



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**TESE DE DOUTORADO**

**Estudos em biocatálise com células íntegras de *Geotrichum candidum* e lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizadas em sílicas funcionalizadas**

**André Leonardo Patrício Silva**

**João Pessoa - PB- Brasil  
Setembro/2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**TESE DE DOUTORADO**

**Estudos em biocatálise com células íntegras de *Geotrichum candidum* e lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizadas em sílicas funcionalizadas**

**André Leonardo Patrício Silva**

Tese de Doutorado apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal da Paraíba.

**Orientadora: Juliana Alves Vale**

**João Pessoa – PB – Brasil  
Setembro/2018**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586e Silva, Andre Leonardo Patricio.

Estudos em biocatálise com células íntegras de  
Geotrichum candidum e lipase de Burkholderia cepacia  
imobilizadas em sílicas funcionalizadas / Andre  
Leonardo Patricio Silva. - João Pessoa, 2019.  
128 f. : il.

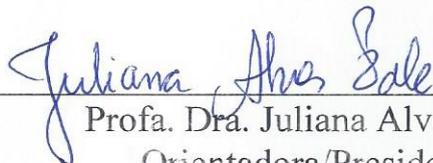
Orientação: Juliana Alves Vale.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Geotrichum candidum. 2. lipase de Burkholderia  
cepacia. 3. sílicas funcionalizadas. 4. biocatálise. I.  
Vale, Juliana Alves. II. Título.

UFPB/CCEN

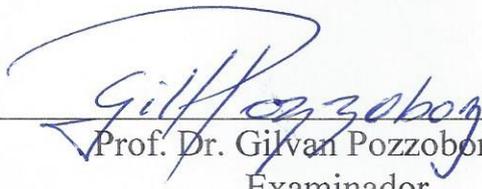
# Estudos em biocatálise com células integras de *Geotrichum candidum* e Lipase de *Burkholderia capacia* immobilizadas em sílicas funcionalizadas

Tese de Doutorado apresentada pelo aluno André Leonardo Patrício Silva e aprovada pela banca examinadora em 27 de setembro de 2018.



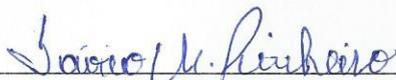
---

Profa. Dra. Juliana Alves Vale  
Orientadora/Presidente



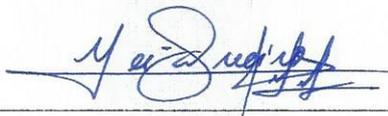
---

Prof. Dr. Gilvan Pozzobon Pires  
Examinador



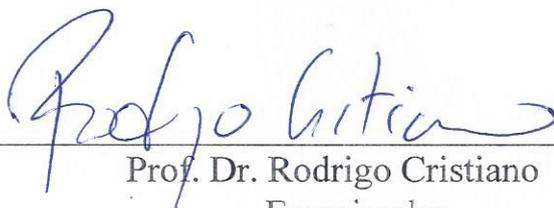
---

Prof. Dr. Sávio Moita Pinheiro  
Examinador



---

Profa. Dra. Neide Queiroz  
Examinadora



---

Prof. Dr. Rodrigo Cristiano  
Examinador

***Dedico este trabalho aos meus pais Antônio Alves da Silva (in memorian) e Erenice Patrício da Silva; aos meus filhos Heitor Patrício Silva e Melina Lis Patrício Silva. A minha esposa, Aline de Sousa Silva por sua compreensão e paciência em todos os momentos.***

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antônio Alves da Silva e Erenice Patrício da Silva, os cuidados, as orientações nessa vida e contribuições para minha formação de caráter.

Aos meus irmãos, Amanda e Alex, os momentos de companheirismo e amizade.

A professora Dr.<sup>a</sup> Juliana Alves Vale, a orientação, apoio, confiança e compreensão, especialmente nos momentos difíceis durante todo o trabalho.

Aos professores Dr.<sup>o</sup> Rodrigo Cristiano, Dr.<sup>a</sup> Neide Queiroz, Dr.<sup>o</sup> Sávio Moita Pinheiro e Dr.<sup>o</sup> Gilvan Pozzobon Pires por aceitarem fazer parte da banca avaliadora e as relevantes discussões e contribuições para a tese.

Aos companheiros do grupo LASOB (Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise) Augusto Dantas, Claudionor Soares, Christian Carlos, Edvaldo Alves, Fernando, João Batista, João Marcos, Poliane Karennine, pela forte união e os momentos de descontração que sempre souberam cultivar com harmonia e leveza.

Aos camaradas do grupo LCCQS (Laboratório de Compostos de Coordenação e Química de Superfície) Victor Hugo, Evandro Paulo, Israel Ferreira, José Ferreira, Saloana Santana, Dariston Kléber, Iran Dantas, Handerson Venceslau, Paulo Roberto, Hundemberg Ferreira, Amauri, Jandeílson, cuja amizade, companheirismo, descontração e troca de ideias foram essenciais para tornar minha trajetória acadêmica mais vívida e salutar.

Ao professor Dr.<sup>o</sup> Júlio Rebolsas e ao pós-doutorando e amigo Victor Hugo a realização de análises cromatográficas indispensáveis na reta final da tese.

Aos amigos João Sampaio e Rômulo Lins, cujo incentivo e forte apoio moral, na reta final deste trabalho de tese, animaram meu espírito a ganhar mais fôlego para concluir meu trabalho.

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB), ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) e seu corpo docente que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao CETENE, a infraestrutura disponibilizada e a realização das caracterizações físico-químicas durante o período do projeto com o apoio financeiro da FACEPE. A FACEPE, o auxílio financeiro concedido durante a vigência do projeto com o CETENE.

A CAPES, a bolsa concedida durante o curso doutorado.

