de subunidades estruturais.

Figura 4.23. Atividade residual da enzima lacase do fungo *T.versicolor* em frações molares 0,0125-0,05 de BMIM·MeSO₃/tampão. Substrato: siringaldazina 2×10^{-2} mmol L⁻¹.

4.6. Estabilidade térmica da lacase em líquidos iônicos

A estabilidade térmica da lacase do fungo *T. versicolor* foi avaliada empregando-se a técnica de calorimetria diferencial exploratória (DSC). Nas Figuras 4.24 e 4.25 são apresentados os resultados obtidos através da DSC para a estabilidade térmica da enzima em tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 4,7 e BMIM·MESO₃ em fração molar de 0,0125. A temperatura de transição térmica (T_m) para a desnaturação da lacase em tampão foi igual a 95 °C (Figura 4.24). As lacases dos fungos *C. hirsutus* e *C. zonatus*, que apresentam uma temperatura de desnaturação térmica de 87 °C e 92 °C, são as mais termoestáveis relatadas até o momento na literatura (Koroleva et al., 2001). Estudos anteriores (Agostinelli et al., 1995; López-Cruz; Viniegra-González; Hernández, 2006) indicam que o processo desnaturação da lacase não envolve mudanças na estrutura secundária da enzima.

Na Figura 4.25 é apresentada a variação do fluxo de calor em função do tempo para análises calorimétricas realizadas em BMIM·MESO₃.

A T_m da lacase em BMIM·MeSO₃ foi 92°C. Além disso, a energia envolvida na desestabilização da lacase foi muito menor em líquido iônico. Em EMIM·MeSO₃ a T_m foi igual a 102,5°C.

Figura 4.24. DSC para a estabilidade térmica da lacase do fungo *T. versicolor* em tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 4,7.

Figuras 4.25. DSC para a estabilidade térmica da lacase do fungo *T. versicolor* em BMIM·MESO₃/tampão, fração molar de 0,0125. Tampão: acetato 100 mmol L⁻¹ pH 4,7.

A elevada estabilidade térmica da enzima D-frutose desidrogenase foi atribuída, por Fujita e Ohno (2010), entre outras condições ambientais, a menor viscosidade do meio, e conseqüente perda de mobilidade das moléculas. A variação da entalpia obtida através da integração das áreas dos picos representa o total de calor envolvido durante o processo de desnaturação irreversível, podendo ser utilizada para quantificar esses efeitos (De Diego et al., 2004). A perda da estrutura nativa da enzima em líquido iônico pode justificar a baixa entalpia envolvida nesse processo. Essa perda é reversível e não afeta drasticamente a atividade enzimática. Não são perdidas as estrutura secundária e o sítio ativo da enzima o que possibilita que a lacase ainda se mantenha ativa. A diminuição da afinidade das enzimas pelos substratos pode estar relacionada à perda da estrutura nativa.

Soares (2009), através de experimentos computacionais de dinâmica molecular, estudou o processo de estabilidade e renaturação de proteínas. Os resultados apresentados corroboram as premissas que o *folding* de proteínas ocorre por meio de um processo em duas etapas, temporalmente separadas. No início as forças entrópicas são dominantes e são as que induzem a cadeia para o estado nativo. Então, na estrutura nativa, as pontes de hidrogênio (agora protegidas da competição com o meio solvente), juntamente com um empacotamento estrutural das cadeias laterais mais eficiente, devido às complementaridades estéricas (e assim otimizando a interações de van der Waals), iniciam a etapa de estabilização energética das proteínas. Mesmo desnaturada e em altas temperaturas, a forças entrópicas continuam atuando praticamente com a mesma intensidade, e a cadeia mais cedo ou mais tarde voltará a visitar a vizinhança da estrutura nativa. O processo continua ciclicamente, pois flutuações térmicas, a esta temperatura mais elevada, provocam a quebra das ligações de hidrogênio protegidas no interior da proteína, desfazendo a conformação globular da proteína. Sendo assim, mesmo que em LI as enzimas estejam desnaturadas o efeito hidrofóbico pode ser fundamental para manutenção de uma estrutura organizada, próxima da estrutura nativa.

