



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**KENNEDY DANIEL DE CARVALHO SANTOS**

**INTERAÇÕES INTERMOLECULARES ENTRE AMINOÁCIDOS E LIGNINA: UMA  
ABORDAGEM TEÓRICA E EXPERIMENTAL**

**CAMPINAS  
2020**

**KENNEDY DANIEL DE CARVALHO SANTOS**

**INTERAÇÕES INTERMOLECULARES ENTRE AMINOÁCIDOS E LIGNINA: UMA  
ABORDAGEM TEÓRICA E EXPERIMENTAL**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Estadual de Campinas como  
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título  
de Mestre em Química na área de Química Orgânica**

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Francisco Tormena**

**O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo  
aluno Kennedy Daniel de Carvalho Santos e orientado pelo Prof. Dr. Claudio  
Francisco Tormena.**

**CAMPINAS  
2020**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

Sa59e Santos, Kennedy Daniel de Carvalho, 1993-  
Interações intermoleculares entre aminoácidos e lignina : uma abordagem teórica e experimental / Kennedy Daniel de Carvalho Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Claudio Francisco Tormena.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Lignina. 2. Teoria do funcional de densidade. 3. Ressonância magnética nuclear. I. Tormena, Claudio Francisco, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Intermolecular interactions between amino acids and lignin : a theoretical and experimental approach

**Palavras-chave em inglês:**

Lignin

Density functional theory

Nuclear magnetic resonance

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Orgânica

**Banca examinadora:**

Claudio Francisco Tormena [Orientador]

Leandro Martínez

Eduardo Ribeiro de Azevedo

**Data de defesa:** 16-09-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Química

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3349-7423>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7932840266155484>

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Claudio Francisco Tormena (Orientador)

Prof. Dr. Leandro Martínez (UNICAMP)

Prof. Dr. Eduardo Ribeiro de Azevedo (Instituto de Física de São Carlos - USP)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno **KENNEDY DANIEL DE CARVALHO SANTOS**, aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de setembro de 2020.

*“As pessoas que desejam apenas atingir a autorrealização jamais sabem para onde estão indo. Nem podem sabê-lo. Num certo sentido, o oráculo tinha razão quando afirmou que o importante é conhecer-se a si mesmo. Essa é a primeira meta do conhecimento. Mas reconhecer que a alma do homem é incognoscível é o objetivo supremo da sabedoria. O mistério final somos nós mesmos. Quando tivermos conseguido pesar o sol na balança e medido os passos da lua e desenhado o mapa dos sete céus, estrela por estrela, ainda restaremos nós. Quem pode calcular a órbita da própria alma?” – **Oscar Wilde em De profundis***

## **AGRADECIMENTOS**

Não se pode chegar longe sem ajuda de amigos, agradecê-los é a melhor forma de retribuição e não posso deixar de agradecer àqueles que me ajudaram nessa trajetória.

Agradeço à minha família, por todo o suporte emocional e pelo incentivo sempre presente no caminho que decidi traçar. Ao meu pai, Eloísio, por me ensinar as virtudes da gentileza e da coragem e ao meu irmão Vinicyus, que ao seu modo é alguém com quem eu sempre pude contar.

Agradeço também ao meu orientador, o professor Cláudio Tormena por ter acreditado nesta ideia e por ter me dado nada menos do que total suporte para a execução do projeto. Por ser, além de um orientador, um amigo que dá conselhos, ajuda e ouve. Agradeço também à sua família, Cíntia e Thais (Tatá) pelo modo como sempre acolhem os alunos de uma forma excepcional.

Minha gratidão total também se estende aos meus colegas de laboratório, sem os quais eu não conseguiria executar tudo que aprendi. Ao Renan, que me acompanhou desde a iniciação científica e que me ensinou um pouco do que ele sabe e que já é tudo que eu sei. À Laiza e ao Uenifer, que me ensinaram muito sobre química teórica e pela parceria nos trabalhos do cluster. Agradeço também à Bruna, o João e ao Guilherme (Bart) por toda ajuda e discussões sobre Ressonância. E claro, aos alunos de iniciação científica do laboratório, a Cássia e o Renan (Juninho).

Jamais poderia encerrar os agradecimentos sem mencionar uma pessoa muito especial, que apesar de não estar presente, sempre acreditou em mim, até quando eu mesmo duvidava, alguém que me ensinou a ser forte e que sempre foi um exemplo em minha vida. Este agradecimento vai à minha mãe Ester, e que as minhas vitórias sejam nossas vitórias.

Agradeço à CAPES (processo nº 88882.329174/2019-01) pela bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Também agradeço ao CNPq pelas verbas destinadas à infraestrutura que possibilitaram a realização deste projeto.

À FAEPEX deixo meus agradecimentos pelo auxílio para divulgação do trabalho em eventos científicos.

Por último agradeço à FAPESP pelo custeio dos projetos temáticos que contemplam os equipamentos usados para o desenvolvimento do projeto.

## RESUMO

Aminoácidos são moléculas importantes na manutenção de sistemas biológicos, um de seus papéis no mundo vegetal é dar origem aos monolignóis que são condensados por enzimas para formar a lignina. Além da formação de tais monolignóis, os aminoácidos compõem as enzimas que são empregadas atualmente para a quebra e posterior valorização deste recurso renovável prontamente disponível na natureza e não totalmente valorizado que é a lignina. O presente trabalho visa analisar como os aminoácidos em solução aquosa conseguem interagir com a lignina (e compostos modelo). Foram estudados quatro aminoácidos e quatro compostos modelo da lignina pela Teoria do Funcional de Densidade (DFT) bem como análises de NBO buscando compreender se tal interação é favorável e como ela ocorre. Os resultados indicam que é possível a existência desta interação e os cálculos computacionais apresentaram valores de energia de interação consideráveis ficando na casa de 10 a 20 kcal mol<sup>-1</sup>. Experimentalmente, observaram-se pequenas mudanças no deslocamento químico dos sinais de <sup>13</sup>C da carbonila e <sup>15</sup>N do aminoácido Glicina quando lignina é adicionada à solução.

## ABSTRACT

Amino acids are important molecules for maintenance of biological systems, one of its roles in plants is to originate monolignols which are condensed through enzymatic reactions to produce lignin. Not only amino acids form monolignols, but they also are present in enzymes that are currently being used to promote fractionation and valorization of this readily available in nature and undervalued renewable resource that is lignin. The present work aims to study how amino acids in aqueous solutions can interact with lignin (and model compounds). Four amino acids and four model compounds were studied through Density Functional Theory (DFT) and NBO analysis seeking to understand if such interaction is favorable and how it occurs. The results indicate that such interaction existence is plausible and computational calculations presented considerable values for Energy of Interaction (EI) in the range of 10 to 20 kcal mol<sup>-1</sup>. Experimentally, small changes in chemical shift of the <sup>13</sup>C of the carbonyl carbon and the <sup>15</sup>N of the amino group of the glycine were observed when lignin is added to the solution.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema ilustrativo da formação da lignina nas células vegetais..... 16
- Figura 2.** Exemplo de unidade de ligação  $\alpha$ -éter entre lignina e hemicelulose. A posição C-6' da unidade da manose (em azul) está ligada a subunidades da lignina (em vermelho) na posição  $\alpha$  das ligações  $\beta$ -O-4". Imagem adaptada da referência<sup>6</sup> ..... 17
- Figura 3.** Exemplo de trecho da molécula da lignina com destaque para a ligação  $\beta$ -O-4, em vermelho.....18
- Figura 4.** Ilustração de como um cálculo de *counterpoise* se faz necessário para evitar superestimativa da Energia de Interação.....24
- Figura 5.** Representação comparativa entre Orbitais Naturais de Ligação NBO, Orbitais Moleculares Naturais Localizados (NLMO) e Orbitais Moleculares (MO). Extraído da referência.....25
- Figura 6.** Ilustração da magnetização resultante antes e após o pulso de rf, de acordo com o esquema vetorial, demonstrando o fenômeno de relaxação longitudinal ..... 28
- Figura 7.** Esquema experimental adotado para obtenção de frações da lignina, a partir de capim elefante, sem causar danos estruturais excessivos ..... 31
- Figura 8.** Ilustração das estruturas do aminoácido (Tyr neutra) e do composto modelo Aryloxy e do complexo formado entre as duas moléculas. As otimizações foram feitas no nível de teoria PW6B95D3/cc-pVDZ ..... 33
- Figura 9.** Comparação do efeito dos métodos para o cálculo de EI nos sistemas Ary-Tyr (à esquerda) e Guai-Tyr (à direita), unidades dadas em kcal mol<sup>-1</sup>, métodos de cálculo rotulados por cores na legenda à direita.....34

<b>Figura 10.</b> Energias de Interação para as diferentes moléculas modelo empregadas neste trabalho, valores de energia em kcal mol <sup>-1</sup> .....	36
<b>Figura 11.</b> Estrutura dos compostos modelos escolhidos para representar a lignina nos procedimentos teóricos .....	37
<b>Figura 12.</b> Energias de Interação do composto modelo Aryloxy com os diferentes aminoácidos estudados. Energias fornecidas em kcal mol <sup>-1</sup> .....	38
<b>Figura 13.</b> Esquema ilustrativo comparando como seriam representações da glicina empregando-se o modelo de solvatação implícita (à esquerda, imerso em campo de potencial com a constante dielétrica do solvente – a água representada em azul no caso) e explícita (à direita), com moléculas de água construídas ao redor da Glicina.....	40
<b>Figura 14.</b> Formas estruturais da Gly em solução aquosa como função do pH.....	40
<b>Figura 15.</b> Orbitais NBO gerados para o complexo Guai-Phe, à esquerda interação via grupo amino, a imagem à direita mostra a interação via carboxila. Isovalues de 0,02 e valores de energia em kcal mol <sup>-1</sup> .....	42
<b>Figura 16.</b> Orbitais NBO gerados para o complexo Ary-Gly, à esquerda interação via grupo amino, a imagem à direita mostra a interação de via grupo carboxilato. Isovalues de 0,02 e valores de energia em kcal mol <sup>-1</sup> .....	43
<b>Figura 17.</b> Sobreposição dos sinais de <sup>13</sup> C da Carbonila do aminoácido Glicina após adição de massas de lignina a uma solução 2% de Glicina em D <sub>2</sub> O. Referências ajustadas com capilar selado de CDCl <sub>3</sub> . Experimento feito em equipamento Bruker Avance III de 600MHz .....	46

**Figura 18.** Sobreposição dos sinais de  $^{15}\text{N}$  do grupo Amino do aminoácido Glicina após adição de lignina a uma solução de Glicina em  $\text{D}_2\text{O}$ . Referências ajustadas com capilar selado de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Experimento feito em equipamento Bruker Avance III de 600MHz ..... 47

**Figura 19.** Imagem de microscopia confocal de fluorescência a laser nas soluções de lignina em água, antes (à esquerda) e depois (à direita) da adição de glicina à solução. Legenda de tamanho de partícula é a mesma para ambas as imagens .....49

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de Energia de Interação (EI) calculadas para os compostos modelo Aryloxy e Guaiacyl, complexados com os aminoácidos estudados. Energias sem correção por BSSE e com correção, unidades em kcal mol<sup>-1</sup> .....39
- Tabela 2.** Valores de Energia de Interação (EI), em kcal mol<sup>-1</sup>, calculados no nível de teoria PW6B95D3/cc-pvDZ para os sistemas em fase isolada e os sistemas com consideração de solvente implícito (PCM) ..... 41
- Tabela 3.** Valores calculados de deslocamento químico ( $\delta$ ), em ppm, dos núcleos de <sup>15</sup>N e <sup>13</sup>C dos aminoácidos Gly, Phe, e Tyr isolados e complexados com os compostos modelo Aryloxy e Guaiacyl. As formas isoladas correspondem à mesma geometria do complexo, a forma otimizada corresponde à conformação de menor energia do aminoácido ..... 44

## SUMÁRIO

### 1. INTRODUÇÃO

1.1 A relação entre aminoácidos e lignina.....	15
a. Origem da lignina.....	15
b. Ponto de vista químico: enzimas .....	18
1.2 Cálculos Teóricos.....	20
a. Teoria do Funcional de Densidade – DFT .....	20
b. Construção da função de onda e escolha de métodos .....	22
c. Cálculos de Energia de Interação (EI) e correções com BSSE.....	23
d. Análises de NBO.....	25
e. Cálculos de deslocamento químico ( $\delta$ ) .....	26
f. Relaxação.....	28

### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Procedimentos Experimentais.....	30
a. Preparo da Amostra.....	30
b. Extração da Lignina .....	31
2.2 Procedimentos Teóricos.....	31

### 3. RESULTADOS

3.1 Resultados Teóricos.....	32
a. Energias de interação em fase isolada corrigidas com BSSE .....	32
b. Energias de Interação considerando-se efeito de solvatação implícita (PCM) .....	39
c. Cálculos de NBO. ....	41
d. Cálculo de Deslocamento químico.....	43
3.2 Resultados Experimentais.....	45
a. Diferenças de $\delta$ .....	45
b. Relaxação.....	48
c. Resultados preliminares de Microscopia confocal .....	48

### 4. CONCLUSÕES ..... 49

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 52

### 6. APÊNDICES..... 58

## 1. INTRODUÇÃO

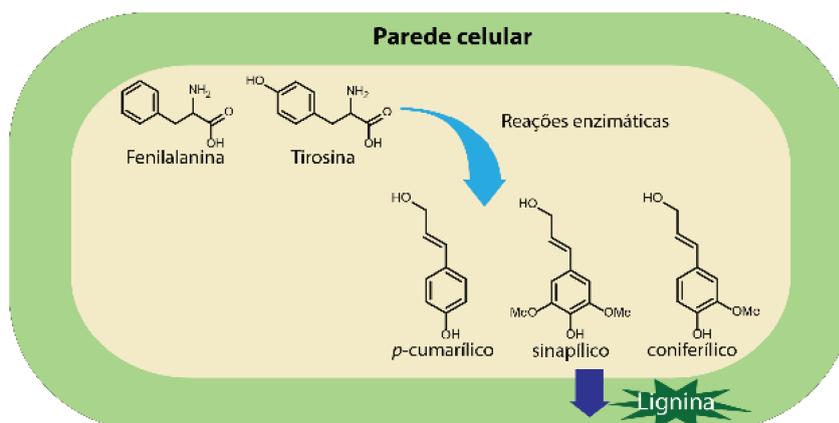
### 1.1 A relação entre aminoácidos e lignina

#### a. Origem da lignina

Diferentemente das células animais, as células vegetais são capazes de sintetizar seus próprios aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, a tirosina e o triptofano. Não apenas as células vegetais, os microrganismos como bactérias e fungos também são capazes de produzir tais aminoácidos, já os animais devem obtê-los por meio da alimentação rica nesses aminoácidos.<sup>1,2</sup>

A produção destes aminoácidos dentro da célula segue uma rota de sete etapas já descritas na literatura e tal rota é conhecida como caminho de Shikimate (*Shikimate pathway*, em inglês), este caminho também dá origem a diversos compostos aromáticos e metabólitos secundários na planta. Tohge e colaboradores descrevem as etapas da síntese da L-fenilalanina bem como toda cadeia de reações que este aminoácido pode passar dentro da célula dando origem a diversos outros compostos como Flavonóis, Antocianinas, Isoflavonas e dentre outras, a lignina.<sup>1</sup>

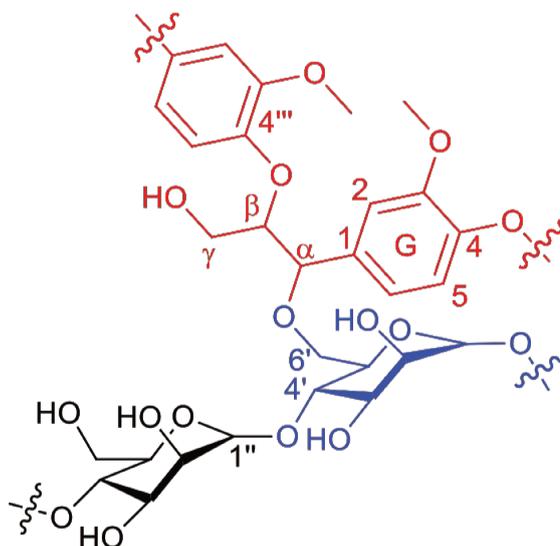
Para que a lignina seja formada, aminoácidos aromáticos como a fenilalanina e a tirosina sofrem diversas reações enzimáticas até formarem as unidades básicas que compõem a lignina, as quais são chamadas de monolignóis. Estes monolignóis são descritos na literatura como os álcoois *p*-cumarílico (H), sinapílico (S) e coniferílico (G) (vide Figura 1) e são sintetizados por enzimas localizadas nas proximidades do citosol e do retículo endoplasmático. Estes álcoois são então capazes de atravessarem a parede celular primária chegando à parede celular secundária onde são polimerizados por lacases e/ou peroxidases.<sup>3</sup>



**Figura 1.** Esquema ilustrativo da formação da lignina nas células vegetais.

A lignina desempenha papel crucial na planta, sendo responsável pela rigidez estrutural além de estar ligada ao transporte de água pelo xilema, dado o caráter hidrofóbico de sua estrutura e sendo relacionada à proteção da planta contra fatores externos.<sup>4</sup>

Sendo um material de origem sustentável, a lignina tem sido exaustivamente estudada pela ciência visando um destino mais nobre a este material que até o presente momento ainda é pouco valorizado<sup>56</sup>. As dificuldades que circundam o uso da lignina surgem desde o desafio de extraí-la da planta, onde se encontra ligada covalentemente à carboidratos como a hemicelulose. Nishimura e colaboradores<sup>7</sup> apresentaram evidências de que a lignina estaria ligada à hemicelulose por ligações do tipo  $\alpha$ -éter e obtiveram esses resultados por meio da Ressonância Magnética Nuclear com experimentos de HSQC, TOCSY e HMBC. Um exemplo desta ligação é apresentado na Figura 2.