***Nenhuma barreira é intransponível, ao se tomar como ponto de partida a fé em si próprio.***

## RESUMO

Em processos biocatalíticos com células ou enzimas livres há de se ultrapassar algumas dificuldades, por exemplo, o comprometimento da estabilidade dos biocatalisadores nos processos reacionais merece especial atenção. É nessa direção que o presente trabalho de tese propõe-se a contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias em biocatálise, tendo como principal escopo investigar o potencial catalítico de células de *Geotrichum candidum* CCT 1205 e lipase de *Burkholderia cepacia* immobilizadas em suportes de sílica funcionalizados para aplicações em reações orgânicas, tais como Baeyer-Villiger e transesterificação enzimática. Os resultados mostraram que o emprego de células vivas de *G. candidum* CCT 1205 em reações de Baeyer-Villiger possibilitou rápidas conversões de cetonas cíclicas em  $\epsilon$ -caprolactona, quando comparados a outros microrganismos já reportados. A presença do suporte contendo o microrganismo imobilizado forneceu evidências de estabilização do meio celular ao diminuir a toxicidade do substrato às células, quando em meios mais concentrados. Biotransformação de acetofenona sem adição de glicose favorece a formação do fenol. Após 72 horas de reação a composição dos produtos rendeu 46,9 e 45,5 % do fenol e 1-feniletanol, respectivamente. A lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica funcionalizada demonstrou potencial biocatalítico em reação de transesterificação.

Palavras chaves: *Geotrichum candidum*, lipase de *Burkholderia cepacia*, sílica funcionalizada, biocatálise.

## ABSTRACT

In biocatalytic processes with free cells or enzymes some difficulties must be overcome, for example, the compromise of the stability of the biocatalysts in the reactional processes deserves special attention. It is in this direction that this thesis proposes to contribute to the development of new strategies in biocatalysis, having as main scope to investigate the catalytic potential of *Geotrichum candidum* CCT 1205 cells and *Burkholderia cepacia* lipase immobilized onto functionalized silicas for applications in organic reactions such as Baeyer-Villiger and enzymatic transesterification. The results showed that the use of live cells of *G. candidum* CCT 1205 in Baeyer-Villiger reactions allowed rapid conversion of cyclic ketones to  $\epsilon$ -caprolactone when compared to other microorganisms already reported. The presence of the carrier containing the immobilized microorganism provided evidence of stabilization of the cell medium by decreasing the toxicity of the substrate to the cells when in more concentrated media. Biotransformation of acetophenone without addition of glucose favors the formation of phenol. After 72 hours of reaction, the composition of the products yielded 46.9 and 45.5% of the phenol and 1-phenylethanol respectively. *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on functionalized silica demonstrated biocatalytic potential in transesterification reaction.

Keywords: *Geotrichum candidum*, *Burkholderia cepacia* lipase, functionalized silica, biocatalysis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura geral de uma CHMO obtida da actinomycete *Rhodococcus sp.* HI-31. O cofator FAD é mostrado em roxo e o NADPH é mostrado em amarelo [19]. .....22
- Figura 2** - Estrutura de uma lipase de *Burkholderia cepacia* em conformação aberta [47]. .....28
- Figura 3** - Mecanismo de reação catalisada por lipase [48]. .....29
- Figura 4** - Tipos de imobilização de biocatalisadores.....Erro! Indicador não definido.
- Figura 5** - Representação esquemática de estruturas de sílica: (a) unidade tetraédrica, (b) estrutura regular ordenada e (c) estrutura amorfa. ....Erro! Indicador não definido.
- Figura 6** - Tipos de grupos silanóis que podem estar presentes na superfície de sílica gel... Erro! Indicador não definido.
- Figura 7** - Imobilização de lipase em suporte modificado com espaçadores...Erro! Indicador não definido.
- Figura 8** - Preparação de uma nanopartícula magnética com superfície de funcionalizada (a) para imobilização de lipase. (b) correlação entre parâmetros funcionais e propriedades da enzima imobilizada. AAS (3-(2-aminoetilamino)propiltrimetoxissilano, GA (glutaraldeído) e PEI (polietilenoimina).....38
- Figura 9** - Preparação das nanopartículas magnéticas e imobilização das células recombinantes de *E. coli*. .....39
- Figura 10** - Preparação de processo de imobilização de células de *E. coli* com sistema Celite-PEI-GA. ....40
- Figura 11** - Espectros de absorção na região do infravermelho ( $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ ) utilizado a técnica FTIR-ATR para os suportes (a)  $\text{SiO}_2$ , (b)  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  e (c)  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . .....46
- Figura 12** - Espectros de absorção na região do infravermelho ( $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ ) utilizado a técnica FTIR-ATR para o suporte (b)  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$ . .....47
- Figura 13** - Espectros de absorção na região do infravermelho ( $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ ) utilizado a técnica FTIR-ATR para o suporte (c)  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . .....47
- Figura 14** - Curvas termogravimétricas para os suportes sílica gel pura  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  e  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ,  $\text{SiO}_2\text{-et}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-et-CC}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but-CC}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-hex}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-hex-CC}$ . ....Erro! Indicador não definido.
- Figura 15** - Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos para os suportes modificados  $\text{SiO}_2\text{-et}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-et-CC}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but-CC}$ . ....Erro! Indicador não definido.
- Figura 16** - Transesterificação de p-NPP por biocatalisador  $\text{SiO}_2\text{-hex-CC-BCL}$ . Condições: 22,5 mg biocatalisador imobilizado,  $5\text{ cm}^{-3}$  p-NPP (10 mM), 460  $\mu\text{L}$  BuOH. ....54
- Figura 17** - Transesterificação de p-NPP por vários biocatalisadores. Condições: 6,5 mg BCL livre ou 100 mg BCL imobilizada,  $5\text{ cm}^{-3}$  p-NPP (10 mM), 460  $\mu\text{L}$  BuOH. ....55
- Figura 18** - Reciclagem dos biocatalisadores após transesterificação de p-NPP. Condições: 100 mg BCL imobilizada, p-NPP (10 mM), 460  $\mu\text{L}$  BuOH em  $5\text{ cm}^{-3}$  de hexano. ....57
- Figura 19** - Curso do tempo de reação de biotransformação de cicloexenona. Condições: 3 g *G. candidum*, 10  $\mu\text{L}$  de substrato, 10 mL de pH 6.5 tampão fosfato, 6h de reação, agitação em 180 rpm. A conversão (%) dos intermediários e produtos foi monitorada por cromatografia gasosa. ....Erro! Indicador não definido.
- Figura 20** - Curso do tempo de reação da biotransformação da cicloexanona. Condições: 1 g da biomassa de células inteiras, 10  $\mu\text{L}$  do substrato, 10 mL de Tampão fosfato pH 6,5, 4 horas de reação e agitação em 180 rpm. Conversão dos intermediários e produtos foi monitorada por cromatografia gasosa (ver apêndice B).....62
- Figura 21** - Curso do tempo de reação da biotransformação do cicloexanol. Condições: 1 g da biomassa de células inteiras, 10  $\mu\text{L}$  do substrato, 10 mL de Tampão fosfato pH 6,5, 4 horas de reação e agitação em 180 rpm. Conversão dos intermediários e produtos foi monitorada por cromatografia gasosa.....64
- Figura 22** - Perfil reacional de reação da cicloexenona via células de *G. candidum* imobilizadas no suporte  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$ . .....69