4.7. Atividade da Lacase do fungo *Trametes versicolor* em cloretos de aquilmetilimidazólios

A concentração micelar crítica (CMC) de 1-dodecil-3-metilimidazólio foi determinada utilizando o método de titulação calorimétrica isotérmica (Figura 4.26). Surgiram dificuldades ao utilizar o método calorimétrico para determinação da CMC do LI cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio, devido à grande liberação de calor envolvida no processo de dissolução de causa desconhecida. Por isso, foi utilizada a técnica de medida da tensão superficial para determinar a CMC (Figura 4.27).

A CMC determinada para DDMIM-Cl foi $10,8 \text{ mmol L}^{-1}$, enquanto para OMIM-Cl foi igual a 138 mmol L^{-1} .

Figura 4.26. Titulação calorimétrica isotérmica do DDMIM-Cl em tampão acetato 100 mol L^{-1} pH 4,7. Fluxo de calor de cada injeção em função do tempo (A) Variação da entalpia em função da concentração molar de DDMIM-Cl (B).

Figura 4.27. Medida de tensão superficial para OMIM·Cl em solução tampão acetato 100 mol L⁻¹ pH 4,7.

A atividade da enzima lacase foi medida em soluções de LI compostos por ânion cloreto e cátions 1-aquil-3-metilimidazólios com o objetivo de encontrar alguma relação entre a cadeia carbônica do cátion e/ou a concentração micelar crítica dos líquidos iônicos e o desempenho da enzima. As concentrações variaram de 10 a 250 mmol L⁻¹. Foram utilizados os líquidos iônicos cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM·Cl), cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio (OMIM·Cl) e cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio (DDMIM·Cl). Na Figura 4.28 são apresentados os resultados obtidos.

O aumento da concentração dos líquidos iônicos leva a um decréscimo da atividade da lacase. Esse decréscimo é levemente mais acentuado para OMIM·Cl e BMIM·Cl. Há certa linearidade no decréscimo da atividade da enzima quando utilizado DDMIM·Cl como co-solvente. O melhor desempenho da lacase em DDMIM·Cl pode ser resultado da menor concentração de cloretos dissociados, já que em concentração 10,8 mmol L⁻¹ são formadas micelas desse LI. Foi obtida apenas uma medida de atividade enzimática na concentração na qual a CMC do OMIM·Cl já foi alcançada. Isso pode dificultar a interpretação dos resultados.

Figura 4.28. Atividade da enzima lacase do fungo *T. versicolor* em função da concentração de cloretos de alquilimidazólios. Substrato: siringaldazina 4×10^{-2} mmol L⁻¹.

Foi possível observar uma forte inibição da enzima com o aumento da concentração dos LI formados por cloretos. O ânion cloreto (coeficiente $\beta = 0.005$) é um intermediário do efeito cosmotrópico (Zhao et al. 2006; Kunz, 2004). Esse ânion também inibe a lacase complexando com o sítio ativo da enzima (Xu et al., 1996). Além disso, líquidos iônicos podem interagir com a enzima através da interação do ânion com as cadeias peptídicas levando ao rompimento de ligações de hidrogênio e estabilidade da estrutura terciária da enzima. O ânion Cl⁻, por exemplo, é um forte aceptor do grupo OH da celulose, levando ao rompimento da sua rede de ligações de hidrogênio e assim, sua dissolução (Muginova, 2010). Cátions imidazólios com longas cadeias alquílicas são mais cosmotrópicos devido à sua forte entropia de hidratação (Zhao, 2005). Sugere-se que cátions com longas cadeias alquílicas hidrofóbicas apresentem uma forte capacidade em desestabilizar a enzima devido à forte interação com grupos cosmotrópicos, como grupos carboxílicos da superfície da enzima, e a interação com grupos internos da molécula enzimática, levando à alteração da sua conformação nativa (Yang, 2009). O fato de haver formação de micelas de DDMIM·Cl logo nas primeiras concentrações estudadas pode ser a causa da minimização desse processo com relação aos outros LI. Portanto, o processo de agregação pode ser mais favorável que a interação com a estrutura enzimática.