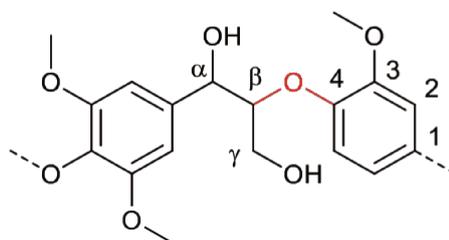


**Figura 2.** Exemplo de unidade de ligação  $\alpha$ -éter entre lignina e hemicelulose. A posição C-6' da unidade da manose (em azul) está ligada a subunidades da lignina (em vermelho) na posição  $\alpha$  das ligações  $\beta$ -O-4'''. Imagem adaptada da referência<sup>7</sup>.

A estabilidade destas ligações combinada com as interações intermoleculares entre as cadeias de lignina e hemicelulose são responsáveis pela dificuldade da extração deste material.<sup>5</sup> Pode-se encontrar diferentes abordagens para a extração da lignina, como o processo Kraft, com banhos alcalinos e elevadas temperaturas, o processo organossolv que emprega solvente s orgânicos, até mesmo processos que envolvem líquidos iônicos e, por fim, processos enzimáticos.<sup>5</sup> Neste trabalho foi usado o procedimento descrito por vom Stein e colaboradores<sup>8,9</sup>, que aborda o processo organossolv de maneira mais ambientalmente amigável ao usar um sistema bifásico composto por 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF) e uma solução aquosa de ácido oxálico para promover a hidrólise das unidades de hemicelulose conseguindo separar a lignina do material celulósico. Neste procedimento a lignina fica solúvel no 2-MeTHF e a porção celulósica e hemicelulósica ficam solúveis na solução aquosa de ácido.

Este procedimento se baseia no princípio de que diácidos carboxílicos possuem determinada seletividade para a hidrólise das porções amorfas da hemicelulose<sup>10</sup>, agindo como catalisadores, formando açúcares solúveis, principalmente xilose<sup>8</sup>. O 2-MeTHF é uma alternativa mais sustentável para remover a porção hidrofóbica do extrato. Os autores fizeram o acompanhamento da extração por RMN.

Mas a extração não é o único obstáculo presente, uma vez isolada a lignina ainda precisa ser quebrada em partes menores, já que se trata de uma macromolécula formada majoritariamente por ligações do tipo  $\beta$ -O-4, exemplificada na Figura 3. Todavia, sabe-se que a lignina possui diversas outras ligações que seriam oriundas de acoplamentos diferentes das unidades de monolignóis. Esta diversidade de conectividades ocorre devido a estabilidade que os anéis aromáticos possuem ao acomodar os radicais formados durante as reações de polimerização.<sup>11</sup>



**Figura 3.** Exemplo de trecho da molécula da lignina com destaque para a ligação  $\beta$ -O-4, em vermelho.

Existe uma miríade de trabalhos na literatura que busca encontrar uma maneira eficiente de promover a quebra das ligações da lignina<sup>12</sup>. O processo Kraft, mencionado anteriormente, que lança mão de banhos alcalinos e elevadas temperaturas provocam extensas alterações na estrutura da lignina, no entanto, por vezes é interessante que seja provocada uma fragmentação mais controlada da lignina, e trabalhos mais recentes almejam o rompimento de ligações mais específicas, que levariam a fragmentos mais vantajosos.<sup>6</sup>

Dentre os meios buscados para clivagem das ligações da lignina o emprego de enzimas tem se consolidado<sup>13,12</sup>, sendo empregado em biodigestores e até mesmo em escalas maiores, tornando mais factível o trabalho de decompor a lignina.

#### **b. Ponto de vista químico: enzimas**

Na natureza a lignina é decomposta por microrganismos que a degradam formando compostos alifáticos que serão integrados em suas vias metabólicas. Essa degradação é estudada em bactérias presentes no solo<sup>14</sup>. Observar como estas bactérias trabalham pode trazer informações capazes de auxiliar na valorização da lignina. Ao contrário da degradação da celulose e da hemicelulose que é majoritariamente hidrolítica, a decomposição da lignina é oxidativa<sup>15</sup>. Para que essas enzimas tenham ação é necessário que seus sítios ativos sejam

capazes de acomodar partes da estrutura da lignina, viabilizando as reações de transferência de elétrons.

Como a lignina é formada por unidades de álcoois coniferílicos e sinapílicos (Figura 1) a presença de grupos -OMe em suas porções aromáticas exige que uma deoximetilação seja empregada removendo estes grupos o que possibilita que demais reações ocorram na estrutura da lignina<sup>11</sup>. Mallinson e colaboradores<sup>16</sup> descreveram um citocromo P450 capaz de promover a deoximetilação sendo um importante aliado na degradação inicial da lignina. Em seu trabalho eles demonstram por meio de simulações computacionais que o sítio ativo desta proteína contém um anel heme e interagem com unidades de guaiacol sendo auxiliadas por resíduos do aminoácido fenilalanina.

Outros trabalhos também apontam os resíduos de aminoácidos capazes de interagir com unidades da lignina, como por exemplo Hallberg e colaboradores<sup>17</sup> apresentaram uma estrutura cristalina da enzima Piranose 2-Oxidase (P2Ox) cujo sítio ativo da oxidação conta com resíduos de tirosina, serina, isoleucina e fenilalanina. Esta enzima gera  $H_2O_2$  e permite uma oxidação regioseletiva, sendo idealizada como adequada para a degradação da lignina.

Lacases são enzimas com átomos de cobre que são capazes de oxidar substratos pelo uso de oxigênio molecular como aceptor de elétrons final. A lacase CotA foi estruturalmente estudada por Xie e colaboradores<sup>18</sup> quando complexada com ácido sinapílico, um derivado da degradação da lignina. No sítio ativo desta enzima, o ácido sinapílico é acomodado por resíduos do aminoácido treonina que estabelece uma ligação de hidrogênio com o substrato.

Os trabalhos mencionados acima apontam para a interação intermolecular entre os resíduos de aminoácidos e os substratos que correspondem a lignina, ou às frações de sua estrutura. Assim, fica clara uma relação entre aminoácidos e a lignina, não apenas devido a rota sintética desta, como também nos meios empregados para sua decomposição. Contudo, mais estudos são necessários para compreender melhor estas interações fornecendo novas perspectivas neste campo de pesquisa.

Uma abordagem alternativa para as dificuldades experimentais que circundam a lignina é uma melhor compreensão de sua estrutura e suas interações visando melhor compreendê-las, o que possibilita a proposta de rotas experimentais mais sólidas economizando tempo e reagentes. A química computacional pode auxiliar<sup>19,20</sup> neste processo ao empregar cálculos teóricos que simulam os fenômenos experimentais antes mesmo de recorrer à bancada. Certamente, como a

lignina se trata de uma molécula de elevada complexidade, recorre-se a simplificações estruturais dela, visando uma economia de tempo computacional. Tais economias são possíveis ao se empregar “compostos modelo da lignina” e por compostos modelo deve-se entender como aqueles que imitam os tipos de ligações (muitas vezes do tipo  $\beta$ -O-4) e grupos funcionais da lignina<sup>21</sup>. Desta forma é possível realizar simulações computacionais para sistemas moleculares mais complexos de forma simplificada.

## 1.2 Cálculos Teóricos

### a. Teoria do Funcional de Densidade - DFT

A química computacional permite que simulações<sup>2223</sup> possam ser feitas sem quaisquer custos de reagentes e resíduos em tempo considerável e à apreciável acurácia. Assim, o presente trabalho se dispõe deste recurso valioso para o estudo da interação aminoácido-lignina.

Os procedimentos computacionais possuem diferentes abordagens e sua escolha depende: da complexidade do sistema; dos recursos computacionais disponíveis e da acurácia desejada. Sejam eles a mecânica molecular, *ab initio* ou DFT, o procedimento matemático adotado difere afetando o tempo de cálculo e o resultado obtido. A mecânica molecular por exemplo, usa apenas a mecânica clássica para descrever os sistemas, já métodos semi-empíricos e *ab initio* são baseados nos princípios da física quântica e na resolução de funções de onda, diferindo no fato de procedimentos semi-empíricos adotarem diversos valores parametrizados de variáveis físicas (como comprimento de ligação, ângulos e etc.) para diminuir o tempo de cálculo, enquanto àqueles *ab initio* não os usam. Já a DFT usa a densidade eletrônica nos cálculos de energia o que consegue diminuir o custo computacional de forma considerável, sem comprometer a acurácia do cálculo.<sup>24</sup>

Talvez por este motivo, a DFT tem sido mais amplamente empregada na literatura<sup>17</sup> em estudos envolvendo lignina, pois fornece uma relação custo-benefício maior do que métodos *ab initio*. Há uma divergência entre especialistas na área, com relação a classificação destes procedimentos. Alguns englobam a DFT como um método *ab initio* enquanto outros segregam essa metodologia pelo fato de não ser possível melhorar sistematicamente o funcional, sendo necessário por vezes recorrer a valores experimentais ou calculados por métodos puramente *ab initio* como MP2. Alguns funcionais de DFT não usam parâmetros experimentais e seriam a priori *ab initio* em essência.

Para que seja possível uma compreensão melhor sobre como a DFT pode trazer vantagens quando se fala em cálculos teóricos de sistemas químicos, primeiro é preciso descrever uma função de onda de muitos elétrons em função da densidade eletrônica.

A base da DFT vem do teorema de Hohenberg-Kohn<sup>25</sup> que diz que todas as propriedades de uma molécula no estado fundamental podem ser determinadas pela função de densidade eletrônica no estado fundamental  $\rho_0(x,y,z)$ , ou seja, a energia do sistema no estado fundamental seria um funcional da densidade eletrônica também no estado fundamental, conforme apresentado na equação (1) a seguir:

$$E_0 = F[\rho_0] = E[\rho_0] \quad (1)$$

A maior dificuldade da DFT é encontrar qual é a forma deste funcional que não é sistematicamente melhorável.<sup>16</sup> Isso quer dizer que não há garantias de que a adição de novas parametrizações para diferentes propriedades químicas, trará melhores resultados. Desta forma, existem diferentes “conjuntos de parametrizações” que podem ser adotados de acordo com o sistema estudado, havendo vários métodos de cálculo por DFT. Neste trabalho serão empregados alguns métodos mais comuns com a intenção de avaliar qual melhor descreve a interação proposta.

Retomando o raciocínio que rege a DFT, o segundo teorema de Hohenberg-Kohn está relacionado com o teorema variacional, que diz que qualquer função de densidade fornecerá uma energia igual ou maior que a energia do estado fundamental. Em DFT essa energia eletrônica de uma densidade eletrônica corresponde à energia dos elétrons se movimentando sob o potencial do núcleo atômico, que é considerado separadamente das descrições eletrônicas.

Em 1965 Kohn e Sham<sup>26</sup> perceberam que poderiam descrever a energia do sistema considerando uma nuvem eletrônica estática, que é imediatamente descrita pela densidade eletrônica. A energia do estado fundamental de Kohn-Sham seria representada pela equação (2)

$$E_0 = \langle T[\rho_0] \rangle + \langle V_{Ne}[\rho_0] \rangle + \langle V_{ee}[\rho_0] \rangle \quad (2)$$

Onde o primeiro termo do lado direito,  $\langle T[\rho_0] \rangle$ , corresponde a energia cinética do sistema, o segundo se refere à energia eletrostática de atração elétron-núcleo e o último termo se refere à repulsão entre os elétrons. No entanto, a energia cinética e a repulsão elétron-elétron devem levar em conta um desvio em relação a um sistema de referência e um desvio da energia de repulsão de uma nuvem de carga eletrônica clássica, respectivamente. Essas considerações de

desvio introduzem um termo a mais na equação que correspondente ao termo de troca-correlação, que corrige os valores de repulsão e energia cinética aproximando-os de valores reais.

A expressão final para as equações de Kohn-Sham é da forma da equação (3):

$$-\frac{1}{2} \nabla_i^2 \psi_i + \sum_A \frac{Z_A}{r_{iA}} \psi_i + \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} \psi_i(\mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_2 + v_{XC} \psi_i = \epsilon_i \psi_i \quad (3)$$

Onde se deve destacar o termo  $v_{XC}$  que corresponde ao funcional de troca-correlação e deve ser escolhido com cautela, e  $\psi^{KS}$  são funções de onda de Kohn-Sham. A seguir, será apresentado como essas funções de onda são construídas de forma a descrever da melhor maneira os sistemas a serem estudados.

### b. Construção da função de onda e métodos de cálculo

Ao descrever o nível de teoria, é comum apresentá-los como uma combinação de método/função de base, onde o primeiro consiste no passo-a-passo a ser seguido, e o segundo consiste na função que será usada para a criação da função de onda que descreve os elétrons e consequentemente o sistema. Os tipos de funções mais comumente usados nestes cálculos são funções exponenciais e se resumem em dois tipos de orbitais, os do tipo Slater (STO – *Slater Type Orbitals*, do inglês) e orbitais tipo gaussiano (GTO – *Gaussian Type Orbitals*), as principais diferenças entre eles é que os STO's não possuem nós radiais e, portanto, precisam que estes sejam inseridos via combinações lineares destes orbitais, enquanto os GTO's não possuem um comportamento adequado próximo do núcleo e decaem muito rapidamente longe do núcleo. As expressões (4) e (5) para esses dois tipos de orbitais são apresentadas a seguir.<sup>24</sup>

$$\chi_{n,l,m}^{STO}(r, \theta, \varphi) = N Y_{l,m}(\theta, \varphi) r^{n-1} e^{-\zeta r} \quad (4)$$

$$\chi_{\xi,n,l,m}^{GTO}(r, \theta, \varphi) = N Y_{l,m}(\theta, \varphi) r^{2n-2-l} e^{-\zeta r^2} \quad (5)$$

Porém, visando economias de tempo computacional usam-se conjuntos de bases contraídas para descrever principalmente elétrons mais internos. Esses conjuntos de bases contraídas recebem nomes próprios que se referem aos seus criadores. Os mais comuns são as bases de Pople<sup>27</sup> e as de Dunning<sup>28</sup>. As primeiras são do tipo X-YZG, com o número X especificando quantas funções primitivas são usadas nos elétrons mais internos e Y e Z dizem respeito à quantas funções Gaussianas primitivas são usadas nos elétrons de valência. A

presença das duas letras Y e Z classifica o conjunto de bases como duplo zeta ( $\zeta$ ), que por sua vez significa que para cada orbital estão sendo usadas duas funções Gaussianas com coeficientes  $\zeta$  diferentes (vide expoente das equações 4 e 5).<sup>24</sup>

As bases de Dunning usam correlações consistentes para completar o limite de conjuntos de base, o que é feito por meio de técnicas de extrapolação<sup>28</sup>, e são descritas na forma cc-pVNZ, com cc-p correspondendo à *correlation-consisted polarized* e V indica que os conjuntos de base são do tipo *Valence only*. N por sua vez indica a ordem de grandeza de zeta, ou seja, D significa que se trata de um conjunto de bases construídos com duplo zeta, T para triplo e assim por diante.

Em ambas essas construções de conjuntos de base, funções podem ser adicionadas para melhor descrever os sistemas. Nas bases de Pople, + e \* significam que estão sendo adicionadas considerações de orbitais difusos (funções difusas na construção dos orbitais) e considerações de polarização (propriedades angulares aos orbitais para viabilizar sobreposição mais eficiente dos mesmos) respectivamente.<sup>24</sup> Nas de Dunning, o prefixo aug implica o uso de funções “aumentadas”, também denominados orbitais difusos.

Além das funções de base os métodos de cálculo também são bastante diversificados. Cada método é executado de acordo com uma parametrização que afetará de forma diferente o resultado. Assim existem métodos dentro da DFT que são mais adequados para cálculos de interação tipo  $\pi$ , para cálculo de propriedades termodinâmicas, interações intermoleculares e assim por diante.

### **c. Cálculos de Energia de Interação (EI) e correções com BSSE**

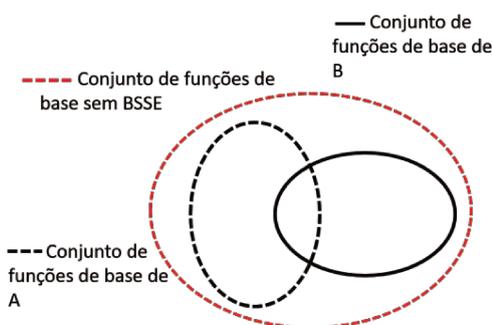
Grande parte dos fenômenos macroscópicos ocorre devido interações entre as nuvens eletrônicas dos átomos. A própria ligação química nasce destas interações, e a natureza destas tem grande efeito nas propriedades das moléculas. As interações intermoleculares são responsáveis por diversos fenômenos biológicos<sup>29</sup>, como por exemplo o transporte de substâncias para dentro da célula (ou fora), assim como o próprio transporte dos álcoois coniferílicos (exibidos na Figura 1) sintetizados dentro da célula para a parede celular secundária<sup>3</sup>, onde serão então polimerizados para formar a lignina nas células vegetais. Por este motivo, estudar interações intermoleculares permite uma compreensão mais completa da natureza desde o micro até o macro.