<b>Figura 23</b> - Perfil reacional de reação da cicloexanona via células de <i>G. candidum</i> imobilizadas no suporte SiO <sub>2</sub> -Cl. ....	<b>69</b>
<b>Figura 24</b> - Biotransformação da cicloexanona com <i>G. candidum</i> imobilizado em SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> . Condições: 1,0 g células imobilizadas, 10 mL de tampão fosfato pH 6,5, 10 µL de cicloexanona, 180 rpm em shaker, 5 horas. ....	<b>71</b>
<b>Figura 25</b> - Biotransformação da cicloexanona com <i>G. candidum</i> imobilizado em SiO <sub>2</sub> -N-Glut. Condições: 1,0 g células imobilizadas, 10 mL de tampão fosfato pH 6,5, 10 µL de cicloexanona, 180 rpm em shaker, 5 horas. ....	<b>72</b>
<b>Figura 26</b> - Biotransformação da cicloexanona com <i>G. candidum</i> imobilizado em SiO <sub>2</sub> -SH. Condições: 1,0 g células imobilizadas, 10 mL de tampão fosfato pH 6,5, 10 µL de cicloexanona, 180 rpm em shaker, 5 horas. ....	<b>73</b>
<b>Figura 27</b> - Efeito da concentração na performance dos biocatalisadores na reação de biotransformação da cicloexanona após 6 horas de reação. Experimentos realizados em triplicata).....	<b>74</b>
<b>Figura 28</b> - Concentração da caprolactona obtida após 6 horas de reação biotransformação da cicloexanona. (Experimentos realizados em duplicata).....	<b>75</b>
<b>Figura 29</b> - Efeito da reciclagem das células na forma livre e imobilizada na transformação de cicloexanona após 6 horas de reação. (Os valores em porcentagem representam uma média experimental). ....	<b>76</b>
<b>Figura 30</b> - Cromatograma obtido por GC-MS de uma alíquota de 6 horas da bioedução de acetofenona com <i>G. candidum</i> sem adição de glicose. ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Figura 31</b> - Espectro de massa obtido de uma alíquota de 6 horas da bioedução de acetofenona com <i>G. candidum</i> sem adição de glicose. ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Figura 32</b> - Cromatograma obtido por CG-MS de uma alíquota de 12 horas da bioedução de acetofenona com <i>G. candidum</i> sem adição de glicose. ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Figura 33</b> - Cromatograma obtido por CG-MS de uma alíquota de 24 horas da bioedução de acetofenona com <i>G. candidum</i> sem adição de glicose. ....	<b>80</b>
<b>Figura 34</b> - Cromatograma obtido por CG-MS de uma alíquota de 72 horas da bioedução de acetofenona com <i>G. candidum</i> sem adição de glicose. ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Figura 35</b> - Cromatograma obtido por análise em GC-MS de uma amostra padrão de fenol. ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Figura 36</b> - Curso do tempo de biotransformação da acetofenona por <i>G. candidum</i> ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Figura 37</b> - Curso do tempo de biotransformação da acetofenona por <i>G. candidum</i> sem adição de glicose (células 4x lavadas com água destilada). ....	<b>84</b>
<b>Figura 38</b> - Curso do tempo de biotransformação da acetofenona por <i>G.candidum</i> com adição de glicose. ....	<b>85</b>
<b>Figura 39</b> - Teste de identificação de fenol com cloreto férrico 3% em meio aquoso para a mistura de reação de biotransformação da acetofenona sem adição de glicose após 48 horas de contato. Fonte: próprio autor. ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Figura 40A</b> - Espectro de absorção no infravermelho utilizando a técnica da pastilha de KBr para o material SiO <sub>2</sub> -Cl. ....	<b>104</b>
<b>Figura 41A</b> - Espectro de absorção no infravermelho utilizando a técnica de ATR (reflectância atenuada) para o material SiO <sub>2</sub> -N-Glut.....	<b>104</b>
<b>Figura 42A</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C obtido para o sólido Sílica cloropropil (SiO <sub>2</sub> -Cl). ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Figura 43A</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C obtido para o sólido SiO <sub>2</sub> -Hex (A) e SiO <sub>2</sub> -hex-CC (B). Erro! Indicador não definido.	
<b>Figura 44B</b> - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona com células livres de <i>G. candidum</i> após 0,5 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5)...	Erro! Indicador não definido.