5. CONCLUSÃO

A atividade das lacases dos fungos *T. versicolor* e *C. hirsutus* em líquidos iônicos foram sempre inferiores ao meio aquoso tamponado, sendo que aumento da concentração dos líquidos iônicos foi acompanhado da diminuição da velocidade inicial. O efeito de Hofmeister pode ser utilizado para explicar a atividade e estabilidade das lacases em meio contendo líquidos iônicos. Os líquidos iônicos formados pelos ânions caotrópicos brometo e tetrafluorborato foram fortes inibidores da atividade das lacases e os líquidos iônicos formados pelo cátion EMIM⁺, cosmotrópico, foi o que provocou menor diminuição da atividade inicial da lacase do fungo *T. versicolor*. A ordem crescente de atividade e estabilidade da lacase em líquidos iônicos para cátions foi BuN⁺≈BMPP⁺≈BMIM⁺<EMIM⁺, enquanto para ânions foi Br⁻≈BF₄⁻<MeSO₄⁻<MeSO₃⁻. A diminuição da eficiência catalítica da reação (K_{cat}/K_m) em meio contendo líquido iônico foi proporcionado principalmente pelo aumento da K_m .

A estabilidade da lacase em altas concentrações de líquidos iônicos formados pelo ânion metanossulfonato foi comparável a do sistema contendo apenas tampão. Possíveis mudanças estruturais da enzima nos líquidos iônicos foram provavelmente reversíveis. Cátions e ânions cosmotrópicos podem favorecer a estabilidade da enzima.

A lacase do fungo *Trametes versicolor* apresenta elevada termoestabilidade. As temperaturas de desnaturação térmica da lacase em soluções contendo líquidos iônicos e em tampão foram muito próximas. A baixa entalpia do processo de desnaturação em líquido iônico pode ser relacionada à perda da estrutura nativa da enzima.

Líquidos iônicos têm se apresentado como solventes potenciais para utilização em biocatálise, em meio aquoso ou não. É evidente que a natureza do líquido iônico é importante no desempenho da enzima. Suas propriedades físico-químicas como hidrofobicidade, densidade, viscosidade, ponto de ebulição, polaridade e miscibilidade podem ser moduladas pela combinação de diferentes cátions e ânions proporcionando maior solubilidade do substrato, levando a reações mais seletivas e de maior atividade enzimática. A série liotrópica, neste trabalho, foi

uma ferramenta importante, e ajudou a entender o desempenho das lacases em líquidos iônicos. Entretanto, o conhecimento sobre o mecanismo catalítico e os efeitos específicos dos íons é fundamental para a utilização vantajosa desses solventes em reações enzimáticas.