Essas interações possuem uma energia envolvida<sup>20,30</sup>, aqui denominada Energia de Interação (EI), essa energia determina se uma dada interação é favorável ou não, ou seja, se dois compostos são atraídos entre si ou repelidos. A interação deve afetar o sistema de forma a alterar sua energia final diminuindo-a ou aumentando-a, e pode-se avaliar o efeito da interação por meio do cálculo das energias eletrônicas dos compostos isolados e compará-las à energia dos compostos quando a interação ocorre. Desta forma podemos obter a EI por meio da equação 6.

$$EI = E_{\text{complexo}} - E_{\text{isolados}} = E_{\text{complexo}} - (E_{\text{composto modelo}} + E_{\text{aminoácido}}) \quad (6)$$

Onde  $E_{\text{complexo}}$  é entendida como a energia otimizada calculada para as duas espécies juntas, e  $E_{\text{isolados}}$  é a energia dos compostos quando não estão complexados, a dos compostos modelo da lignina e a dos aminoácidos analisados.

Quando se realiza cálculos de interação entre duas moléculas um cuidado que se deve ter é com relação a sobreposição de bases<sup>31,32</sup>, que pode ser entendida como a superestimativa da interação devido o compartilhamento de orbitais expandidos entre A e B. Ou seja, no complexo as funções de base de A são maiores do que as funções de A<sub>isolado</sub> e o mesmo para B. Desta forma essa sobreposição das bases expandidas de A com as de B leva a uma diminuição adicional da EI - que é negativa. A energia de interação quando se desconta a sobreposição das bases é menor. Este procedimento é normalmente realizado via um procedimento de cálculo chamado método *counterpoise*, ou contrapeso. A Figura 4 ilustra como este cálculo deve ser interpretado, onde a região de sobreposição entre as espécies A e B dá origem a um conjunto de funções de base de AB maior do que os usados nas espécies isoladas.

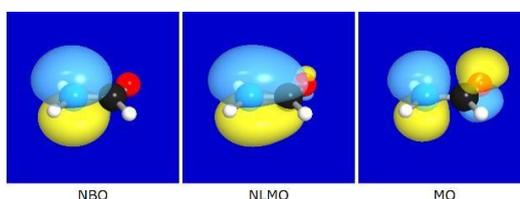


**Figura 4.** Ilustração de como um cálculo de counterpoise se faz necessário para evitar superestimativa da Energia de Interação.

Lewars<sup>24</sup> exemplifica a importância de se realizar cálculos de BSSE quando se compara a energia da Ligação de Hidrogênio entre duas moléculas de água. Calculando a diferença de energia entre duas moléculas de água isoladas e de um dímero de água ( $\text{H}_2\text{O}\cdots\text{HOH}$ ) chega-se a um valor de  $-14,8 \text{ kJ mol}^{-1}$  no nível de teoria MP2/6-311++G(3df,3dp), no entanto o valor experimental é de  $-13,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ . O valor calculado superestima a energia de interação em  $1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ , isso ocorre pois a energia calculada do dímero fornece um valor menor do que realmente tem, essa estabilização adicional vem da expansão do conjunto de funções de base de cada molécula, que empresta da sua vizinha algumas funções de base.

#### d. Análises de NBO

Outra forma de análise de interações que pode ser de grande ajuda é por meio da análise de Orbitais Naturais de Ligação (NBO<sup>33</sup> – *Natural Bonding Orbitals*, em inglês). Neste tipo de análise as funções de onda que descrevem o sistema e se espalham pela molécula dando origem aos orbitais moleculares (MO), são contraídas de forma que fiquem concentradas em um ou dois centros, se assemelhando a uma representação de Lewis dos orbitais<sup>34</sup>. A Figura 5 ilustra como seriam os aspectos de orbitais NBO comparando-os com NLMO e MO.



**Figura 5.** Representação comparativa entre Orbitais Naturais de Ligação NBO, Orbitais Moleculares Naturais Localizados (NLMO) e Orbitais Moleculares (MO). Extraído da referência <sup>35</sup>

Matematicamente isso é feito ao se construir um Hamiltoniano (operadores de Fock ou Kohn-Sham) para sistemas de um elétron, com energias de orbital NAO (*Natural Atomic Orbitals* – em inglês) associadas. Esse Hamiltoniano pode ser construído como uma matriz algébrica, o que permite uma separação das propriedades em intra-atômicas e interatômicas. Estes NAO's também possibilitam uma análise de população dos orbitais, que são calculados com o operador de densidade reduzida de primeira ordem. A expressão que fornece os Orbitais Naturais é dada pela equação (7)

$$\Gamma_{\Theta_k} = p_k \Theta_k \quad (k = 1, 2, 3, \dots) \quad (7)$$

O termo  $p_k$  representa a população (ocupância) da autofunção  $\Theta$ .

Os NBO's são descritos como conjuntos de NHO's (*Natural Hybrid Orbitals* – em inglês) combinados linearmente, que por sua vez são também combinações lineares otimizadas de NAO's. Se um dado NBO é considerado orbital mais interno ele pode ser descrito de forma semelhante a um NAO, mas quando se tem dois centros (A e B), o NBO ( $\Omega_{AB}$ ) é descrito como uma função normalizada de combinações lineares de dois orbitais NHO ( $h_A$  e  $h_B$ ), os coeficientes deste NBO descrevem o caráter químico da ligação. A equação (8) descreve o caráter químico da ligação química de acordo com os coeficientes  $a_A$  e  $a_B$ .<sup>36</sup>

$$\Omega_{AB} = a_A h_A + a_B h_B \quad \left\{ \begin{array}{l} a_A \gg a_B \rightarrow \text{ligação iônica} \\ a_A \approx a_B \rightarrow \text{ligação covalente} \end{array} \right. \quad (8)$$

Porém, o cálculo de NBO não consegue segregar uma ligação iônica de um par de elétrons isolado e quando >95% da densidade eletrônica se encontra em um desses centros, o cálculo considera como um par de elétrons isolado. Estas expressões também dão origem aos orbitais antiligantes ( $\Omega_{AB}^*$ ) desocupados que estão associados ao caráter aceptor de uma espécie química sendo importantes quando se estuda interações intermoleculares e ligações de hidrogênio<sup>37</sup>. Para completar o conjunto de bases que dão origem ao sistema o cálculo de NBO gera também orbitais chamados de Rydberg que possuem ocupância insignificante e não tem intuição química associada.

Esta interpretação de Lewis para as interações intermoleculares pode ser aplicada no sistema aqui estudado fornecendo uma boa intuição química do caráter doador-aceptor que descreveria a interação aminoácido-lignina.

#### e. Cálculos de Deslocamento Químico ( $\delta$ )

Além do cálculo de EI, cálculos de propriedades espectroscópicas permitem uma comparação com experimentos da variável que se deseja observar. Desta forma pode-se prever matematicamente qual será o deslocamento químico de um núcleo quando perturbado por um campo magnético externo aplicado. Métodos *ab initio* e DFT<sup>38,39,40</sup> são capazes de nos trazer este resultado, calculando a constante de blindagem ( $\sigma$ ) a partir da variação de energia com um campo magnético e o momento magnético nuclear.

Os procedimentos teóricos que fornecem os valores de deslocamento químico são baseados no Hamiltoniano de spin na presença de um campo magnético. Na expressão deste Hamiltoniano aparecem o tensor blindagem  $\sigma_k$  e um termo referente ao acoplamento indireto de spins. Deste Hamiltoniano sai a expressão para o tensor blindagem apresentada na equação (9)

$$\sigma_k = \frac{1}{3} \text{Tr} \sigma_k \quad (9)$$

Para correlacionar as propriedades espectroscópicas como tensor blindagem com as funções de onda usadas nos métodos *ab initio*, primeiramente é necessário expandir as equações de energia do sistema em função da indução magnética B e do momento magnético M. Derivando-se essa expressão expandida chega-se na relação apresentada pela equação (10).

$$\sigma_k = \frac{d^2 E(\mathbf{B}, \mathbf{M})}{d\mathbf{B} d\mathbf{M}_k} \quad (10)$$

De maneira geral, quando um sistema eletrônico sofre uma perturbação, a energia total do sistema muda. Seja uma perturbação  $\mathbf{x}$ , causada em um sistema de energia E, a expressão da energia será dada pela equação (11).

$$\frac{E(\mathbf{x})}{E^{(1)}} = E^{(0)} + \frac{1}{2} \mathbf{x} E^{(2)} \mathbf{x} + \dots \quad (11)$$

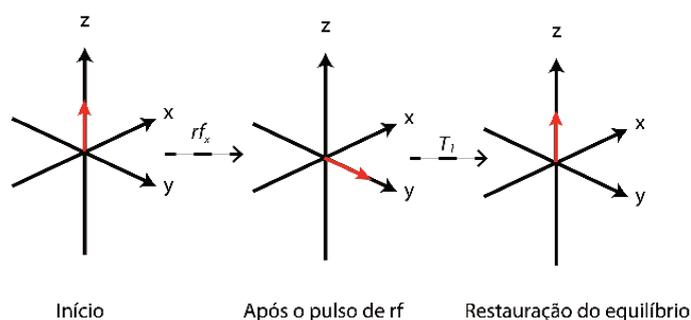
Agora, os coeficientes desta expansão são características do sistema molecular em um dado estado quântico e são relacionados às propriedades moleculares. Se a perturbação é estática (como o campo magnético constante  $B_0$ ) as propriedades moleculares podem ser calculadas por derivação. No caso do tensor blindagem uma derivada de segunda ordem é aplicada, conforme apresentado pela equação (10) acima<sup>40</sup>. Os resultados obtidos pelos procedimentos teóricos podem então ser referenciados, fornecendo os valores de deslocamento químico que poderão ser comparados com os dados experimentais de  $\delta$  coletados nos espectrômetros, tornando a RMN uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento do projeto.

A técnica de RMN se consolidou como técnica espectroscópica na química graças a diversidade de informações que se pode extrair da amostra sem alterar sua composição ou propriedades.<sup>41</sup> Os deslocamentos químicos juntamente com as constantes de acoplamento permitem que elucidações estruturais complexas sejam alcançadas. A literatura<sup>30,42</sup>, faz uso da técnica quando estuda lignina. Por este motivo, a RMN será empregada para avaliar mudanças no deslocamento químico de aminoácidos como Glicina (Gly), Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr)

e Treonina (Tre) em soluções aquosas antes e após a adição de lignina, avaliando se os aminoácidos apresentam interação com a lignina.

#### f. Relaxação

Outro fenômeno bastante importante na RMN é a relaxação, após um pulso de radiofrequência (rf) há uma perturbação no sistema de spins (amostra), e após o término do pulso os spins tendem a retornar à situação de equilíbrio inicial. O tempo para que ela reestabeleça o equilíbrio é conhecido como tempo de relaxação longitudinal ou  $T_1$ .<sup>43</sup> Ao se usar o sistema vetorial para descrever a magnetização dos núcleos da amostra, este fenômeno seria representado por um sistema cartesiano de coordenadas x, y e z com um vetor inicialmente em z (devido a presença de  $B_0$  em z) e imediatamente após o pulso de rf este vetor estaria em y (se o pulso for aplicado em x), após o retorno para a condição de equilíbrio o vetor se encontraria novamente em z. Isto é ilustrado pela Figura 6.



**Figura 6.** Ilustração da magnetização resultante antes e após o pulso de rf, de acordo com o esquema vetorial, demonstrando o fenômeno de relaxação longitudinal.

Os mecanismos pelos quais a relaxação ocorre dependem das movimentações moleculares que geram campos locais oscilantes permitindo transferência de energia do analito para o solvente, a importância nesta propriedade vem do fato de que é necessário ter magnetização resultante no plano xy para que a detecção ocorra, então, o início da aquisição deve ocorrer antes que toda magnetização retorne para a situação de equilíbrio, enquanto ainda há magnetização resultante no plano transversal.<sup>43</sup>

Além da relaxação longitudinal há também um mecanismo de perda de magnetização (ou perda de coerência) quando esta se encontra no plano xy, neste tipo de relaxação cada spin nuclear da amostra experimenta um campo local diferente, ocasionando uma distribuição de magnetizações ao longo do plano xy após o pulso de rf. Esta distribuição faz que, com o passar

do tempo, estas magnetizações se cancelam, resultando em um vetor de magnetização nulo no plano xy. Esta relaxação é conhecida como relaxação transversal e obedece uma constante de tempo  $T_2$ . A relaxação transversal afeta o perfil do sinal observado, já que se tem uma perda de sinal devido ao cancelamento dos vetores de magnetização no plano, quanto mais rápido ocorre esse cancelamento mais rápido é o decaimento exponencial que o detector observa durante a construção do FID (*Free Induction Decay* – do inglês Decaimento livre da indução). Quanto mais rápido é este decaimento exponencial mais largo é o sinal uma vez que a largura do sinal é  $1/T_2$ .<sup>43</sup>

Quando um spin A está próximo de um elemento eletronegativo, ou possuem espécies quadrupolares em solução, ele sentirá um campo magnético local ( $B_d$ ) diferente dos demais núcleos. Esse campo local induz um momento magnético dipolar nos spins, este momento magnético dipolar pode se alinhar de forma antiparalela ou paralela à magnetização resultante da solução. O movimento Browniano aleatório das moléculas faz com que esse momento magnético dipolar localizado mude sua orientação em relação a  $M_{xy}$  (a magnetização resultante no plano xy).

Na ausência de campos dipolares após um tempo  $\tau_c$  o momento magnético de um dado spin A terá rotacionado no plano transversal com um ângulo  $\phi$ .

$$\phi = \omega \tau_c = \gamma B_0 \tau_c \quad (12)$$

Onde  $\omega$  é a frequência do spin A. A presença desses campos dipolares induzidos mencionados anteriormente altera os ângulos de rotação após o mesmo  $\tau_c$  em  $\Delta\phi$ .

$$\Delta\phi = \pm \gamma B_d \tau_c \quad (13)$$

O sinal de  $\pm$  indica que a orientação do campo magnético  $B_d$  pode ser alinhado paralelamente ou antiparalelamente ao campo magnético resultante.

Se um longo tempo  $\tau_c$  se passa, de tal forma que  $t = n\tau_c$  o campo dipolar  $B_d$  teve  $n$  vezes a possibilidade de se alinhar com o campo resultante. Pode-se descrever que o aumento do número de possibilidades leva a uma distribuição das mesmas na forma de uma gaussiana que agora não se resume mais em ser simplesmente paralela ou antiparalela, mas se organiza em uma distribuição contínua.

As adições sucessivas de  $\Delta\phi$  dão origem a uma distribuição de frequências no momento da detecção, e essa distribuição de fases é dada por

$$\delta = \omega_d \tau_c n^2 \tau_c = \omega_d (\tau_c t)^2 \quad (14)$$

$$= \omega_d \tau_c ($$

Quando  $\delta$  atinge  $2\pi$  os spins de todos os núcleos A da amostra se encontram distribuídos quase completamente no plano xy. Se essa distribuição é homogênea a resultante dessas magnetizações é zero.

O tempo para que essa resultante nula seja alcançada é aproximadamente quando  $t=T_2$ , então

$$2\pi = \omega_d (\tau_c T_2)^2 \Leftrightarrow \frac{1}{T_2^2} = \frac{\omega_d}{2\pi} \tau_c \quad (15)$$

Assim percebe-se que existe uma relação inversamente proporcional entre a constante de tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ) e o tempo  $\tau_c$ . Sabe-se que  $\tau_c$  não está associado apenas à rotação do momento magnético induzido no spin A, mas também à rotação da molécula como um todo. Quanto maior a molécula, mais tempo ela demora para rotacionar, logo maior será seu *tempo de correlação*  $\tau_c$ .

Quanto maior o tempo de correlação maior a probabilidade de adições aleatórias de  $\Delta\phi$  à fase dos spins, gerando uma distribuição de frequências mais próxima de nula. Isso é observado no espectro como um alargamento de sinal causado pela distribuição das frequências.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Procedimentos experimentais

#### a. Preparo da amostra

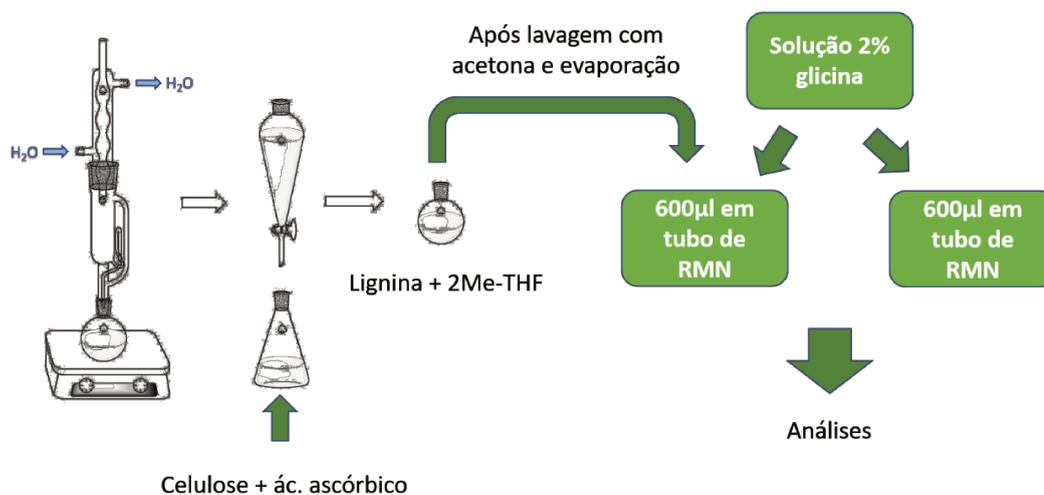
As amostras foram preparadas para um volume final de aproximadamente 600  $\mu\text{L}$  de solução em tubo de RMN de 5mm de diâmetro interno. Durante o preparo teve-se o cuidado de manter a concentração de aminoácidos a mais alta possível, próximo do limite de solubilidade. No caso da glicina (Gly) a solubilidade é de 24,99 g/100 mL (25 °C) o que corresponde a uma solução de <18% m/m quando se considera a densidade do solvente deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Em algumas amostras foi preparada uma solução 2% de Gly para diminuir o efeito da força iônica e melhoramento do procedimento de ajuste da homogeneidade do campo magnético (shimming).