- Figura 45B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona com células livres de *G. candidum* após 1 hora de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5). Erro! Indicador não definido.
- Figura 46B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona com células livres de *G. candidum* após 2 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5). Erro! Indicador não definido.
- Figura 47B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona com células livres de *G. candidum* após 2,5 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5). Erro! Indicador não definido.
- Figura 48B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona com células livres de *G. candidum* após 3 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5). Erro! Indicador não definido.
- Figura 49B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona com células livres de *G. candidum* após 3,5 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5). Erro! Indicador não definido.
- Figura 50B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona com células livres de *G. candidum* após 4 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5). Erro! Indicador não definido.
- Figura 51B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona a caprolactona com 1g de células livres de *G. candidum*. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna DB-5MS). Erro! Indicador não definido.
- Figura 52B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona a caprolactona com 3g de células livres de *G. candidum*. Obtido por cromatografia gasosa. .... **110**
- Figura 53B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona a caprolactona com 1g de células de *G. candidum* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-Cl. Obtido por cromatografia gasosa (coluna DB-5MS). Erro! Indicador não definido.
- Figura 54B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona a caprolactona com 1g de células de *G. candidum* imobilizada em Sílica pura (SiO<sub>2</sub>-Gc). Obtido por cromatografia gasosa (coluna DB-5MS). Erro! Indicador não definido.
- Figura 55B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona a caprolactona com 3g de células de *G. candidum* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-Cl (SiO<sub>2</sub>-Cl-Gc). Obtido por cromatografia gasosa (coluna DB-5MS). Erro! Indicador não definido.
- Figura 56B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de cicloexanona a caprolactona com 3g de células de *G. candidum* imobilizada em Sílica pura (SiO<sub>2</sub>-Gc). Obtido por cromatografia gasosa (coluna DB-5MS). Erro! Indicador não definido.
- Figura 58B** - Espectro de massa obtido de uma amostra padrão de acetofenona. .... **113**
- Figura 57B** - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS) de uma amostra padrão de acetofenona. .... **113**
- Figura 59B** - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS) de uma amostra padrão de 1-feniletanol. Erro! Indicador não definido.
- Figura 60B** - Espectro de massa obtido de uma amostra padrão de 1-feniletanol. Erro! Indicador não definido.
- Figura 61B** - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS) de uma amostra padrão de 1-fenol. Erro! Indicador não definido.
- Figura 62B** - Espectro de massa obtido de uma amostra padrão de fenol. Erro! Indicador não definido.
- Figura 63B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 3 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa. Erro! Indicador não definido.
- Figura 64B** - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (GC-FID) de uma amostra padrão de acetofenona. Erro! Indicador não definido.

<b>Figura 66B</b> - Biotransformação da acetofenona via 1 g de <i>G. candidum</i> livre (sem adição de glicose) após 9 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa. ....	<b>117</b>
<b>Figura 65B</b> - Biotransformação da acetofenona via 1 g de <i>G. candidum</i> livre (sem adição de glicose) após 6 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa. ....	<b>117</b>
<b>Figura 68B</b> - Biotransformação da acetofenona via 1 g de <i>G. candidum</i> livre (sem adição de glicose) após 15 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa. ....	<b>118</b>
<b>Figura 67B</b> - Biotransformação da acetofenona via 1 g de <i>G. candidum</i> livre (sem adição de glicose) após 12 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa. ....	<b>118</b>
<b>Figura 70B</b> - Biotransformação da acetofenona via 1 g de <i>G. candidum</i> livre (sem adição de glicose) após 21 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa. ....	<b>119</b>
<b>Figura 69B</b> - Biotransformação da acetofenona via 1 g de <i>G. candidum</i> livre (sem adição de glicose) após 18 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa. ....	<b>119</b>
<b>Figura 71B</b> - Biotransformação da acetofenona via 1 g de <i>G. candidum</i> livre (sem adição de glicose) após 24 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa. ....	<b>120</b>
<b>Figura 72B</b> - Biotransformação da acetofenona via 1 g de <i>G. candidum</i> livre (sem adição de glicose) após 48 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa (CG-FID). ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figura 73B</b> - Biotransformação da acetofenona via 1 g de <i>G. candidum</i> livre (sem adição de glicose) após 96 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figura 74B</b> - Biotransformação da acetofenona via 1 g de <i>G. candidum</i> livre (sem adição de glicose) após 120 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figura 76B</b> – Biotransformação da acetofenona com células de <i>G. candidum</i> livres com adição de glicose (6 horas de reação). ....	<b>122</b>
<b>Figura 75B</b> - Biotransformação da cicloexanona via 1 g de <i>G. candidum</i> imobilizada no suporte SiO <sub>2</sub> -SH após duas horas de reação obtido por CG-FID. ....	<b>122</b>
<b>Figura 77B</b> - Biotransformação da acetofenona com células de <i>G. candidum</i> livres com adição de glicose (24 horas de reação). ....	<b>123</b>
<b>Figura 78B</b> - Biotransformação da acetofenona com células de <i>G. candidum</i> livres com adição de glicose (48 horas de reação). ....	<b>123</b>
<b>Figura 79C</b> - Espectros UV obtidos para amostras de p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) e p-nitrofenol (p-NP) em meio etanólico e etanol (95%) na faixa de 400-200 nm. ....	<b>124</b>
<b>Figura 80C</b> - Curvas de calibração obtidas para o p-NPP e p-NP em meio etanólico. ....	<b>124</b>
<b>Figura 81C</b> - Curva de calibração interna obtida para Caprolactona. Decano foi usado como padrão interno. ....	<b>125</b>
<b>Figura 82D</b> - Imagens dos sólidos obtidos na preparação dos suportes (da esquerda para a direita): (A) SiO <sub>2</sub> , SiO <sub>2</sub> -Cl, SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , SiO <sub>2</sub> -SH; (B) SiO <sub>2</sub> -N-CC, SiO <sub>2</sub> -et-CC, SiO <sub>2</sub> -but-CC, SiO <sub>2</sub> -hex-CC; (C) SiO <sub>2</sub> -N-Glut, SiO <sub>2</sub> -et-Glut, SiO <sub>2</sub> -but-Glut, SiO <sub>2</sub> -hex-Glut. ....	<b>126</b>
<b>Figura 83D</b> - Imagens dos biocatalisadores utilizados na imobilização e biocatálise: biomassa celular de <i>G. candidum</i> CCT 1205 (D), lipase BCL (E). ....	<b>126</b>



## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> - Mecanismo proposto para uma oxidação de Baeyer-Villiger	<b>20</b>
<b>Esquema 2</b> - Mecanismo de reação de oxidação Baeyer-Villiger por CHMO.	<b>22</b>
<b>Esquema 3</b> - Obtenção de PCL por polimerização por abertura de anel (ROP).	<b>24</b>
<b>Esquema 4</b> - Biotransformações de Baeyer-Villiger com cicloexanona como substrato [26].	<b>25</b>
<b>Esquema 5</b> - Reação quimiosseletiva catalisada por lipases. <i>Aspergillus niger</i> lipase (ANL), <i>Chromobacterium viscosum</i> (CvL), Novozymes 435 (N-435) [43].	<b>27</b>
<b>Esquema 6</b> - Acilação enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila mediada por lipases [44].	<b>27</b>
<b>Esquema 7</b> - Acilação regioseletiva de tiofenicol catalisada por lipase CALB [43].	<b>28</b>
<b>Esquema 8</b> - Representação esquemática de reações de funcionalização por <i>grafting</i> com organosilanos trifuncionais em superfície de sílica.	<b>35</b>
<b>Esquema 9</b> - Reação de transesterificação do racêmico 1-feniletanol via lipase de <i>Pseudomonas</i> imobilizada em MCF de superfície hidrofóbica.	<b>37</b>
<b>Esquema 10</b> - Redução assimétrica de (5R)-1 a (3R,5R)-2 por carbonil redutase (CR) e glucose desidrogenase (GDH) expressas em células inteiras de <i>E. coli</i> .	<b>40</b>
<b>Esquema 11</b> - Resumo geral das reações de funcionalização da sílica gel.	<b>42</b>
<b>Esquema 12</b> - Reação de transesterificação de p-NPP por biocatalisador SiO <sub>2</sub> -hex-CC-BCL.	<b>53</b>
<b>Esquema 13</b> - Redução e oxidação microbológica de cicloexenona (1). O produto da oxidação de Baeyer-Villiger é a ε-caprolactona (ε-CL).	<b>61</b>
<b>Esquema 14</b> - Redução da cicloexanona (2) e oxidação microbiana. O produto da oxidação de Baeyer – Villiger é a ε-caprolactona.	<b>63</b>
<b>Esquema 15</b> - Biotransformações de Baeyer-Villiger one-pot com cicloexanol [72].	<b>63</b>
<b>Esquema 16</b> - Oxidação microbiana do cicloexanol (3). O produto da oxidação de Baeyer– Villiger é ε-caprolactona.	<b>65</b>
<b>Esquema 17</b> - Biotransformação de cicloexenona 1 e cicloexanona 2 com uso de células de <i>G. candidum</i> imobilizadas no suporte SiO <sub>2</sub> -Cl. Condições: 10 μL de 1 ou 2; 10 mL de tampão fosfato (pH 6,5); 2-24 horas de reação; 28 °C; 150 rpm de agitação.	<b>68</b>
<b>Esquema 18</b> - Biotransformação da acetofenona com células de <i>G. candidum</i> .	<b>78</b>
<b>Esquema 19</b> - Proposta mecanística de biooxidação de acetofenona por células de <i>G. candidum</i> .	<b>82</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Resumo de algumas vantagens e desvantagens do uso de células íntegras ou enzimas isoladas	<b>19</b>
<b>Tabela 2</b> - Dados de análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos nos materiais funcionalizados*.	<b>44</b>
<b>Tabela 3</b> - Dados de medidas de área superficial, volume de poro e tamanho médio de poro pelo método (BET) para os suportes SiO <sub>2</sub> , SiO <sub>2</sub> -Cl, SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> e SiO <sub>2</sub> -SH.	<b>45</b>
<b>Tabela 4</b> - Biotransformação de cicloexenona usando várias condições.	<b>59</b>
<b>Tabela 5</b> - Variação da biomassa celular livre ou imobilizada na conversão da caprolactona (ver apêndice B8-B13).	<b>66</b>
<b>Tabela 6</b> - Resultado das injeções dos padrões no GC-FID. Condições cromatográficas: coluna capilar DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), N <sub>2</sub> como gás de arraste (1mL/min); gradiente 60°C (1min), 100°C (35°C/min), 150°C (25°C/min) e 240°C (45°C/min).	<b>125</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**BVMO** – Monooxigenase de Baeyer-Villiger

**CHMO** – Monooxigenase de ciclohexanona

**ERED** – Enoato-redutase

**ADH** – Desidrogenase de Álcool

**$\epsilon$ -CL** -  $\epsilon$ -caprolactona

**p-NPP** – p-nitrofenilpalmitato

**p-NP**- p-nitrofenol

**IV** – Espectroscopia na região do infravermelho

**RMN<sup>13</sup>C** – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

**UV-Vis**- Espectroscopia na região do ultra violeta-visível

**CG-FID** – Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama

**CG-EM** – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massa

**BET** – Área superficial método Bruauer-Emmett-Teller

**TG** - Termogravimetria

**SiO<sub>2</sub>** – Sílica gel cromatográfica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1	Células íntegras em biocatálise	19
1.1.1	Oxidação de Baeyer-Villiger: Abordagem química vs biocatalítica	19
1.1.2	Recentes avanços em biotransformações de Baeyer-Villiger para obtenção de $\epsilon$ -caprolactona	23
1.2	Biocatálise com lipases	26
1.1.2	Seletividade das lipases	26
1.3	Estratégias de imobilização de biocatalisadores	28
1.3.1	Sílica gel: considerações gerais	32
1.3.2	Funcionalização de superfícies de sílicas	34
1.3.3	Recentes avanços na preparação de suportes heterofuncionalizados para imobilização de biocatalisadores	36
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>42</b>
3.1	Obtenção das superfícies de sílica funcionalizadas	42
3.2	Ensaio biocatalítico com lipase imobilizada	52
3.3	Biotransformações com células de <i>Geotrichum candidum</i> CCT 1205: Síntese de $\epsilon$ -caprolactona ( $\epsilon$ -CL) via biooxidação de Baeyer-Villiger	58
3.3.1	Biotransformação da cicloexenona	59
3.3.2	Biotransformação da cicloexanona	61
3.3.3	Biotransformação de cicloexanol	63
3.4	Biotransformação via Baeyer-Villiger com células de <i>G. candidum</i> imobilizadas	65
3.4.1	Performance catalítica das células imobilizadas: Efeito do tempo de contato	70
3.4.2	Performance catalítica das imobilizadas: Efeito da concentração do substrato	74
3.5	Biotransformação de acetofenona	76
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>88</b>
6.1	Reagentes e solventes	88
6.2	Preparação dos suportes: secagem da sílica gel	89
6.2.1	Reação da sílica gel com agente sililante 3-cloropropiltrimetoxissilano	89