6. REFERÊNCIAS

- Agostinelli E.; Cervoni L.; Giartosio A.; Morpurgo L. (1995) *Biochem. J.*, 306, 697-702.
- Armarego W.L.F.; Perrin D.D. (1996) *Purification of Laboratory Chemicals*-4ed.
- Atkins P. W.; Paula (2008) *Físico-Química*. Trad.: Edilson Clemente da Silva et al., vol.2, 8 ed., Rio de Janeiro:LTC.
- Baldrian P. (2006) *FEMS Microbiol. Rev.*, 30, 215-242.
- Bento I.; Martins L.O.; Lopes G. G.; Carrondo M. A.; Lindley P. F. (2005) *Dalton Trans.*, 21, 3507-3513.
- Blaich R.; Esser K. (1975) *Arch. Microbiol.*, 103, 271-277.
- Bonhote P.; Dias A.P.; Papageorgiou N.; Kalyanasundaram K.; Gratzel M. (1996) *Inorg. Chem.*, 35, 1168–1178.
- Bostrom M.; Williams, D.R.M.; Stewart, P.R.; Ninham, B.W. (2003) *Phys. Rev. E.*, 68, 041902.,1-6.
- Bostrom M.; Williams D.R.M; Ninham B.W. (2004) *Colloid Interface Sci.* 9, 48–52.
- Call H.P.; Mücke I. (1997) *J. of Biotechnol.* 53, 163-202.
- Camarero S., Ibarra D.; Martínez A. T. (2007) *Enzyme and Microb. Technol.*, 40, 1264–1271.
- Cassol C. C; Ebeling G.; Ferrera B, Dupont J. (2006) *J. Adv. Synth. Catal.*, 348, 243-248.
- Chakroun H.; Mechichi, T; Martinez, M. J; Dhouib, A.; Sayadi, S. (2010) *Process Biochem.*, 45, 507–513.
- Collins K.D. (1997) *Biophys. J.*, 72, 65–76.
- Collins K.D.; Neilson G.W.; Enderby J.E. (2007) *Biophys. Chem.*, 128, 95–104.
- Combariza J.E.; Kestner N.R.; Jortner J. (1994) *J. Chem. Phys.*, 100, 2851–2864.
- Consorti, C.S.; de Souza, R. F.; Dupont, J.; Suarez, P. A. Z. (2001) *Quím. Nova*, 24, 830.

- Couto S. R.; Herrera J. L. T. (2006) *Biotech. Advances* 24, 500-5013.
- Cristóvão R. O.; Tavares, A. P. M.; Ferreira, L. A.; Loureiro, J. M.; Boaventura, R. A. R.; Macedo, E. A. (2009) *Bioresour. Technol.*, 100,1094–1099.
- De los Ríos A. P; Hernández-Fernández, F. J., Martínez A F, Rubio M.; Vllora G. (2007).*Biocatal Biotransform*, 25,151–156.
- Dec J.; Haider K.; Bollag J.M. (2001) *Soil Sci.*, 166, 660-671.
- de Diego, T.; Lozano, P.; Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, L. J. (2004) *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 916–924.
- de Diego, T.; Lozano, P., Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, J.L (2005) *Biomacromolecules*, 6, 1457–1464.
- J. Dupont; C. S. Consorti; J. Spencer (2000) *J. Braz. Chem. Soc.*, 11, 337-344.
- Dupont, J. (2004) *J. Braz. Chem. Soc.*, 15, 3, 341.
- Eggert C.; Temp U.; Eriksson K. E. L; Dean J. F. D. (1995) *FEBS Lett.*, 376, 202-206.
- Eggert C.; LaFayette P. R.; Temp U.; Eriksson K. E. L; Dean J. F. D. (1998) *Appl. Microbiol.*, 64, 1766-1772.
- Eggers, D.K., Valentine, J.S. (2001) *J. Mol. Biol.*, 314, 911–922.
- Egorova K.; Antranikian, G. (2005) *Curr.Opin. Micrbiol.*, 8, 6, 649-655.
- Enguita F. J.; Martins L. O.; Henriques A.O.; Carrondo M.A. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 19416-19425.
- Ferapontova E. E.; Shleev S.; Ruzgas T.; Stoica L.; Christenson A.; Tkac J.; Yaropolov A. I.; Gorton L. (2005) *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomic and Proteomics*, Elsevier, Amsterdam, 517-598.
- Franzoi A. C.; Migowski P.; Dupont J.; Vieira I. C. (2009) *Anal. Chim. Acta*, 639, 90–95.
- Franzoi A. C.; Dupont J.; Spinelli A.; Vieira I. C. (2009) *Talanta*, 77, 1322–1327.
- Franzoi A. C.; Vieira I.C.; J. Dupont (2010) *J. Braz. Chem. Soc.*, 21, 8, 1451-1458.
- Freire R. S.; Duran, N.; Kubota, L.T. (2001) *Talanta*, 54, 681-686.