Foram adicionadas quantidades graduais de lignina para avaliar o efeito que esta causa no deslocamento químico dos grupos funcionais do aminoácido. Todos os experimentos

realizados até o momento foram realizados com a Glicina pois se trata da amostra enriquecida com  $^{15}\text{N}$  disponível. As referências usadas foram  $\text{CDCl}_3$  para o núcleo de  $^{13}\text{C}$  e Cloreto de Amônio marcado com  $^{15}\text{N}$  para o núcleo de  $^{15}\text{N}$ . O cloreto de amônio foi inserido em um capilar de vidro e selado para que não interferisse nas interações que se deseja observar. Os espectros de  $^{15}\text{N}$  foram adquiridos com 32k pontos (TD), já a solução aquosa de glicina marcada foi possível observar o sinal do  $^{15}\text{N}$  com apenas 1024 scans, ao adicionar a lignina foi necessário acumular um número de scans de 10240.

### b. Extração de lignina

A extração da lignina com 2-metiltetrahidrofurano seguiu procedimento apresentado na literatura<sup>9</sup> com a realização de alguns ajustes, pois não se dispunha de vidraria e equipamentos de micro-ondas, assim empregou-se um sistema Soxhlet para extração da lignina. O tempo de extração foi de 4 horas. A Figura 7 ilustra o esquema experimental para obtenção da lignina a partir do capim elefante.



**Figura 7.** Esquema experimental adotado para obtenção de frações da lignina, a partir de capim elefante, sem causar danos estruturais excessivos.

### 2.2 Procedimentos teóricos

As estruturas dos compostos modelo (usados pela literatura) e dos aminoácidos foram otimizadas com as bases cc-pVDZ e 6-31G, para algumas estruturas as bases de Pople (6-31G) não puderam ser realizadas, e sendo as bases de Dunning as mais recentes, que consideram cálculos pós-HF, optou-se pelo emprego destas bases.

A avaliação dos métodos de cálculo foi feita pela comparação entre os métodos B3LYP, M06-2X,  $\omega$ B97XD, PW91, PBE1PBE (também chamado de PBE0) e PW6B95D3. Cada um destes métodos possui sua singularidade e foi adotado como referência o método PW6B95D3 por se tratar de um funcional mais moderno que de acordo com a literatura<sup>22</sup> é mais bem parametrizado para considerações de interação  $\pi$  principalmente em sistemas biológicos.

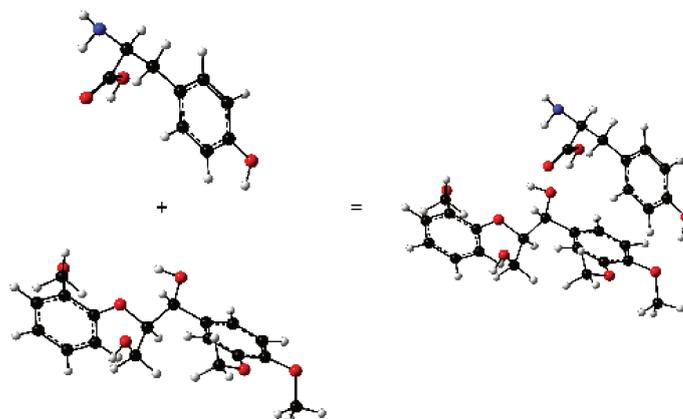
Todos os cálculos foram realizados no pacote Gaussian16, e após as otimizações as moléculas foram colocadas juntas para permitir a complexação, a energia obtida foi denominada  $E_{\text{complexo}}$ , e em posse dessa energia foi possível determinar a energia de interação somente devido à proximidade das moléculas através do cálculo de energia em single-point (estrutura fixa) de cada uma das moléculas separadamente. No entanto, não é absurdo supor que quando separadas as moléculas mudem sua conformação devido as interações com o solvente. Assim, um novo cálculo de energia das moléculas isoladas foi realizado, mas desta vez com as estruturas “relaxadas” para que mudassem sua conformação minimizando sua energia.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Resultados Teóricos**

##### **a. Energias de interação em fase isolada corrigidas com BSSE**

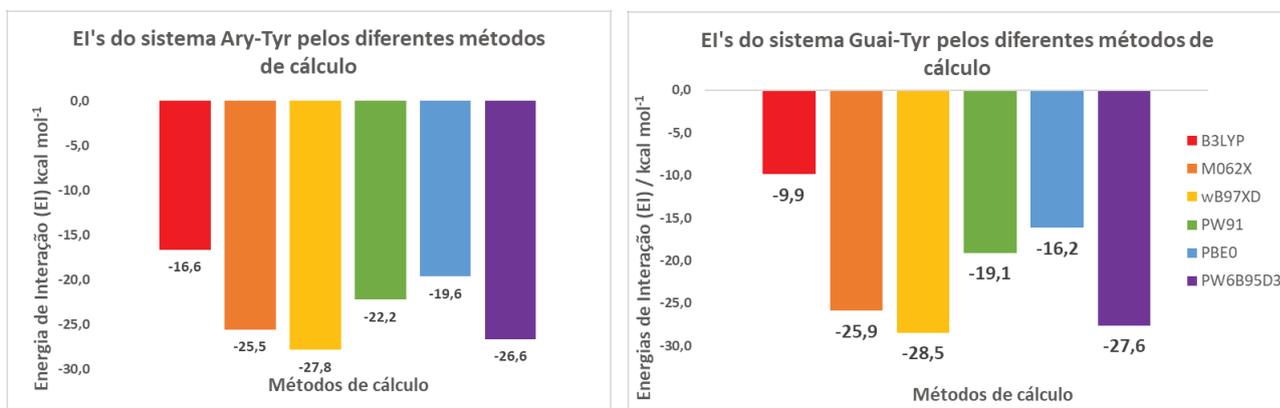
As estruturas foram inicialmente otimizadas em fase isolada com os níveis de teoria apresentados na seção anterior, as estruturas dos aminoácidos foram construídas considerando a forma neutra, ou seja, com o grupo amino na forma  $-\text{NH}_2$  e a carboxila na forma  $-\text{COOH}$ . O primeiro nível de teoria empregado foi o B3LYP que gera um cálculo consideravelmente ágil. Os demais métodos usaram a estrutura otimizada por B3LYP para realizarem suas próprias otimizações. Partiu-se da geometria proposta pela literatura<sup>44,45</sup> para as conformações de menor energia dos aminoácidos. Uma vez que as estruturas foram otimizadas isoladamente, as mesmas foram colocadas juntas para permitir a interação. A Figura 8 exemplifica como os sistemas foram adotados, antes e após a complexação para os cálculos de EI.



**Figura 8.** Ilustração das estruturas do aminoácido (Tyr neutra) e do composto modelo Aryloxy e do complexo formado entre as duas moléculas. As otimizações foram feitas no nível de teoria PW6B95D3/cc-pVDZ.

Como foram empregados diversos níveis de teoria, pode-se comparar os resultados de cada um deles sobre o sistema estudado. Se tratando de DFT, diferentes métodos possuem diferentes parametrizações que podem subestimar interações importantes ou até mesmo superestimá-las. Assim, pode-se escolher um sistema modelo-aminoácido e variar os métodos de cálculo analisando qual destes seriam mais adequados para a descrição do sistema.

Tomando como exemplo o aminoácido Tirosina (Tyr) quando complexado com os compostos modelo Aryloxy (Ary) e Guaiacyl (Guai) podemos analisar os resultados de Energia de Interação para os seis diferentes métodos estudados. O gráfico da Figura 9 exibe os valores obtidos e podemos ver que há, de fato, uma discrepância entre os métodos, significando que é importante ter em mente que o método empregado no cálculo pode gerar valores diferentes para o mesmo sistema. Neste caso, os métodos B3LYP e PBE1PBE (ou PBE0 conforme apresentado no gráfico) apresentaram os menores valores de EI.



**Figura 9.** Comparação do efeito dos métodos para o cálculo de EI nos sistemas Ary-Tyr (à esquerda) e Guai-Tyr (à direita), unidades dadas em kcal mol<sup>-1</sup>, métodos de cálculo rotulados por cores na legenda à direita.

Para melhor compreender como esses métodos variam, primeiramente devemos pensar em como são descritos matematicamente, e quando se trata de DFT o ponto mais crítico é resumido em um termo na equação que descreve a Energia eletrônica oriundo das interações entre elétrons, além da simples energia de repulsão descrita pela física clássica. Este termo recebe o nome de Energia de Troca e Correlação e os métodos computacionais diferem grandemente no modo como calculam esta energia.

Conforme apresentado na seção 1a todos os cálculos DFT usam a densidade eletrônica ( $\rho$ ) para descrever a distribuição dos elétrons na molécula, o modo mais simples de realizar esta tarefa é considerar que os elétrons são como uma nuvem de um gás ideal, uniforme no espaço delimitado fazendo com que a energia de repulsão entre estes seja minimizada. Este procedimento é conhecido como LDA (*Local Density Approximation*, do inglês), porém é uma forma demasiado simplista de descrever um sistema molecular, assim, é inserida uma correção que considera gradientes de densidade eletrônica descrevendo de uma forma mais realista a distribuição dos elétrons, que afinal estão mais concentrados em regiões mais próximas dos átomos e nas regiões de ligação química. Esta correção é chamada de GGA (*Generalized Gradient Approximation*) já a última alternativa de aprimoramento da descrição matemática reside em métodos meta-GGA, que empregam uma derivada de ordem superior nos cálculos de densidade eletrônica.<sup>24</sup>

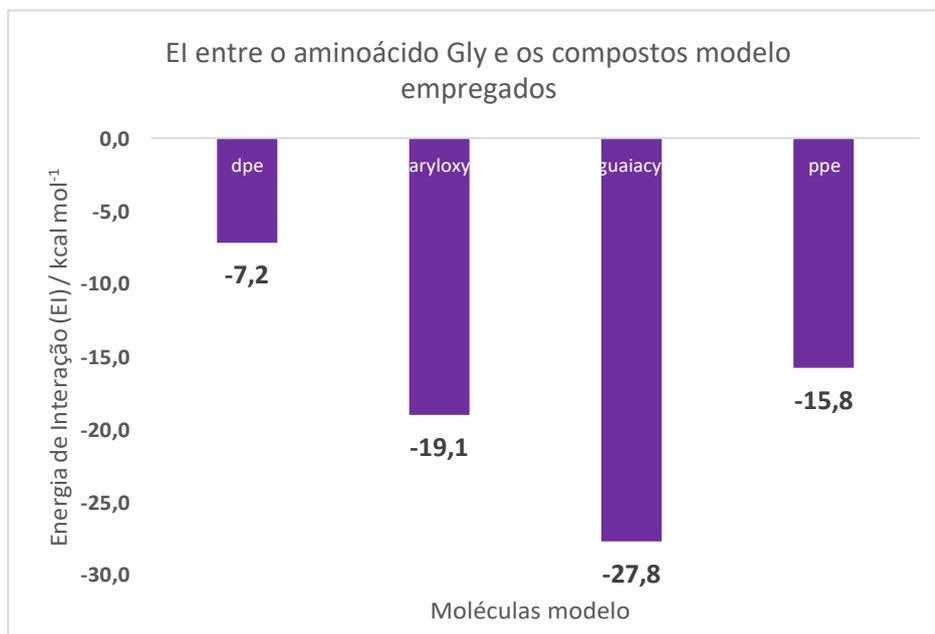
Ao descrever a energia de troca e correlação dos elétrons é possível combinar correções LDA e GGA para melhorar a descrição da nuvem eletrônica e além desta combinação é muito

comum considerar outro termo na descrição da Energia de Troca que é a Energia de Troca - Correlação de Hartree-Fock. A inclusão deste termo torna os funcionais híbridos e se mostraram bastante importantes para cálculos de DFT, uma vez que a simples descrição dos elétrons pela densidade (DFT puro) pode apresentar desvios significativos de dados experimentais.

O método B3LYP, por exemplo, é um funcional híbrido que emprega 20% de Energia de Troca-Correlação HF ( $E_{xc}^{HF}$ ), o PBE1PBE possui 25%, o PW6B95D3 conta com 28% e o método PW91 é um exemplo de DFT puro.<sup>46</sup> Além da contribuição de  $E_{xc}^{HF}$  é possível inserir outros tipos de correção que serão mais adequados de acordo com a necessidade do sistema. Já que no sistema Aryloxy-Tyr, assim como nos outros estudados neste trabalho, as interações intermoleculares podem ocorrer a distâncias relativamente maiores é necessário considerar que as funções de onda que descrevem os elétrons do sistema não decaiam tão rapidamente com o espaço; isso é possível por meio do uso de correções dispersivas<sup>47,22</sup>, que permitem uma sobreposição mais efetiva dos orbitais entre as duas moléculas complexadas.

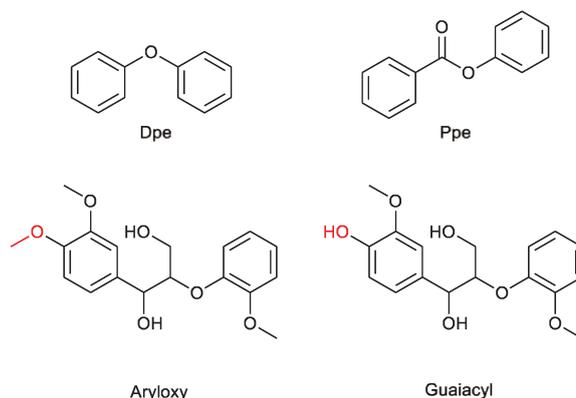
O emprego de HF inclui um operador que descreve a repulsão elétron-elétron, este operador é chamado operador de Coulomb e exibe uma dependência com a distância entre os elétrons 1 e 2 ( $r_{12}$ ) de  $1/r_{12}$ , esta descrição da repulsão frequentemente subestima energias de ionização e de interação inter/intramolecular ao decair muito rapidamente com a distância, o que não o torna adequado para avaliar interações entre distâncias consideradas maiores como no caso de complexos que tem sobreposição dos orbitais de fronteira distantes do núcleo. Portanto, essas correções de distância são importantes neste caso, e uma função que decai mais lentamente com  $r_{12}$  é empregada levando a valores mais representativos de energias de ionização e interações via espaço<sup>48</sup>. Funcionais híbridos apresentaram valores maiores da EI proposta, estes são os casos dos métodos  $\omega$ B97XD e os PW6B95D3 e M06-2X que são meta-GGA, onde o primeiro possui duas partes para descrever  $r_{12}$  uma *Long Range* e uma *Short Range*<sup>49</sup>, que são ponderadas por coeficientes para descrever melhor a repulsão ao longo do espaço, e os dois últimos que descrevem a densidade eletrônica de forma mais realista ao empregar a derivada segunda da densidade eletrônica ao longo do espaço.

Tendo em mente que o método  $\omega$ B97XD poderia superestimar a interação e que métodos como PW91 que é um DFT puro pode subestimar a interação, podemos adotar o PW6B95D3 como favorito para descrever a interação proposta<sup>50</sup>. Outra perspectiva que se deve manter em mente, é qual a estrutura modelo mais adequada para descrever o sistema. A Figura 10 compara as EI de acordo com as moléculas modelo empregadas neste trabalho.



**Figura 10.** Energias de Interação para as diferentes moléculas modelo empregadas neste trabalho, valores de energia em kcal mol<sup>-1</sup>.

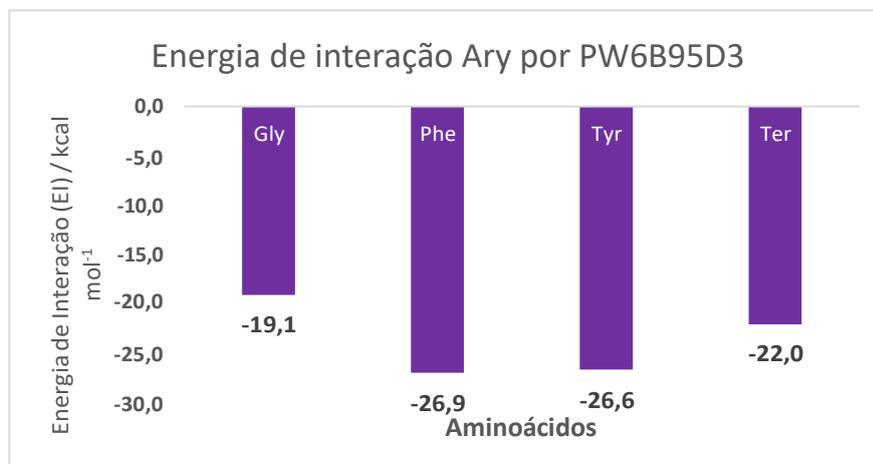
Foram escolhidas quatro moléculas para representar a lignina, este procedimento é bastante comum, visando a simplificação de uma macromolécula ao representar suas funções químicas em moléculas menores. Neste caso, todas as moléculas possuem grupos aromáticos, os quais estão presentes ao longo de toda a estrutura da lignina, além de funções oxigenadas, como por exemplo éter, hidroxilas e fenóis. É importante considerar essas funções pois as interações hidrofóbicas dos grupos aromáticos dificultam grandemente a solubilização deste material em água. As estruturas químicas destes compostos estão apresentadas na Figura 11 e todas já foram adotadas na literatura.<sup>30,5</sup>



**Figura 11.** Estrutura dos compostos modelos escolhidos para representar a lignina nos procedimentos teóricos.

Os nomes dos compostos foram substituídos por versões mais simplificadas para facilitar a compreensão. Dpe deve ser entendido como diphenylether do inglês, Ppe corresponde à phenylbenzoate e os demais compostos receberam nomes alternativos devido à complexidade de suas estruturas. Foi destacada em vermelho a diferença estrutural entre os compostos Aryloxy e Guaiacyl.