6.2.2	Reação da sílica gel com agente sililante 3-aminopropiltrimetoxisilano .....	89
6.2.3	Reação da sílica gel com agente sililante 3-mercaptopropiltrimetoxisilano .....	90
6.2.4	Reação de funcionalização com 1,2-diaminoetano, 1,4-diaminobutano e 1,6 diaminohexano.....	90
6.2.5	Reação de funcionalização com cloreto cianúrico .....	90
6.2.6	Reação de funcionalização com glutaraldeído.....	91
6.3	Procedimento de imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	91
6.4	Condições de cultivo das células de <i>Geotrichum candidum</i> .....	91
6.4.1	Procedimento geral de imobilização das células de <i>G. candidum</i> ...	92
6.5	Ensaio biocatalítico .....	92
6.5.1	Condições gerais da reação de Transesterificação do p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) .....	92
6.5.2	Procedimento geral da reação de biotransformação dos substratos cicloexenona, cicloexanona, cicloexanol e acetofenona com células <i>G. candidum</i> livres .....	93
6.5.3	Procedimento geral da reação de biotransformação dos substratos cicloexenona, cicloexanona, cicloexanol e acetofenona com células de <i>G. candidum</i> CCT 1205 imobilizadas.....	93
6.5.4	Procedimento geral da reação de biotransformação do substrato acetofenona com células de <i>G. candidum</i> CCT 1205 com adição de glicose	93
6.6	Métodos de caracterização dos materiais .....	94
6.6.1	Análise de adsorção de nitrogênio .....	94
6.6.2	Análise elementar de C, H e N .....	94
6.6.3	Termogravimetria .....	95
6.6.4	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho .....	95
6.6.5	Espectroscopia de RMN <sup>29</sup> Si e <sup>13</sup> C.....	95
6.6.6	Análises cromatográficas e espectrometria de massas .....	96
6.6.7	Análise espectrofotométrica UV-Vis .....	96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
	APÊNDICES .....	103

## 1 INTRODUÇÃO

Não por acaso a implementação de processos biocatalíticos no campo da síntese orgânica tem merecido destaque e vem se firmando, não apenas nos círculos acadêmicos, mas também com grande entusiasmo em alguns setores industriais, tais como na produção de fármacos, agroquímicos, química de alimentos [1-4].

A biocatálise tem sido compreendida como uma abordagem que emprega sistemas biológicos, tais como enzimas isoladas ou enzimas contidas em células íntegras de microrganismos, em transformações químicas de interesse acadêmico ou industrial [2]. A relevância da biocatálise e biotransformação para a síntese orgânica pode ser atribuída, naturalmente e primariamente, aos catalisadores enzimáticos que expressam enorme versatilidade para aceitar um amplo espectro de substratos moleculares, em reações simples ou complexas, promovendo atividade catalítica com elevado potencial quimio-, régio- e enantiosseletivo [3, 5].

Além disso, processos biocatalíticos estão alinhados aos apelos do uso de tecnologias mais “ecoamigáveis,” uma vez que, em biocatálise, é possível trabalhar em condições reacionais mais brandas, minimizar o número de etapas reacionais, diminuindo a obtenção de subprodutos indesejáveis [1,6].

Apesar das vantagens supramencionadas oferecidas pela biocatálise e/ou biotransformações, bem como os avanços significativos dessa abordagem sintética em tempos atuais, há de se ultrapassar algumas dificuldades pertinentes ao uso de células livres e/ou enzimas isoladas em processos químicos. Dentre elas, o comprometimento da estabilidade dos biocatalisadores nos processos reacionais merece especial atenção [3,7].

A perda de estabilidade dos biocatalisadores associada à toxicidade do solvente, substrato e produto [3,8,9] ou ainda a fatores termodinâmicos como atividade da água [10], e stress mecânico [11], pode ser minimizada quando se utiliza a tecnologia de imobilização celular ou enzimática [3,7, 11, 12].

É nessa direção que o presente estudo propõe-se a contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias em biocatálise, tendo como principal escopo o uso de estratégia de imobilização de biocatalisadores (células

íntegras ou enzimas isoladas) para aplicações em reações orgânicas, tais como biotransformações de Baeyer-Villiger e transesterificação enzimática.

## 1.1 Células íntegras em biocatálise

Uma questão a ser considerada em reações biocatalisadas é a viabilidade do uso de enzimas isoladas ou células íntegras, dado que ambas possuem vantagens e desvantagens, como ilustra a **Tabela 1**:

**Tabela 1** - Resumo de algumas vantagens e desvantagens do uso de células íntegras ou enzimas isoladas

	Vantagens	Desvantagens
<b>Células inteiras</b>	Nenhuma purificação da enzima Regeneração do cofator <i>in situ</i>	Baixa produtividade volumétrica Pode ter baixa seletividade e reações laterais
<b>Enzimas isoladas</b>	Alta produtividade volumétrica Menos reações laterais	Purificação dispendiosa Necessidade de regeneração do cofator

FONTE: adaptada da referência [13]

Como mostra a Tabela 1, a necessidade de reciclagem externa do cofator e etapas de purificação tediosas e onerosas pode inviabilizar o emprego de enzimas isoladas em biotransformações. Por outro lado, a atividade catalítica de células inteiras está intimamente ligada ao metabolismo celular e isto pode limitar a produtividade da biotransformação com as células vivas, por exemplo, devido à ocorrência de inibição ao produto da biotransformação [13].