- Freire R. S.; Duran, N.; Kubota, L.T. (2002) *Anal. Chim. Acta*, 463, 229-238.
- Fujita K., Ohno H. (2010) *Biopolymers*, 93, 12, 1093-1099.
- Galhaup C.; Haltrich D. (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 225-232.
- Gianfreda L.; Xu F.; Bollag J-M. (1999) *Bioremediation J*, 3,1 -26.
- Gianfreda L.; Iamarino R.; Scelza R.; Rao M. A. (2006) *Biocatal. Biotransform.*, 24 (3) 177-187.
- Giardina P.; Faraco, V.; Pezzella; Piscitelli C.; Vanhulle, S.; Sannia, G. (2010) *Cell. Mol. Life Sci.*, 67, 369–385.
- Gomes E.; Guez, M. A. U.; Martins, N; Silva, R. (2007) *Quim. Nova*, 30 (1), 136-145.
- Grossfield A.; Ren P.; Ponder J.W. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 15671–15682.
- Gupta M. N., Roy I. (2004) *Eur. J. Biochem.*, 271, 2575–2583.
- Haber J. et al. (2000) *J. Mol Catal. B: Enzym.*, Poland, 11, 1–11.
- Hagiwara R.; Ito Y. (2000) *J. Fluorine Chem.*, 105, 221.
- Heintz A.; Klasen D.; Lehmann J.K. (2002) *J. Sol. Chem.*, 31, 467-476.
- Hernández-Fernández F. J. et. al. (2010) *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 1423–1435. Hinckley G.; Mozhaev V. V.; Budde C.; Khmelnitsky Y. L. (2002) *Biotechnol. Lett.*, 24, 2083–2087.
- Huddleston J.G.; Visser A.E.; Reichert W.M.; Willauer H.D.; Broker G.A.; Rogers R.D. (2001) *Green Chem.*, 3, 156–164.
- Hummer G.; Garde, S.; Garcia, A. E.; Paulaitis, M. E.; Pratt, L.R. (1998) *J. Phys. Chem. B*, 102 (51), 10470-10482.
- Israelachvili, J., 1992, *Intermolecular and surface forces*. 2 ed., London, Academic Press
- Jenkins H.D.B.; Marcus Y. (1995) *Chem. Rev.*,95, 2695–2724.
- Jurado, M.; Prieto, A.; Martínez-Alcalá, Á.; Martínez, Á. T.; Martínez, M. J. (2009) *Bioresour. Technol.*, 100, 6378-6384.
- Kaar J.L. Jesionowski A.M.; Berberich J.A.; Moulton R.; Russell A J. (2003) *J Am Chem Soc.*, 31, 125:4125.