Observando o gráfico da Figura 10 é perceptível que compostos com uma estrutura mais complexa apresentaram uma energia de interação maior, dada a complexidade da lignina, estes compostos provavelmente representam de forma mais fiel a lignina e devem ser adotados como referência para a análise do efeito proposto neste trabalho. Assim, tendo em mente que o método escolhido como referência é o PW6B95D3 e que as moléculas modelos Guaiacyl (Guai) e Aryloxy (Ary) são as melhores para avaliar o efeito da interação, resta apenas avaliar qual aminoácido apresenta o melhor comportamento de interação. A Figura 12 traz exatamente essa informação, comparando para o composto Aryloxy as EI quando se varia o aminoácido, da esquerda para a direita vemos os aminoácidos Glicina (Gly), Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr) e Treonina (Tre).



**Figura 12.** Energias de Interação do composto modelo Aryloxy com os diferentes aminoácidos estudados. Energias fornecidas em kcal mol<sup>-1</sup>.

Da Figura 12 podemos ver que aminoácidos com grupos aromáticos (Phe e Tyr) exibem uma maior Energia de Interação, isto pode ocorrer devido a sobreposição de nuvens  $\pi$ <sup>45,47</sup>, ou pela simples geometria do complexo que possibilita uma sobreposição mais eficiente das interações. Experimentalmente espera-se que aminoácidos menores deveriam exibir bom comportamento de aumento de solubilidade uma vez que por possuírem moléculas menores poderiam adentrar as cavidades da lignina aumentando a solubilidade desta em água. É por este motivo também, que foram escolhidos aminoácidos ao invés de peptídeos.

Um detalhe que deve ser mantido em mente, é que quando se analisa a interação entre duas espécies químicas (A e B), os orbitais que serão usados para descrever cada uma delas ocuparão uma certa região do espaço, e ao otimizá-las na forma do complexo, o cálculo pode usar orbitais de uma molécula para descrever a outra, e vice-versa. Este empréstimo de funções de base entre as duas espécies pode ocasionar num valor superestimado de EI, assim um cálculo de correção de Sobreposição de Bases é necessário, conforme explicado na seção 1c. Nesta forma ao se calcular a energia do complexo, são definidas duas espécies distintas e o conjunto de bases de cada uma não será disponível para a outra, fazendo com que a energia de A e B sejam mais comparáveis com a energia de AB e empregar BSSE ocasionará numa diminuição de energia, devido complexação, menos acentuada. A Tabela 1 mostra as energias corrigidas para os compostos modelo, Ary e Guai com os diferentes aminoácidos calculados pelo nível de teoria PW6B95D3/cc-pvDZ.

**Tabela 1.** Valores de Energia de Interação (EI) calculadas para os compostos modelo Aryloxy e Guaiacyl, complexados com os aminoácidos estudados. Energias sem correção por BSSE e com correção, unidades em kcal mol<sup>-1</sup>.

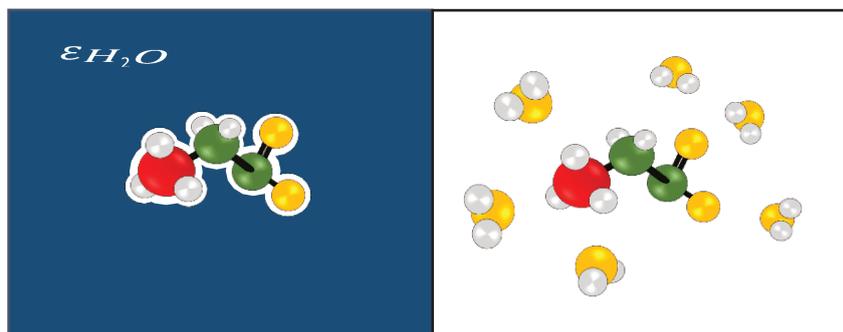
Aminoácidos	Aryloxy		Guaiacyl	
	EI <sub>raw</sub>	EI <sub>corrected</sub>	EI <sub>raw</sub>	EI <sub>corrected</sub>
Glicina	-19,1	-10,4	-16,0	-10,3
Fenilalanina	-26,9	-17,8	-16,4	-11,8
Tirosina	-26,6	-17,9	-27,6	-17,1
Treonina	-22,1	-13,1	-16,6	-11,5

Conforme mencionado no parágrafo anterior, as energias EI<sub>raw</sub> que são as energias não corrigidas por BSSE apresentam valores maiores, graças a sobreposição das bases. Por este motivo é importante considerar esta correção ao relatar os valores de interação entre duas moléculas. No entanto, experimentalmente as moléculas de aminoácido se encontram na forma Zwitteriônica, e para que suas estruturas fossem consideradas desta forma, foi necessário incluir consideração de solvatação implícita, e neste caso não é possível realizar um cálculo de BSSE.

#### b. Energias de Interação considerando-se efeito de solvatação implícita (PCM)

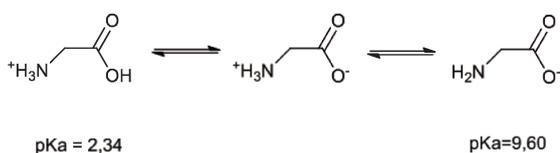
O modelo de solvatação implícita PCM (*Polarizable Continuum Method*)<sup>51</sup> considera a molécula em uma cavidade cercada com o potencial eletrostático do solvente escolhido, no caso a água. A Figura 13 ilustra a comparação entre um modelo de solvatação implícita (à esquerda), imersa em um campo de potencial com a constante dielétrica do solvente (a água no caso, representada no fundo em azul) e um modelo de solvatação explícita (à direita). Nestes modelos de solvatação explícita, moléculas do solvente são desenhadas, isto a priori seria uma representação mais fidedigna da realidade.

Semenov e colaboradores<sup>52,38</sup> fizeram um estudo sobre efeitos de solvente em cálculos de deslocamento químico de <sup>15</sup>N de azolas e azinas, neste estudo eles indicaram que a consideração de solvatação implícita (IEF-PCM) reduzia o erro absoluto no cálculo de  $\delta^{15}\text{N}$  em aproximadamente 46% no caso da piridazina em água. Um resultado ainda melhor era obtido considerando duas moléculas de água explicitamente. Porém, no trabalho aqui apresentado, os cálculos de PCM se mostraram bastante satisfatórios e por este motivo foram adotados.



**Figura 13.** Esquema ilustrativo comparando como seriam representações da glicina empregando-se o modelo de solvatação implícita (à esquerda, imerso em campo de potencial com a constante dielétrica do solvente – a água representada em azul no caso) e explícita (à direita), com moléculas de água construídas ao redor da Glicina.

Ao se considerar o efeito de solvatação implícita foi possível realizar otimizações dos aminoácidos na forma zwitteriônica, correspondendo melhor a realidade dada a existência das espécies químicas no pH trabalhado. Quando se analisa o pKa dos grupos funcionais dos aminoácidos escolhidos pode-se propor uma estrutura para o aminoácido conforme sugerido na Figura 14. No caso da glicina, o pH das soluções ficava na faixa de 5,5.



**Figura 14.** Formas estruturais da Gly em solução aquosa como função do pH.

Em fase aquosa a Gly pode apresentar três formas dependendo do pH de trabalho. Em pH's abaixo de 2,34 a concentração de íons  $\text{H}^+$  é tão elevada que ambos os grupos funcionais estão protonados, por outro lado em pH's acima de 9,60 a concentração destes íons é tão baixa que ambos os grupos funcionais estão desprotonados. Assim, na faixa de pH adotada neste trabalho (~5,5) pode-se supor que a maioria das moléculas de Gly estarão na forma Zwitteriônica, com o grupo amino protonado e o grupo carboxilato desprotonado. A Tabela 2 apresenta os valores de EI para os compostos modelo Ary e Guai e os quatro aminoácidos, atenta-se para a comparação entre as colunas que apresentam os valores de EI da fase isolada (aminoácido neutro) e a coluna PCM que contém os aminoácidos na forma Zwitteriônica.

**Tabela 2.** Valores de Energia de Interação (EI), em kcal mol<sup>-1</sup>, calculados no nível de teoria PW6B95D3/cc-pvDZ para os sistemas em fase isolada e os sistemas com consideração de solvente implícito (PCM).

Aminoácido	EI / kcal mol <sup>-1</sup>			
	Ary	Ary (PCM)	Guai	Guai (PCM)
<b>Glicina</b>	-19,1	-22,4	-17,4	-25,9
<b>Fenilalanina</b>	-26,9	-23,4	-16,5	-25,1
<b>Tirosina</b>	-26,6	-19,3	-27,6	-25,1
<b>Treonina</b>	-22,1	-23,2	-16,7	-24,4

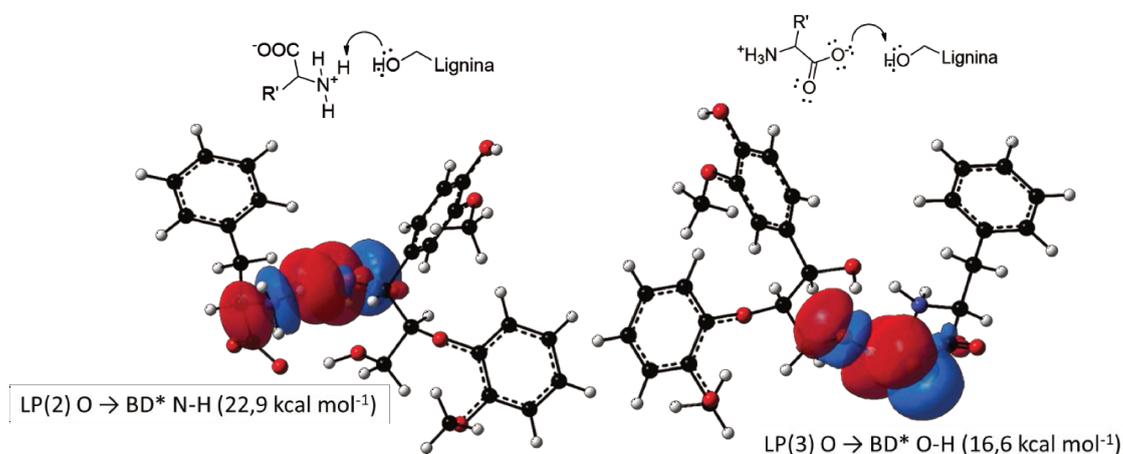
Pela Tabela 2 percebe-se que houve pequenas oscilações nos valores de EI, alguns aminoácidos exibiram aumento de EI enquanto outros diminuíram. Ressalta-se que não estão sendo comparados os valores de EI na fase isolada corrigidos por BSSE, uma vez que não é possível realizar a correção de sobreposição de bases com efeito de solvatação. Um sistema que chama a atenção ao se considerar a solvatação é a Treonina, que quando complexada com o composto modelo Guaiacyl apresentou considerável aumento na EI.

Considerar a forma zwitteriônica dos aminoácidos é correta pois dado o pKa dos grupos a maioria dos aminoácidos permaneceria nesta forma em solução. A pouca solubilidade dos aminoácidos em água especialmente aqueles como a Tyr e a Phe que possuem grupos aromáticos em sua estrutura pode ser um fator auxiliador na interação entre estes compostos e os compostos modelo da lignina. A dificuldade de solubilidade em água foi um desafio experimental, a proposta é inserir um solvente orgânico capaz de solubilizar de forma mais eficiente os dois compostos (lignina e aminoácido) e avaliar o efeito do solvente na interação.

### c. Cálculos de NBO

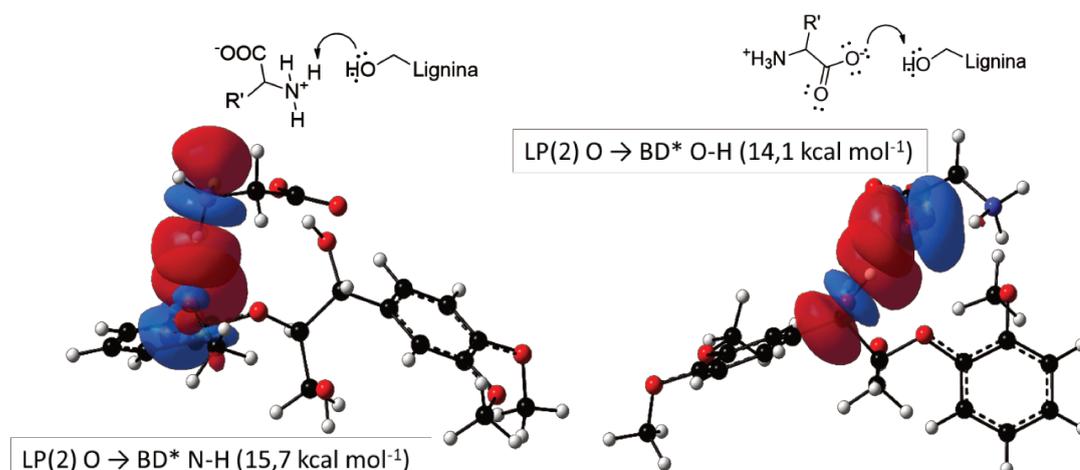
Conforme introduzido no item 1.2.d existem outros métodos de análise teóricas que podem nos trazer informações interessantes, a análise de Orbitais Naturais de Ligação (NBO – *Natural Bonding Orbital*, do inglês) é uma delas, neste tipo de análise os orbitais moleculares construídos a partir da função de onda ( $\psi$ ) que são deslocalizados por toda a molécula passam a ser localizados em torno de um centro (*lone pairs*) ou dois centros (ligação química). Ao localizar os orbitais pode-se analisar as energias e ocupações de elétrons de uma forma mais palpável pois se assemelha às descrições de Lewis sobre orbitais e elétrons.<sup>36</sup>

A partir do resultado, imagens podem ser geradas permitindo uma análise mais visual da sobreposição dos orbitais que estão envolvidos na interação proposta. E é isto que a imagem a seguir na Figura 8 apresenta, exibindo os orbitais antiligantes ( $\sigma^*$ ) da ligação N-H do grupo  $\text{NH}_3^+$  recebendo densidade eletrônica do átomo de Oxigênio do grupo OH da estrutura do composto modelo, bem como a doação de densidade eletrônica dos átomos de oxigênio do grupo carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) para o orbital  $\sigma^*_{\text{O-H}}$  do composto Guaiacyl. Para a construção dos orbitais adotou-se um isovalue de 0,02 e são apresentados a seguir na Figura 15.



**Figura 15.** Orbitais NBO gerados para o complexo Guai-Phe, à esquerda interação via grupo amino, a imagem à direita mostra a interação via carboxila. Isovalues de 0,02 e valores de energia em  $\text{kcal mol}^{-1}$ .

Esta imagem ilustra que as interações aqui destacadas desempenham um papel considerável, pois as energias envolvidas na sobreposição deste orbitais é significativa e da mesma magnitude da própria EI. Com um valor de deslocalização de densidade eletrônica destacável como este, espera-se uma influência detectável no deslocamento químico, já que os cálculos de NBO indicaram uma migração de densidade eletrônica energeticamente significativa. O mesmo fenômeno foi observado para as demais configurações de complexo. Outro exemplo é mostrado para a configuração Ary-Gly, mostrando que até mesmo o aminoácido Gly que não exibe as maiores EI's ainda possui uma considerável interação pelos cálculos de NBO, este resultado é apresentado na Figura 16.



**Figura 16.** Orbitais NBO gerados para o complexo Ary-Gly, à esquerda interação via grupo amino, a imagem à direita mostra a interação de via grupo carboxilato. Isovalues de 0,02 e valores de energia em kcal mol<sup>-1</sup>.

Como os cálculos de NBO (Figura 16) indicaram uma doação de densidade eletrônica da carboxila (COO<sup>-</sup>) para a estrutura da lignina (ou composto modelo), espera-se um aumento no deslocamento químico do <sup>13</sup>C da carbonila. Para o grupo amino, como o par de elétrons do átomo de Nitrogênio já está comprometido com um Hidrogênio excedente dando forma a estrutura Zwitteriônica do aminoácido, a doação de densidade eletrônica dos átomos de oxigênio da lignina para o orbital antiligante N-H deve levar a um aumento no comprimento desta ligação, provavelmente ocasionando uma redistribuição desta densidade eletrônica de volta para o átomo de Nitrogênio, diminuindo seu deslocamento químico.