Diante desse quadro, o uso de células inteiras intactas em biotransformações pode ser bastante vantajoso ao tirar proveito da capacidade de regeneração *in situ* dos cofatores. Contudo, para melhorar a performance das enzimas contidas em células intactas, a imobilização celular pode ser uma estratégia promissora.

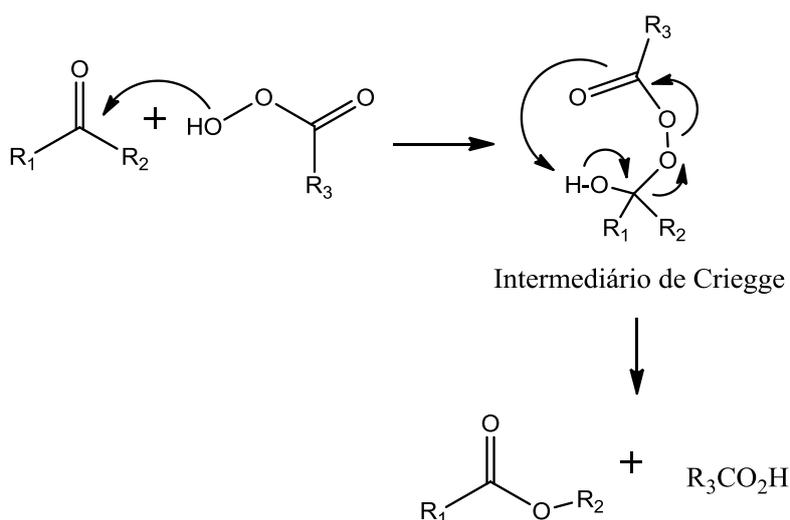
### 1.1.1 Oxidação de Baeyer-Villiger: Abordagem química vs biocatalítica

Adolf von Baeyer e Victor Villiger, em 1899, descreveram uma reação de oxidação em que compostos carbonílicos podiam ser convertidos em seus correspondentes ésteres ou lactonas. Tal reação ficou conhecida como oxidação de Baeyer-Villiger, sendo de grande interesse em síntese orgânica.

A oxidação de Baeyer-Villiger é uma das estratégias sintéticas mais importantes em química fina, como na produção de blocos de construção quiral ou mesmo na produção de materiais de partida para preparação de polímeros [14].

Numa abordagem que usa perácidos orgânicos como catalisadores químicos, a reatividade é caracterizada por uma ligação fraca O-O e um grupo nucleofílico O-H. A reação pode ser descrita pelo mecanismo proposto por Criegee [15], representado por uma oxidação em duas etapas (**Esquema 1**):

**Esquema 1** - Mecanismo proposto para uma oxidação de Baeyer-Villiger



Na primeira etapa ocorre o ataque nucleofílico do peróxido ao grupo carbonila, ocasionando a formação de um intermediário tetraédrico, conhecido como intermediário de Criegee. Em seguida, ocorre uma migração concertada de um átomo de carbono adjacente para o oxigênio, o que conduz à liberação do ânion carboxilato ou ácido carboxílico. A segunda etapa, nesse caso, é determinante da velocidade para a oxidação B-V [15]. Quando existir uma competição entre dois grupos (R1 ou R2) que podem migrar na reação de rearranjo, o grupo que irá migrar depende da sua habilidade de estabilizar a carga positiva formada na molécula. Com efeito, o grupo mais substituído tenderá a migrar no rearranjo de Baeyer-Villiger, pois proporcionará um estado de transição mais estável [16].

Entre os peróxidos orgânicos, o ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) é o mais comumente usado como oxidante em reação de Baeyer-Villiger, devido principalmente ao seu alto poder oxidante e atuar em condições geralmente

brandas. Entretanto, oxidações B-V envolvendo perácidos como o mCPBA estão entre os processos mais problemáticos, em termos de segurança, adequabilidade ambiental e simplicidade operacional [16]. Além disso, oxidações B-V clássicas geralmente não possuem elevada quimio-, régio- e enantiosseletividade, que são muitas vezes necessárias em síntese orgânica [15].

Nesse contexto, a busca por catalisadores alternativos eficientes em reações de oxidação B-V tem estimulado a pesquisa científica em diversas áreas da química sintética, sendo a abordagem biocatalítica uma das mais promissoras e investigadas na atualidade [14].

Do ponto de vista biotecnológico, o interesse por esta abordagem sintética faz uso de microrganismos em que atua uma subclasse de enzimas conhecidas como Monooxigenases de Baeyer-Villiger (BVMOs, 1.14.13.xx) pertencentes à classe de enzimas oxidases [17]. Essa subclasse de enzimas tem sido sistematicamente estudada; são capazes de catalisar reações de Baeyer-Villiger com elevada enantiosseletividade, que constitui pré-requisito para síntese química de interesse industrial [17].

As monooxygenases de Baeyer-Villiger (BVMOs) foram primeiramente isoladas em 1960. De todas as BVMOs estudadas, a maioria está relacionada a sequência de BVMO tipo I, pertencentes a uma subclasse B de flavoproteínas, carregam o cofator FAD como grupo prostético e são dependentes de NADPH como doadores de elétrons [18].

Entre as BVMOs identificadas, a estrutura cristalina de uma ciclohexanona monooxigenase (CHMO) foi publicada primeira vez e obtida de uma bactéria actinomicete *Rhodococcus sp.* HI-31 [19]. Sua estrutura revelou domínios de ligação com o cofator NADPH e o grupo FAD, que são fundamentais ao ciclo catalítico da enzima (**Figura 1**).