- Karhunen E.; Niku-Paavola M. L.; Viikari L.; Haltia T.; van der Meer R. A.; Duine J. A. (1990) *FEBS Lett.*, 267, 6-8.
- Kauzmann W. (1959) *Adv. Protein. Chem.*, 14, 1-63.
- Kendall J. L.; Canelas, D.A.; Young, J.L; DeSimone J. M. (1999) *Chem. Rev.*, 99, 543-563.
- Khmelnitsky Y. L.; Levashov, A.V.; Klyachko, N.L.; Martinek, K. (1988) *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 710.
- Klibanov A. M. (2001) *Nature*, vol. 2409, 241-246.
- Koroleva O. V.; Stepanova E. V.; Binukov, V. I.; Timofeev, V. P.; Pjeil, W. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, 1547, 397-407.
- Krishna S. H. (2002) *Biotechnol. Adv.*, 20 239–267.
- Krossing, I.; Slattery, J. M.; Daguene, C.; Dyson, P. J.; Oleinikova, A.; Weingärtner (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 13427–13434.
- Ko E.M.; Leem Y.E.; Choi, H. T. (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 98-102.
- Kumari H. L.; Sirsi M. (1972) *Arch. Microbiol.*, 84, 350-357.
- Kunz W.; Henle, J.; Ninham B. W. (2004) *Curr. Opin. in Colloid Interface Sci.*, 9, 19-37.
- Lau M.; van Rantwijk F.; Seddon K.R.; Sheldon, R. A. et. al. (2000) *Organic Lett* 2:4189–4191.
- Lau, R.M.; Sorgedraeger, R. M.; Carrea, G.; van Rantiwijk, F; Secundo, F.; Sheldon, R. A. (2004) *Green Chem.*, 6, 483–487.
- Lee, S. H.; Ha. S.H.; Lee, S.B.; Koo, Y. M. (2006) *Biotechnol. Lett.*, 28, 1335.
- Leonowicz A.; Grzywnowicz K. (1981) *Enzyme Microb. Technol.*, 3, 55–8.
- Leonowicz A.; Edgehill R.U.; Bollag J.M. (1984) *Arch. Microbiol.*, 130, 89-96.
- A. Leonowicz, N.-S. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M. Wojtas-Wasilewska, A. Matuszewska, M. Hofrichter, D. Wesenberg, J. Rogalski (2001) *J. Basic Microbiol.*, 41, 185-227.

- Lima A. W. O; Angnes L. (1999) *Quím. Nova*, 22, 2. 229-245.
- Lima E. R. A. (2008) Cálculo de Propriedades Físico-Químicas de Sistemas Coloidais via Equação de Poisson-Boltzmann: Efeito da Inclusão de Potenciais não-Eletrostáticos. Tese (Doutorado em Engenharia Química), COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Litthauer, D.; van Vuuren, M. J.; van Tonder, A.; Wolfaardt, F. W. (2007) *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 563–568.
- López-Cruz J. I., Viniegra-González G.; Hernández-Arana A. (2006) *Bioconjugate Chem.*, 17, 1093-1098.
- Maa H. L.; Kermasha S.; Gao J. M.; Borges M. R.; Yu, X. Z (2009) *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 57, 89–95.
- Majeau J. A.; Brar S. K.; Tyagi R. D (2010) *Bioresour. Technol.*, 101, 2331–2350.
- Malmstrom B. G. (1982) *Annu. Rev. Biochem.*, 51, 21-59.
- Mann J.P.; McLuskey A.; Atkin R. (2009) *Green Chem.*, 11, 785–792.
- Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J. (2001) *J. Basic Microbiol.*, 41, 185-227.
- Messerschmidt A.; Ladenstein R; Huber R.; Bolognesi M.; Avigliano L.; Petruzzelli R.; Rossi A.; Finazzi-Agro A. (1992) *J. Mol. Biol.*, 224, 179-205
- Moniruzzamana M.; Nakashima K., Kamiyaa N., Goto M. (2010) *Biochem. Engineering J.*, 48, 295–314.
- Morozova O. V.; Shumakovich G. P., Gorbacheva M. A., Shleev S. V., Yaropolov A. I. (2007) *Biochemistry*, 72 (10), 1136-1150.
- Muginova S. V.; Galimova A. Z.; Polyakov A. E.; Shekhovtsova T. N. (2010) *J. Analytical Chem.*, 65 (4), 331–35.
- Muldoon M.J., Gordon C.M., Dunkin I.R. (2001) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 413–416.
- Naki A.; Varfolomeev S. D. (1981) *Biochemistry* (Engl. Transl.) 46, 1344-1350.
- Naqui A.; Varfolomeev S. D. (1980) *Febs Letters*, 113 (2), 157-160.