#### d. Cálculo de Deslocamento químico

Na seção 1.2.e foi descrito como os procedimentos matemáticos aqui empregados usam a energia eletrônica ( $E_{el}$ ) para descrever os sistemas, onde primeiro deve-se calcular  $E_{el}$ , que é necessária para identificar um Hamiltoniano de spin que vá descrever o efeito do campo magnético sobre a energia eletrônica. A derivada segunda deste Hamiltoniano (que corresponde a uma perturbação de segunda ordem) com relação à indução magnética nos fornece o tensor blindagem ( $\sigma$ ), que então será usado para calcular o deslocamento químico. O procedimento empregado neste trabalho é amplamente conhecido como GIAO (*Gauge Independent Atomic Orbital*) e se refere à propriedade da função vetorial que não depende da escolha da origem e descrevem Orbitais Atômicos de London.<sup>40</sup>

É importante salientar que ao se calcular o deslocamento químico sempre é usada uma referência. Esta referência também foi calculada no nível de teoria pbe1pbe/cc-pvTZ e ao se expressar o resultado final esta deve ser levada em conta. Como experimentalmente foi usado um capilar selado com uma referência de  $^{15}\text{N}$ , deve-se somar o valor do deslocamento químico desta referência interna, com o valor do deslocamento químico calculado. A expressão 4 exemplifica o cálculo de  $\delta$ .

$$\delta = \sigma_{\text{núcleo}} - \sigma_{\text{ref}} + \delta_{\text{ref int}}$$

Com  $\sigma_{\text{núcleo}}$  se referindo ao tensor blindagem calculado para o núcleo de interesse,  $\sigma_{\text{ref}}$  sendo o tensor blindagem calculado para o núcleo da referência e  $\delta_{\text{ref int}}$  sendo o deslocamento químico em ppm observado experimentalmente para a referência. Para o cálculo de deslocamento de  $^{13}\text{C}$  não há a necessidade de somar o deslocamento químico da referência.

Nos procedimentos teóricos foram calculados os deslocamentos para todos os possíveis cenários, ou seja, com todas as moléculas modelo e com todos os aminoácidos, contudo experimentalmente só se dispunha no laboratório de alguns aminoácidos que não são marcados e apenas o aminoácido Glicina marcado com  $^{15}\text{N}$ . Caso os cálculos descrevam bem o deslocamento da Glicina marcada, é provável que as extrapolações para os demais aminoácidos sejam representativas. A Tabela 3 traz os valores teóricos de deslocamento químico obtidos no nível de teoria pbe1pbe/cc-pvTZ.

**Tabela 3.** Valores calculados de deslocamento químico ( $\delta$ ), em ppm, dos núcleos de  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  dos aminoácidos Gly, Phe, e Tyr isolados e complexados com os compostos modelo Aryloxy e Guaiacyl. As formas isoladas correspondem à mesma geometria do complexo, a forma otimizada corresponde à conformação de menor energia do aminoácido.

		$\delta$					
		$^{15}\text{N}$			$^{13}\text{C}$		
		Complexo	Isolado	Otimizado	Complexo	Isolado	Otimizado
<b>ary-</b>	<b>gly</b>	36,9	39,3	36,5	172,9	170,9	171,6
	<b>phe</b>	43,4	35,3	43,5	175,2	153,9	173,8
	<b>tyr</b>	40,5	40,8	38,1	183,4	182,6	181,5
<b>guai-</b>	<b>gly</b>	39,1	40,4	36,5	175,7	171,5	171,0
	<b>phe</b>	43,6	50,5	43,4	175,8	173,8	173,7
	<b>tyr</b>	38,8	39,4	38,1	182,0	180,1	181,5

De acordo com a Tabela 3 vemos que existe pouca diferença no valor do deslocamento químico do aminoácido quando complexado e quando isolado. A diferença entre as formas isolada e otimizada dizem respeito à geometria do aminoácido, na forma isolada adotou-se a mesma geometria que o aminoácido exibe quando complexado com a lignina, na forma otimizada considerou-se a conformação de menor energia do aminoácido livre em solução. É importante fazer essas considerações pois faz sentido imaginar que o aminoácido que não estiver complexado adotaria sua conformação mais estável que pode diferir ligeiramente da forma complexada.

Pela Tabela 3 também vemos que as diferenças de deslocamento são pequenas, a isso pode-se atribuir o fato de os dois grupos de carga do aminoácido estarem muito próximos na estrutura, fazendo com que um interfira no outro, diminuindo a disponibilidade eletrostática para interagir com outros grupos. As pequenas diferenças nos valores de  $\delta$  fazem com que seja difícil extrair informações sobre tendências, no entanto num contexto geral pode-se afirmar que o aminoácido na forma otimizada, que se acredita ser a conformação preferida pelo aminoácido quando livre em solução, apresenta menores valores de deslocamento. A lignina estaria, portanto, desblindando os núcleos analisados, ou seja, retirando densidade eletrônica dos núcleos em questão, resultando em um leve aumento no deslocamento químico, principalmente no núcleo de  $^{13}\text{C}$  da carbonila.

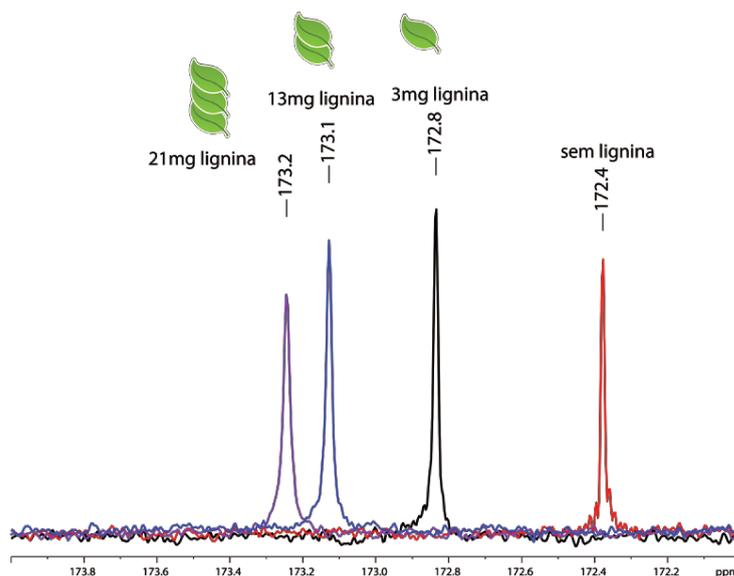
Conforme indicado pelos cálculos de NBO a deslocalização de densidade eletrônica da carboxila para a lignina realmente ocasiona um aumento nos valores de  $\delta$ , o que está apresentado na Tabela 3. Para melhor embasar os resultados teóricos recorreu-se ao equipamento de RMN para avaliar o efeito da adição de lignina a uma solução aquosa de aminoácido, Glicina neste caso.

## **3.2 Resultados Experimentais**

### **a. Diferenças de $\delta$**

Os experimentos foram realizados em campo de 600 MHz e em tubo de 5 mm de diâmetro interno. A baixa razão magnetogírica ( $\gamma = -4,3142 \text{ MHz T}^{-1}$  contra  $42,576 \text{ MHz T}^{-1}$  para o núcleo de  $^1\text{H}$ ) do  $^{15}\text{N}$  combinada com a baixa abundância natural de 0,4% fazem com que o estudo deste núcleo seja bastante desafiador. Os espectros completos com seus parâmetros de aquisição e processamento serão apresentados no item Anexos.

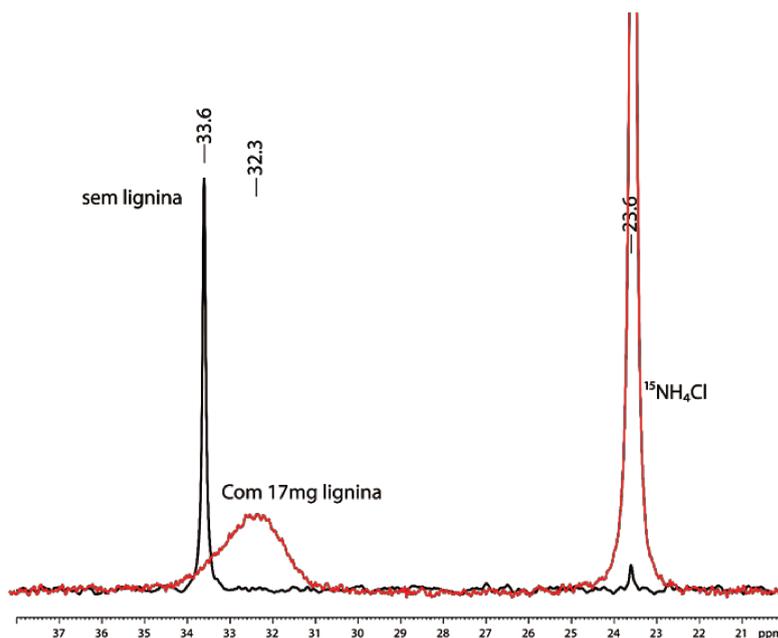
A Figura 17 mostra a ampliação do sinal de  $^{13}\text{C}$  da carbonila conforme foram adicionadas massas de lignina a uma solução estoque de 2% de Glicina não marcada. As amostras foram preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$  com capilar selado de  $\text{CDCl}_3$  para referência.



**Figura 17.** Sobreposição dos sinais de  $^{13}\text{C}$  da Carbonila do aminoácido Glicina após adição de massas de lignina a uma solução 2% de Glicina em  $\text{D}_2\text{O}$ . Referências ajustadas com capilar selado de  $\text{CDCl}_3$ . Experimento feito em equipamento Bruker Avance III de 600MHz.

É possível observar na Figura 17 que a crescente adição de massa de lignina a cada uma das soluções de glicina causa um deslocamento do sinal da carbonila deste aminoácido para maior deslocamento químico. Se compararmos o sinal em 173,2 ppm referente a solução com 21 mg de lignina e compararmos o valor de  $\delta$  com o valor calculado que para a configuração Ary-gly foi de 172,9ppm vemos que o deslocamento químico coincide com o do aminoácido na forma complexada, já que de acordo com a Tabela 3 as formas isolada e otimizada do aminoácido produziram valores ligeiramente menores de deslocamento químico.

De acordo com a literatura, uma solução saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  marcado com  $^{15}\text{N}$  deve ter um deslocamento químico de 23,6 ppm e assim pode-se analisar amostras de Gly marcada com um capilar selado com solução saturada de Cloreto de Amônio isotopicamente marcado. A Figura 18 mostra a ampliação do sinal de  $^{15}\text{N}$  da glicina, antes e depois da adição de lignina à solução.



**Figura 18.** Sobreposição dos sinais de  $^{15}\text{N}$  do grupo Amino do aminoácido Glicina após adição de lignina a uma solução de Glicina em  $\text{D}_2\text{O}$ . Referências ajustadas com capilar selado de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Experimento feito em equipamento Bruker Avance III de 600MHz.

De acordo com a Figura 18 vemos que ao contrário da carbonila, ao adicionar lignina o nitrogênio exibiu um deslocamento químico ligeiramente menor, de 33,6 ppm para 32,3 ppm. Conforme discutido no item 5-c os cálculos de NBO mostram uma doação de densidade eletrônica de pares de elétrons isolados de átomos de oxigênio da lignina para o orbital  $\sigma^*_{\text{N-H}}$  o que aumentaria o comprimento da ligação enfraquecendo-a e possivelmente tornando o par de elétrons do átomo de N mais localizado neste núcleo. De acordo com a Tabela 4 os valores calculados de  $\delta$  também não indicam um aumento no deslocamento químico do Nitrogênio e isto é o que se observa no sinal obtido experimentalmente. Como o grupo  $\text{NH}_3^+$  está interagindo com a lignina o par de elétrons do nitrogênio se encontraria mais disponível para este núcleo aumentando a blindagem causada pela nuvem eletrônica, ocasionando uma diminuição no deslocamento químico.

Contudo, é importante observar que o deslocamento químico em ambos os núcleos monitorados não é a única mudança observada, o perfil dos sinais também mudou drasticamente após a adição de lignina, esta mudança de perfil surge devido a outra propriedade sempre presente em análises de RMN, a relaxação.

### **b. Relaxação**

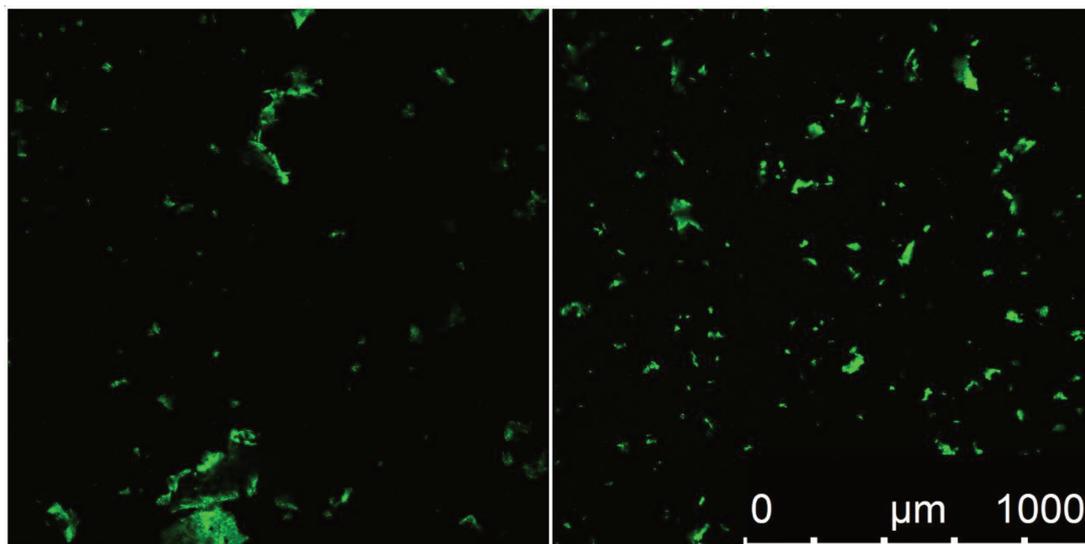
Quando se analisa o perfil dos sinais da Figura 18, fica nítido que após a adição de lignina o sinal ficou mais largo, isso fica evidente quando se compara o sinal da referência, que na curva vermelha teve sua intensidade cortada para que se pudesse observar o sinal do aminoácido com clareza. O alargamento do sinal implica em uma redução do tempo  $T_2$  que ocorre devido a uma relaxação mais rápida causada pela presença de uma molécula grande como a lignina.

O fato de que a lignina - que não está sendo observada no espectro - afeta a relaxação do aminoácido, é em si um indicativo da interação proposta, com a molécula pequena com  $T_2$  longo adotando o perfil de uma molécula grande como a lignina com  $T_2$  curto. Esse alargamento de sinal é explicado no item 1.2.f da Introdução.

### **c. Resultados preliminares de Microscopia confocal**

Além dos experimentos de RMN foram realizados alguns testes por meio da Microscopia confocal, estes testes foram realizados em um Microscópio Confocal de Fluorescência de Varredura a Laser, Leica, modelo TCS SP5 AOTS.

Este equipamento lança um feixe fluorescente na amostra e permite a visualização da amostra por meio da radiação emitida. O comprimento de onda adotado para a amostra foi de 254nm, que é um comprimento de onda adotado para compostos naturais com grupos aromáticos. A Figura 19 mostra como as partículas de lignina se comportaram de em solução aquosa antes e após a adição de glicina à solução. Os testes foram feitos em triplicata e as soluções foram homogeneizadas em um vortex por 20 segundos.



**Figura 19.** Imagem de microscopia confocal de fluorescência a laser nas soluções de lignina em água, antes (à esquerda) e depois (à direita) da adição de glicina à solução. Legenda de tamanho de partícula é a mesma para ambas as imagens.

A Figura 19 apresenta um resultado interessante, é perceptível que o tamanho médio das partículas parece ter diminuído após a adição de glicina à solução. Mais uma vez os resultados indicam para a possível existência da interação proposta com a glicina agindo como uma ponte entre a lignina e a água. As partículas menores seriam observadas quando a lignina possui melhor dispersão no meio, o que seria possível pela ação do aminoácido.

Para confirmação deste resultado é necessário que as análises sejam repetidas diversas vezes e que se obtenha uma distribuição do tamanho médio das partículas, no entanto os testes preliminares se mostraram promissores.

#### 4 CONCLUSÕES

Após a extensa análise dos resultados percebe-se que é importante ter em mente que a escolha do método de cálculo pode alterar o resultado obtido, e que o método PW6B95D3 que possui considerações de dispersão é o mais indicado para o sistema proposto pois não superestima as Energias de Interação (EI) e nem as subestima, como no caso de um funcional DFT puro.

Para uma melhor descrição do sistema empregaram-se diferentes compostos modelo da lignina, e observou-se que estruturas mais complexas como a Aryloxy e o Guaiacyl (Figura 11)

apresentaram as maiores EI pois possuem mais funções químicas capazes de exibir a interação proposta e, portanto, foram adotadas como melhores para descrever o sistema a ser estudado.

Os agentes de interação, os aminoácidos, também foram diversificados para um mapeamento de qual exibiria uma interação mais eficiente. A Figura 12 indicou que aminoácidos com grupos aromáticos foram os que apresentaram as maiores EI, provavelmente devido interação entre as nuvens  $\pi$  aromáticas dos dois compostos ou simples repulsão frente ao solvente (água) devido hidrofobicidade de ambos os compostos, o que é interessante quando se observa o fato de que a Phe e a Tyr são os aminoácidos que dão origem a lignina na célula vegetal.