- Oliveira I. R. W. Z.; Fatibello O. F. (2009) *Quim. Nova*, 32, 5, 1195-1201.
- Palmer A. E.; Lee S. K.; Solomon E. I. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 6591-6599.
- ParK.S. ; R.J. Kazlauskas, (2001) *J Org. Chem.* 40, 2379.
- Park S.; Kazlauskas R. J. (2003) *Curr. Opin. in Biotechnol.*, 14, 432–437.
- Park S; Viklund F, Hult K, Kazlauskas (2003) RJ. ACS Symposium Ionic Liquids as Green Solvents: Progress & Prospects: in press.
- Petit, S; Azzouz R.; Fruit, C.; Bischoff L.; Marsais F. (2008) *Tetrahedron Letters*, 49, 3663-3665.
- Piontek K.; Antorini M.; Choinowski T. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 40, 37663–37669.
- Qiu H. Xu, C.; Hung, X.; Ding, Y.; Qu, Y.; Gao, P. (2009) *J. Phys. Chem. C*, 113, 2521–2525.
- Reinhammar B. R.;. Vanngard T. I (1971) *Eur. J. Biochem.*, 18, 463-8.
- Reinhammar B. (1984) *Copper Proteins and Copper Enzymes*, ed. R. Lontie, Vol. 3, 1-36. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Ricardo O. S. S. (2009) *Dinâmica molecular de proteínas: estabilidade e renaturação térmica*. Dissertação (mestre em ciências farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, USP, Riberão Preto, São Paulo.
- Roosen C.; Müller P.; Greiner L. (2008) *Appl Microbiol Biotechnol*, Germany, 81:607–614.
- Schröder U.; Wadhawan J.D.; Compton R.G.; F.Marken, Soares P.A.Z., Consorti, C.S., Souza R.F, Dupont J (2000) *New J. Chem.*, 24, 1009.
- Sedlak, E., Stagg, L., Wittung-Stafshede, P.,(2008) *Arch. Biochem. Biophys.*, 479, 69–73.
- Shleev S.V.; Morozova O, Nikitina O, Gorshina ES, Rusinova T, Serezhenkov VA, Burbaev DS, Gazaryan IG & Yaropolov AI (2004) *Biochimie* 86: 693–703.
- Shleev S.; Tkac J.; Christenson A.; Ruzgas T.; Yaropolov A. I.; Whittaker J. W.; Gorton L. (2005) *Biosens. Bioelectron.*, 20, 2517-2554.

- Schultz A.; Jonas U.; Hammer E.; Schauer F. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4377-4381
- Shleev S.; Reimann C. T.; Serezhenkov V.; Burbaev D.; Yaropolov A. I.; Gorton L.; Ruzgas T. (2006) *Biochimie*, 88, 1275-1285.
- Shipovskov S.; Gunaratne H. Q. N.; Seddon K. R.; Stephens G. (2008) *Green Chem.*, 806.
- Shin K. S., Lee Y. J. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, 384, 109–115.
- Socrates G. (2001) *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. 3 ed.; Wiley: Chichester; New York.
- Solomon E. I.; Sundaram U. M.; Machonkin T. E (1996) *Chem. Rev.*, 96, 2563-2606.
- Swatloski R.P.; Holbrey J.D.; Rogers R.D. (2003) *Green Chem.*, 5, 361–363.
- Tavares A .P. M.; Rodriguez O.; Macedo E. A. (2008) *Biotechnol. and Bioengineering*, 101, 202-207.
- Ters T.; Kuncinger T.; Srebotnika E. (2009) *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 61, 261–267
- Thurston F. (1994) *Microbiol.*, 140, 19-26.
- Toth, K., et al. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 789–795.
- van Rantwijk F. V.; Sheldon R. A. (2007) *Chem. Rev.*, 107, 2757-2785
- Xu F. (1996a) *Biochemistry*, 35, 23, 7608 – 7614.
- Xu, F., (1996b) *Appl. Biochem. Biotechnol.* (in press).
- Xu F. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 924-8.
- Zaks A.; Klivanov A. M. (1984) *Science*, 224, 654, 1249-1251.
- Zaks, A.; Klivanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263 (5), 3194–3201.
- Zhang Y.; Cremer P.S. (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 658-663.
- Zhao, H. (2005) *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 37, 16–25.
- Zhao, H.; Olubajo, O.; Song, Z.; Sims, A. L., Person, T. E., Lawal, R. A.; Holley, L. A. (2006) *Bioorganic Chemistry*, 34, 15–25.
- Zhou G. P.; Zhang, Y.; Huang, X. R.; Shi, C. H.; Liu, Wei, F. L.; Li, Y. Z.; Qu, Y. B.; Gao, P.J. (2008) *Colloids and Surf., B*, 66 , 146–149.

- Žoldák G.; Sprinzi M.; SedláK E. (2004) *Eur. J. Biochem.*, 271, 48–57.
- Yang Z, Pan W (2005) *Enzyme Microb. Technol.*, 37, 19–28.
- Yang Z.; Yue Y. J.; Huang W. C.; Zhuang X. M.; Chen Z. T.; Xing M. (2009) *J. Biochem.*, 145(3), 355–364.
- Yang Z. (2009) *J. Biotechnol.*, 144, 12–22.
- Yaropolov A. I.; Skorobogatko O. V.; Vartanov S. S.; Varfolomeyev S. D. (1994) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 49, 257 – 280.
- Yoshida H. (1883) *J. Chem. Soc.*, 43, 472-486.
- Walden, P. (1914) *Bull. Acad. Imper. Sci. St. Petersburg*, 1800.
- Wasserscheid P.; Welton, T. (2002) *Ionic Liquids in Synthesis*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Warren J.C., Stowring L.; Morales M.F. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 309–316.
- Wesenberg D.; Irene Kyriakides; Agathos S. N. (2003) *Biotechnol. Adv.*, 22, 161–187.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Daniela Moraes Batistela

Local e data de nascimento: Porto Feliz, 15/02/1980

EDUCAÇÃO

Escola Técnica Estadual Rubens de Faria e Souza

Sorocaba/SP-1997

Curso técnico em alimentos

Instituto de Química da Universidade de São Paulo

São Paulo/SP-2007

Bacharelado em química

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CNPq, setembro de 2008/setembro de 2010

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

I)Curso (2007): “Métodos Modernos de Caracterização estrutural e dinâmica de proteínas” (40 horas)

Instituição: Universidade Estadual de Campinas-Campinas-SP

II)Curso (2008): “Validação de Métodos Analíticos Físico/Químico” (16 horas)

Instituição: Centro de Educação Profissional-São Paulo-SP

PUBLICAÇÕES

Batistela, Daniela Moraes; Maia, Lígia Passos ; STEVANI, Cassius Vinicius (PQ), BAZITO, Reinaldo Camino; FREIRE; Renato Sanches. ESTUDO DA ATIVIDADE DA LACASE *Coriolus hirsutus* EM 1-BUTIL-1-METILPIPERIDINA E 1-BUTIL-3-BUTILIMIDAZOL. 5º CONGRESSO NACIONAL DE QUÍMICA AMBIENTAL. Estância de São Pedro/SP, 2010.

BATISTELA, Daniela Moraes ; CUCCOVIA, Iolanda Midea ; MAXIMIANO, F. A. . Ion Binding to Zwitterionic Interfaces: The Relationship Between Enthalpy of Micellization and the Interfacial Anion Concentration. In: XXXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA

DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2006, Águas de Lindóia. Programa e Resumos, 2006.

BATISTELA, Daniela Moraes ; MAXIMIANO, F. A. ; CUCCOVIA, Iolanda Midea . Ion binding to zwitterionic interfaces: specific salt effects on the thermodynamics of N-dodecyl-N,N-dimethylpropane sulfonate micelization. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindóia - SP. Programa e Resumos, 2005. p. 163.