Também foi possível concluir a importância do efeito de solvatação na descrição teórica do sistema estudado. A consideração implícita de solvatação da água permitiu descrever o aminoácido na forma Zwitteriônica. Tendo em mente que a forma Zwitteriônica corresponde à realidade uma análise de NBO foi realizada permitindo verificar que existe uma interação entre pares de elétrons da carboxila e orbitais antiligantes da lignina, e também entre pares de elétrons da estrutura da lignina e o orbital antiligante do N-H do grupo amino. Esta interação apresentou valores significativos de energia (entre 14 e 22 kcal mol<sup>-1</sup>).

O cálculo de deslocamento químico indicou que para a carbonila a presença da lignina causa um aumento no valor de  $\delta$  do <sup>13</sup>C enquanto não gera mudança significativa no núcleo de <sup>15</sup>N. A deslocalização de pares de elétrons da carbonila para a lignina explica este comportamento.

Experimentalmente foi confirmado que a carboxila doa densidade eletrônica para a lignina exibindo aumento gradual de deslocamento químico conforme se aumenta a massa de lignina presente na solução. O experimento de <sup>15</sup>N indicou uma redução no deslocamento químico devido a adição de lignina, isto deve-se ao fato de que a doação de densidade eletrônica dos átomos da lignina para os orbitais antiligantes N-H, conforme observado nas análises de NBO, deixa o par de elétrons do átomo de Nitrogênio mais centrado neste núcleo, causando maior efeito de blindagem.

Também é notável que o aminoácido mudou seu perfil de sinal devido fenômenos de relaxação, passando do perfil de relaxação por  $T_2$  de uma molécula pequena para  $T_2$  de uma molécula grande. Essa mudança na relaxação da Glicina é mais um indicativo da interação

proposta. Assim, é possível concluir que os resultados indicam que existe uma interação entre os aminoácidos e a lignina.

Por fim, os resultados de microscopia indicaram uma diminuição no tamanho médio das partículas de lignina quando glicina é adicionada à solução aquosa, este resultado concorda com as análises feitas nos parágrafos acima, e mais estudos seriam necessários para uma completa compreensão do comportamento das partículas de lignina em solução aquosa.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, Fernie AR. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Front Plant Sci.* 2013;4(MAR):1-13. doi:10.3389/fpls.2013.00062
2. Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 2010;153(3):895-905. doi:10.1104/pp.110.155119
3. Schuetz M, Benske A, Smith RA, et al. Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. *Plant Physiol.* 2014;166(2):798-807. doi:10.1104/pp.114.245597
4. Liu Q, Luo L, Zheng L. Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2). doi:10.3390/ijms19020335
5. Zakzeski J, Bruijninx PCA, Jongerius AL, Weckhuysen BM. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chem Rev.* 2010;110(6):3552-3599. doi:10.1021/cr900354u
6. Lee S, Kang M, Bae JH, Sohn JH, Sung BH. Bacterial Valorization of Lignin: Strains, Enzymes, Conversion Pathways, Biosensors, and Perspectives. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7(September):1-18. doi:10.3389/fbioe.2019.00209
7. Nishimura H, Kamiya A, Nagata T, Katahira M, Watanabe T. Direct evidence for  $\alpha$  ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-11. doi:10.1038/s41598-018-24328-9
8. vom Stein T, Grande PM, Kayser H, Sibilla F, Leitner W, Domínguez de María P. From biomass to feedstock: One-step fractionation of lignocellulose components by the selective organic acid-catalyzed depolymerization of hemicellulose in a biphasic system. *Green Chem.* 2011;13(7):1772-1777. doi:10.1039/c1gc00002k
9. Li SX, Li MF, Bian J, Sun SN, Peng F, Xue ZM. Biphasic 2-methyltetrahydrofuran/oxalic acid/water pretreatment to enhance cellulose enzymatic hydrolysis and lignin valorization. *Bioresour Technol.* 2017;243:1105-1111. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.075

10. Chotirotsukon C, Raita M, Champreda V, Laosiripojana N. Fractionation of sugarcane trash by oxalic-acid catalyzed glycerol-based organosolv followed by mild solvent delignification. *Ind Crops Prod.* 2019;141(May):111753. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111753
11. Pollegioni L, Tonin F, Rosini E. Lignin-degrading enzymes. *FEBS J.* 2015;282(7):1190-1213. doi:10.1111/febs.13224
12. Shin SK, Ko YJ, Hyeon JE, Han SO. Studies of advanced lignin valorization based on various types of lignolytic enzymes and microbes. *Bioresour Technol.* 2019;289(May):121728. doi:10.1016/j.biortech.2019.121728
13. Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X, et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact.* 2019;18(1):1-33. doi:10.1186/s12934-019-1248-0
14. Datta R, Kelkar A, Baraniya D, et al. Enzymatic degradation of lignin in soil: A review. *Sustain.* 2017;9(7). doi:10.3390/su9071163
15. Have R, Teunissen PJM. Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi. Published online 2001. doi:10.1021/cr000115l
16. Mallinson SJB, Machovina MM, Silveira RL, et al. A promiscuous cytochrome P450 aromatic O-demethylase for lignin bioconversion. *Nat Commun.* 2018;9(1):1-12. doi:10.1038/s41467-018-04878-2
17. Martin Hallberg B, Leitner C, Haltrich D, Divne C. Crystal structure of the 270 kDa homotetrameric lignin-degrading enzyme pyranose 2-oxidase. *J Mol Biol.* 2004;341(3):781-796. doi:10.1016/j.jmb.2004.06.033
18. Xie T, Liu Z, Liu Q, Wang G. Structural insight into the oxidation of sinapic acid by CotA laccase. *J Struct Biol.* 2015;190(2):155-161. doi:10.1016/j.jsb.2015.03.005
19. Mardirossian N, Head-Gordon M. Thirty years of density functional theory in computational chemistry: An overview and extensive assessment of 200 density functionals. *Mol Phys.* 2017;115(19):2315-2372. doi:10.1080/00268976.2017.1333644
20. Zhang Y, He H, Dong K, Fan M, Zhang S. A DFT study on lignin dissolution in imidazolium-based ionic liquids. *RSC Adv.* 2017;7(21):12670-12681. doi:10.1039/c6ra27059j

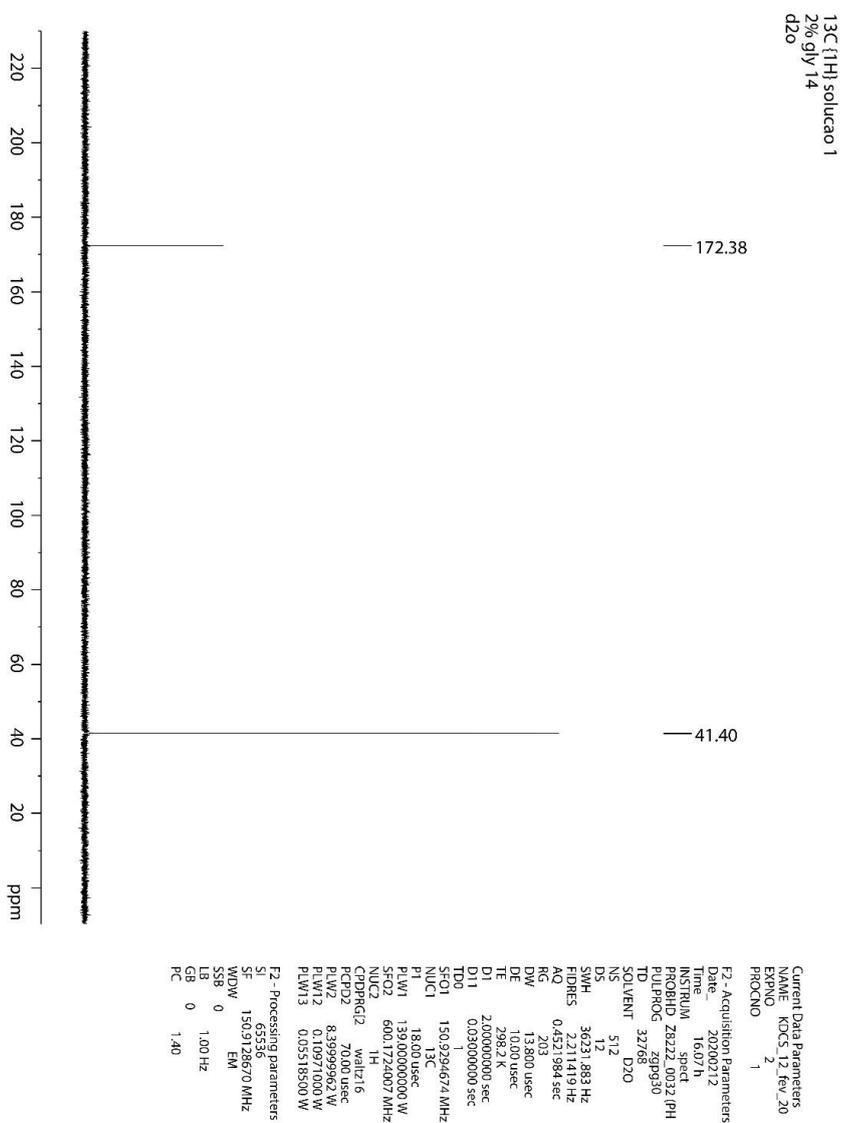
21. Younker JM, Beste A, Buchanan AC. Computational study of bond dissociation enthalpies for substituted  $\beta$ -O-4 lignin model compounds. *ChemPhysChem*. 2011;12(18):3556-3565. doi:10.1002/cphc.201100477
22. Zhao Y, Truhlar DG. How well can new-generation density functional methods describe stacking interactions in biological systems? *Phys Chem Chem Phys*. 2005;7(14):2701-2705. doi:10.1039/b507036h
23. Chu Y, Zhang X, Hillestad M, He X. Computational prediction of cellulose solubilities in ionic liquids based on COSMO-RS. *Fluid Phase Equilib*. 2018;475:25-36. doi:10.1016/j.fluid.2018.07.026
24. Lewars EG. *Computational Chemistry Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*. Third Edit. Springer US; 2016.
25. Hohenberg P., W. K. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys Rev*. 1964;136(4):B864. doi:10.1103/PhysRev.136.B864
26. Kohn W, Sham LJ. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys Rev*. 1965;140(4A):A1133-A1138. doi:10.1103/PhysRev.140.A1133
27. Hehre WJ, Stewart RF, Pople JA. Self-consistent molecular-orbital methods. I. Use of gaussian expansions of slater-type atomic orbitals. *J Chem Phys*. 1969;51(6):2657-2664. doi:10.1063/1.1672392
28. Woon DE, Dunning TH. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. V. Core-valence basis sets for boron through neon. *J Chem Phys*. 1995;103(11):4572-4585. doi:10.1063/1.470645
29. Ando T, Skolnick J. Crowding and hydrodynamic interactions likely dominate in vivo macromolecular motion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18457-18462. doi:10.1073/pnas.1011354107
30. Sun J, Dutta T, Parthasarathi R, et al. Rapid room temperature solubilization and depolymerization of polymeric lignin at high loadings. *Green Chem*. 2016;18(22):6012-6020. doi:10.1039/c6gc02258h
31. Davidson ER, Chakravorty SJ. Reply to comment on "A possible definition of basis set

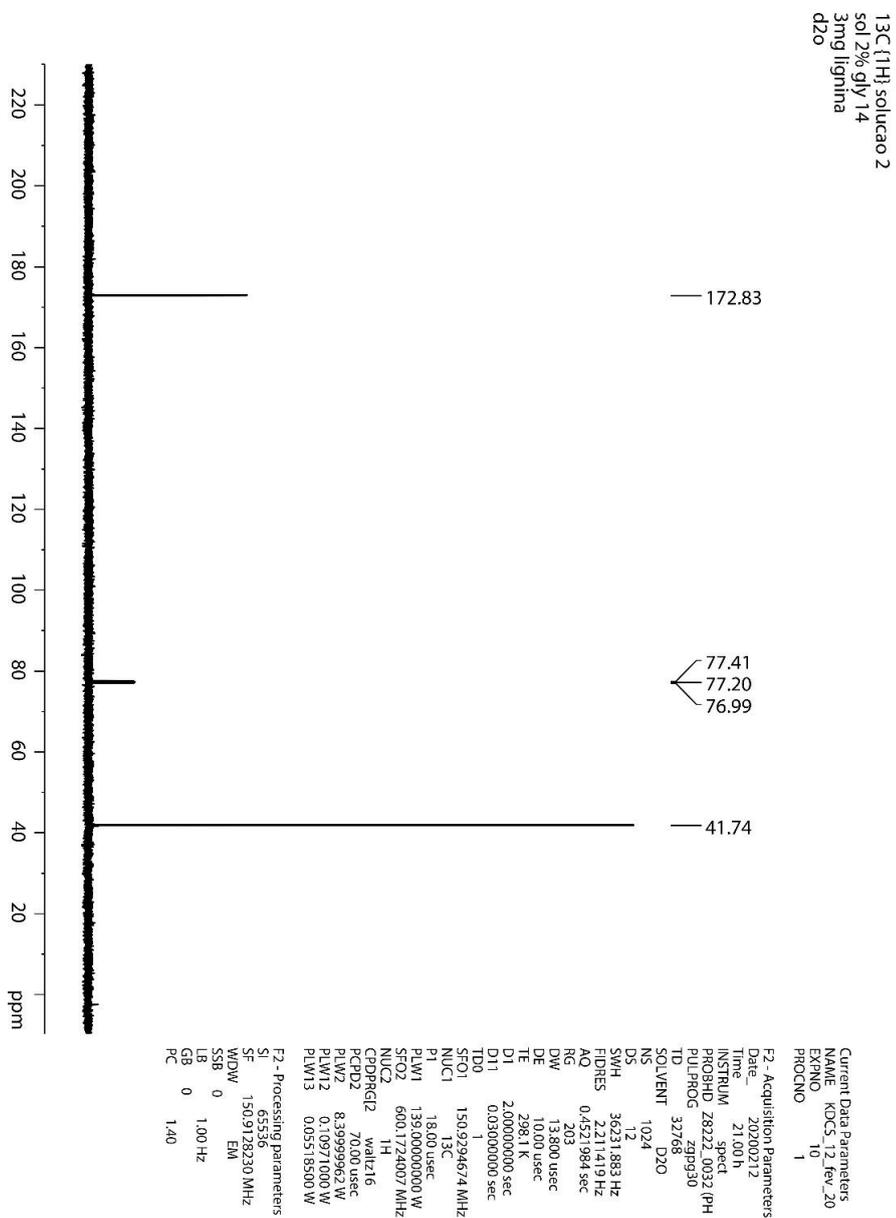
- superposition error." *Chem Phys Lett.* 1995;241(1-2):146-148. doi:10.1016/0009-2614(95)00612-8
32. Inada Y, Orita H. Efficiency of numerical basis sets for predicting the binding energies of hydrogen bonded complexes: Evidence of small basis set superposition error compared to Gaussian basis sets. *J Comput Chem.* 2008;29(2):225-232. doi:10.1002/jcc.20782
  33. Glendening ED, Landis CR, Weinhold F. Natural bond orbital methods. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.* 2012;2(1):1-42. doi:10.1002/wcms.51
  34. Weinhold F, Landis CR, Glendening ED. What is NBO analysis and how is it useful? *Int Rev Phys Chem.* 2016;35(3):399-440. doi:10.1080/0144235X.2016.1192262
  35. Weinhold F, Landis CR. *Discovering Chemistry With Natural Bond Orbitals.* 1st Editio. John Wiley & Sons; 2012.
  36. Weinhold F. Natural bond orbital analysis: A critical overview of relationships to alternative bonding perspectives. *J Comput Chem.* 2012;33(30):2363-2379. doi:10.1002/jcc.23060
  37. Reed AE, Curtiss LA, Weinhold F. Intermolecular Interactions from a Natural Bond Orbital, Donor—Acceptor Viewpoint. *Chem Rev.* 1988;88(6):899-926. doi:10.1021/cr00088a005
  38. Semenov VA, Samultsev DO, Krivdin LB. Solvent effects in the GIAO-DFT calculations of the <sup>15</sup>N NMR chemical shifts of azoles and azines. *Magn Reson Chem.* 2014;52(11):686-693. doi:10.1002/mrc.4119
  39. Lodewyk MW, Siebert MR, Tantillo DJ. Computational prediction of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts: A useful tool for natural product, mechanistic, and synthetic organic chemistry. *Chem Rev.* 2012;112(3):1839-1862. doi:10.1021/cr200106v
  40. Helgaker T, Jaszuński M, Ruud K. Ab initio methods for the calculation of NMR shielding and indirect spin-spin coupling constants. *Chem Rev.* 1999;99(1):293-352. doi:10.1021/cr960017t
  41. Becker ED. a Brief History of Nuclear Magnetic Resonance. *Anal Chem.* 1993;65(6):295A-302A. doi:10.1021/ac00054a716
  42. Tran F, Lancefield CS, Kamer PCJ, Lebl T, Westwood NJ. Selective modification of the β-

- $\beta$  Linkage in DDQ-treated Kraft lignin analysed by 2D NMR spectroscopy. *Green Chem.* 2015;17(1):244-249. doi:10.1039/c4gc01012d
43. Claridge TDW. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Second Edi. Elsevier; 2009.
  44. Cormanich RA, Ducati LC, Rittner R. Are hydrogen bonds responsible for glycine conformational preferences? *Chem Phys.* 2011;387(1-3):85-91. doi:10.1016/j.chemphys.2011.07.006
  45. Rogers DM, Hirst JD. Ab Initio Study of Aromatic Side Chains of Amino Acids in Gas Phase and Solution. *J Phys Chem A.* 2003;107(50):11191-11200. doi:10.1021/jp036081d
  46. Moltved KA, Kepp KP. Using electronegativity and hardness to test density functionals. *J Chem Phys.* 2020;152(24). doi:10.1063/5.0006189
  47. Antony J, Grimme S. Density functional theory including dispersion corrections for intermolecular interactions in a large benchmark set of biologically relevant molecules. *Phys Chem Chem Phys.* 2006;8(45):5287-5293. doi:10.1039/b612585a
  48. Brémond É, Pérez-Jiménez ÁJ, Sancho-García JC, Adamo C. Range-separated hybrid density functionals made simple. *J Chem Phys.* 2019;150(20). doi:10.1063/1.5097164
  49. Mardirossian N, Head-Gordon M. Survival of the most transferable at the top of Jacob's ladder: Defining and testing the  $\omega$  B97M(2) double hybrid density functional. *J Chem Phys.* 2018;148(24). doi:10.1063/1.5025226
  50. Zhao Y, Truhlar DG. Design of density functionals that are broadly accurate for thermochemistry, thermochemical kinetics, and nonbonded interactions. *J Phys Chem A.* 2005;109(25):5656-5667. doi:10.1021/jp050536c
  51. Riley KE, Vondrášek J, Hobza P. Performance of the DFT-D method, paired with the PCM implicit solvation model, for the computation of interaction energies of solvated complexes of biological interest. *Phys Chem Chem Phys.* 2007;9(41):5555-5560. doi:10.1039/b708089a
  52. Semenov VA, Samultsev DO, Krivdin LB. Calculation of  $^{15}\text{N}$  NMR Chemical Shifts in a Diversity of Nitrogen-Containing Compounds Using Composite Method Approximation at

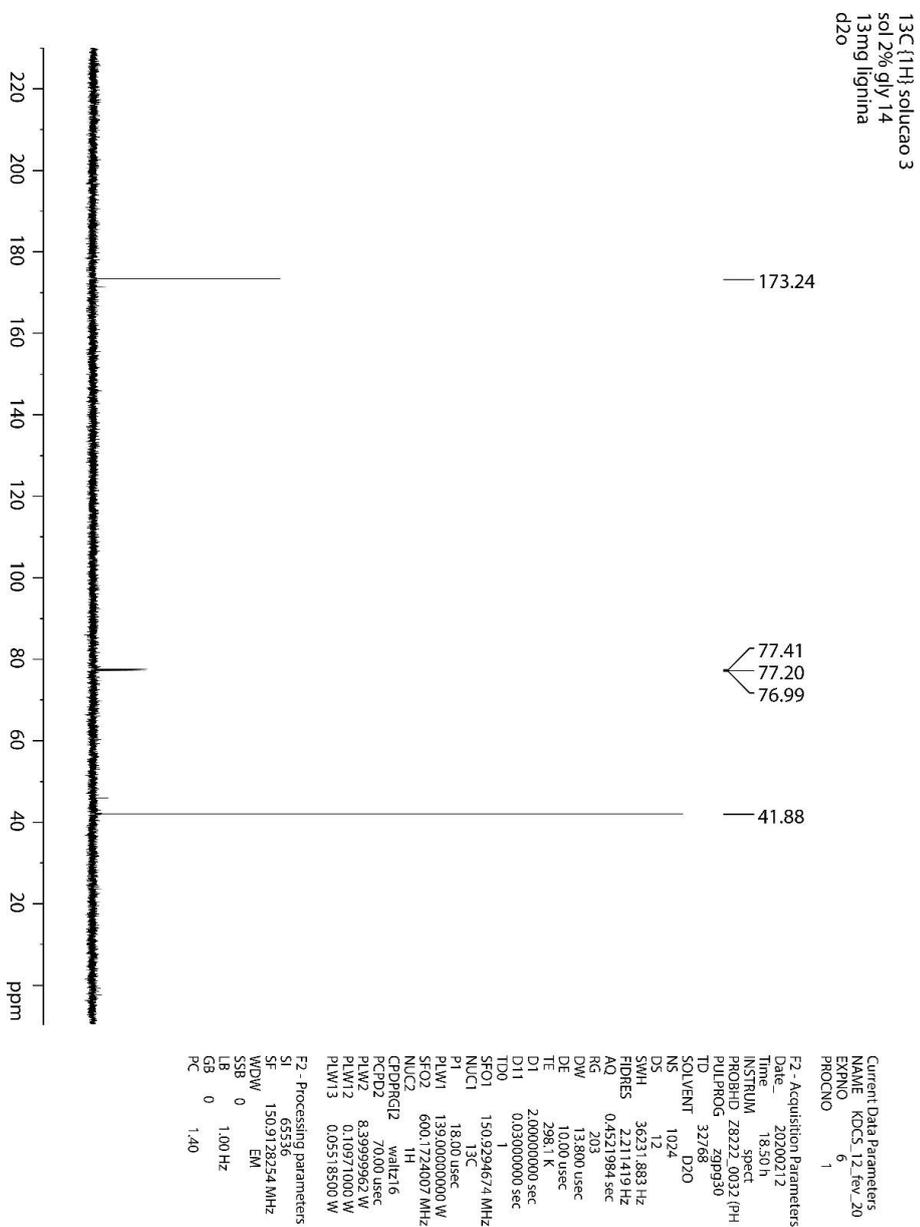
the DFT, MP2, and CCSD Levels. *J Phys Chem A*. 2019;123(39):8417-8426.  
doi:10.1021/acs.jpca.9b06780

## 6 APÊNDICES

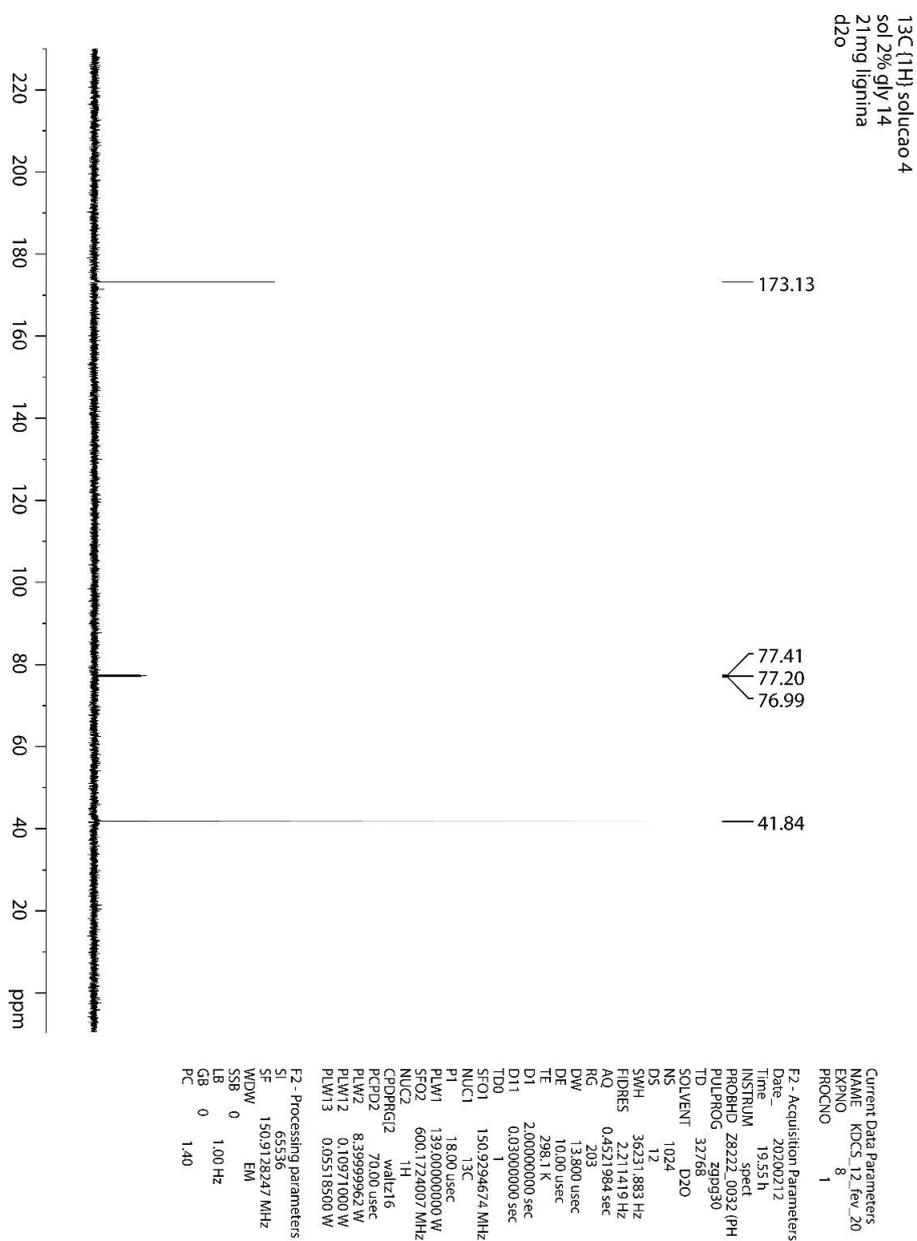
Anexo 1. Espectro de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  de amostra de Glicina. Realizado em equipamento de 600MHz.**Apêndice 1.** Espectro de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  da solução de Gly 2% em  $\text{D}_2\text{O}$  feita em 600MHz.



**Apêndice 2.** Espectro de <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} da solução 2 de Gly 2% em D<sub>2</sub>O com adição de 3mg de lignina feita em 600MHz.

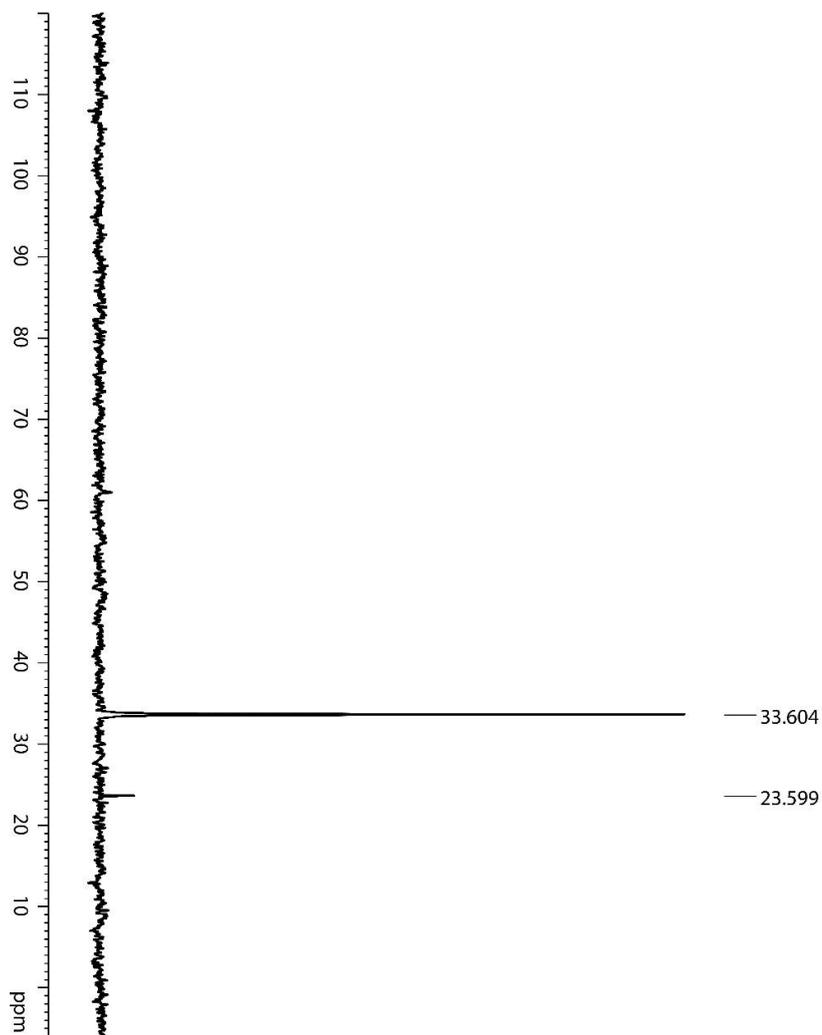


**Apêndice 3.** Espectro de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  da solução 3 de Gly 2% em  $\text{D}_2\text{O}$  com adição de 13mg de lignina feita em 600MHz.



**Apêndice 4.** Espectro de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  da solução 4 de Gly 2% em  $\text{D}_2\text{O}$  com adição de 21mg de lignina feita em 600MHz.

$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  Gly marcada 7mg  
com capilar de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  em  $\text{D}_2\text{O}$

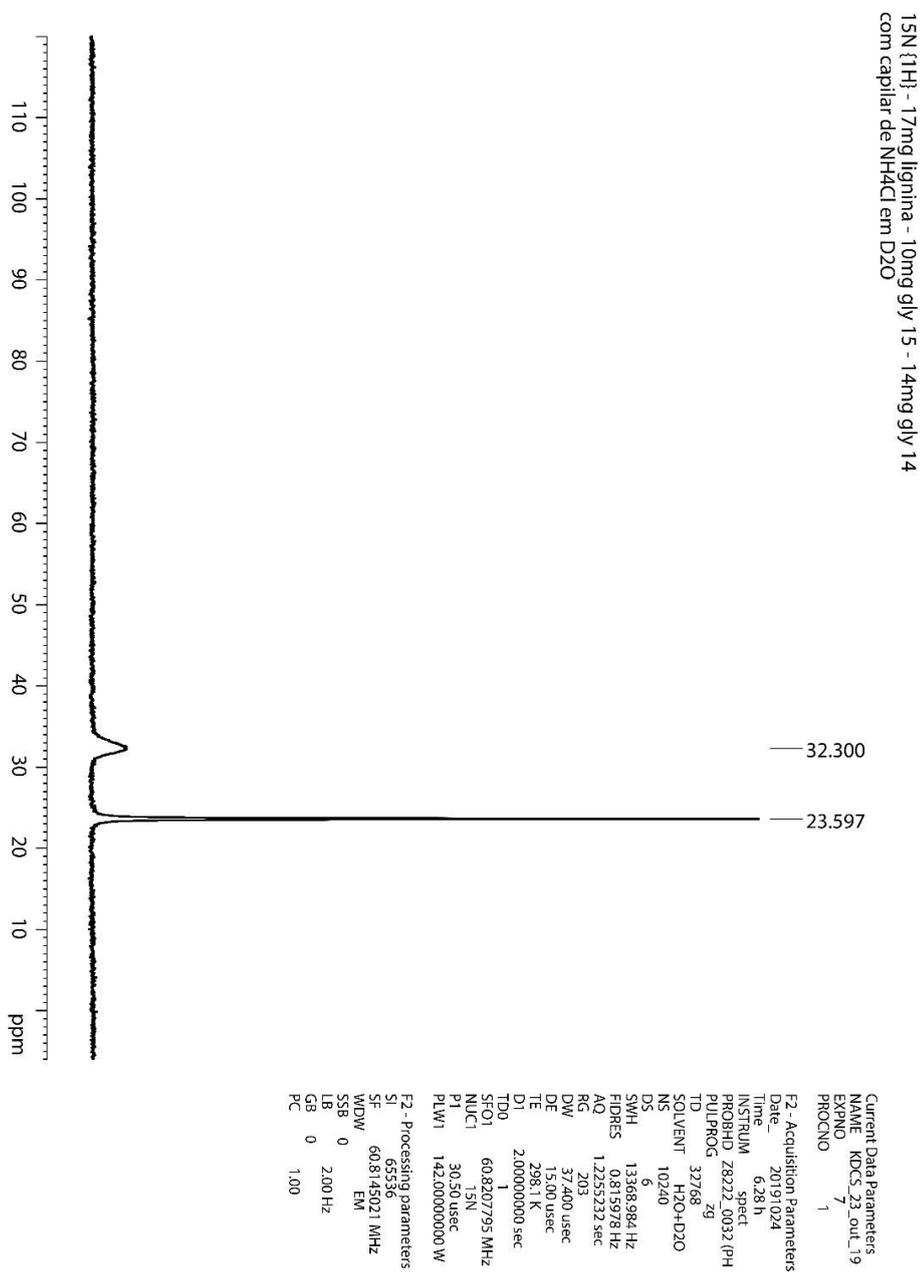


Current Data Parameters  
NAME KDCS\_23\_out\_19  
EXPNO 2  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20191023  
Time 11.16h  
INSTRUM spect  
PROBHD Z8222\_0032 (PH  
PULPROG zg  
TD 32768  
SOLVENT H2O-D2O  
NS 1024  
DS 8  
SWH 7861.635 Hz  
FIDRES 0.479836 Hz  
AQ 2.0840447 sec  
RG 203  
DW 63.600 usec  
DE 15.00 usec  
TE 298.2 K  
D1 2.00000000 sec  
TD0 1  
SFO1 60.8180647 MHz  
NUC1  $^{15}\text{N}$   
P1 30.50 usec  
PLWT 142.000000000 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 60.8145006 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 5.00 Hz  
GB 0  
PC 1.00

**Apêndice 5.** Espectro de  $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  da amostra de 7mg de Glicina marcada com  $^{15}\text{N}$ .  
Referência em capilar selado de solução de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Realizado em equipamento de 600MHz.



**Apêndice 6.** Espectro de  $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  da amostra de 10mg de Glicina marcada com  $^{15}\text{N}$ , 14mg de Glicina não marcada e 17mg de lignina. Referência em capilar de solução de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Realizado em equipamento de 600MHz.