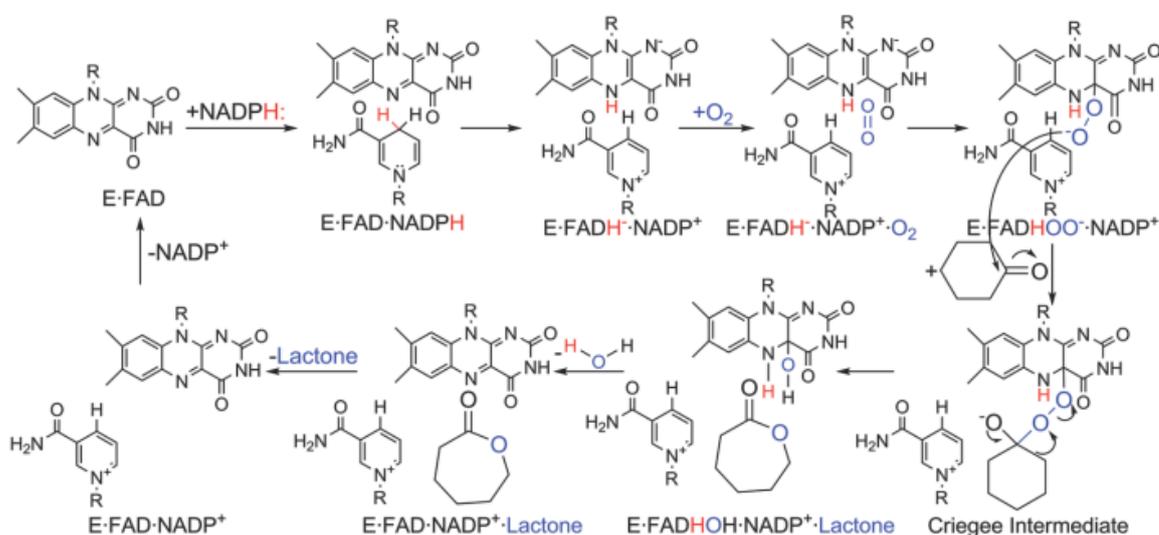
**Figura 1** - Estrutura geral de uma CHMO obtida da actinomicete *Rhodococcus sp.* HI-31. O cofator FAD é mostrado em roxo e o NADPH é mostrado em amarelo [19].



A CHMO é uma BVMO do tipo 1, e apesar dos avanços na elucidação de mecanismos de reação de BVMOs a partir de métodos espectroscópicos e cinéticos, seu mecanismo catalítico ainda não está completamente compreendido [20]. Contudo, é aceito que BVMOs apresentam um mecanismo de reação de Baeyer-Villiger similar ao da oxidação B-V por via química [15, 20]

O **Esquema 2** ilustra a representação de um mecanismo de reação de Baeyer-Villiger catalisada por BVMOs:

**Esquema 2** - Mecanismo de reação de oxidação Baeyer-Villiger por CHMO.



FONTE: referência [19]

Em uma reação com BVMOs, usando a cicloexanona como substrato, o grupo prostético FAD ligado à enzima é reduzido, via transferência de hidreto, pelo NADPH que é convertido a  $\text{NADP}^+$ . O FAD na forma reduzida sofre uma oxidação na presença de oxigênio molecular para formar o intermediário aniônico peroxiflavina, o qual está em equilíbrio com sua forma protonada. Considera-se que o intermediário peroxiflavina desempenha um papel similar ao um perácido em uma reação de Baeyer-Villiger química, pois atua como um nucleófilo ao atacar o carbono da carbonila de uma cetona e gerar um intermediário de Criegee. O complexo tetraédrico, após sofrer rearranjo, libera o produto  $\epsilon$ -caprolactona e a hidroxiflavina, que depois da eliminação de uma molécula de água regenera a enzima contendo o FAD na forma oxidada [14,19].

### 1.1.2 Recentes avanços em biotransformações de Baeyer-Villiger para obtenção de $\epsilon$ -caprolactona

As lactonas monocíclicas, bicíclicas ou policíclicas são compostos de considerável interesse em diferentes setores industriais, especialmente lactonas opticamente ativas que apresentam aplicações biológicas [17].

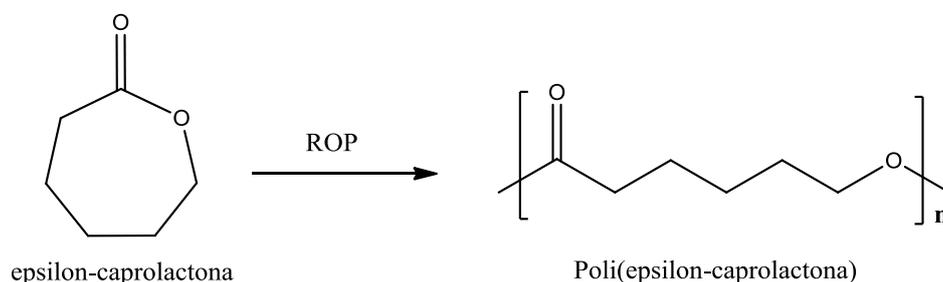
O uso de biocatalisadores em reações Baeyer-Villiger abriu novas perspectivas, não apenas do ponto de vista da síntese de novas moléculas, mas também por contribuir para melhorar seletividade, segurança e aspectos ambientais nesses processos [17].

A primeira evidência definitiva de uma formação de lactona via oxidação B-V mediada por microorganismos foi publicada em 1953 por Fried, Thoma e Klingsberg [21], quando mostraram que a fermentação de progesterona na presença dos fungos *Penicillium chrysogenum* e *Cylindrocarpon radicola* conduziram a formação da testololactona com 70% de rendimento.

Apesar da obtenção de  $\epsilon$ -caprolactona via oxidação de Baeyer-Villiger despertar atenção particular, pois esse produto é utilizado na síntese de policaprolactona (PCL) (**Esquema 3**), que é um bem conhecido polímero utilizado em aplicações biomédicas, entre outras [22]. Além disso, estudos de biooxidação B-V visando à obtenção de  $\epsilon$ -caprolactona, como reação modelo,

podem abrir caminhos para explorar aplicações diversas, por exemplo, em síntese de  $\epsilon$ -lactonas quirais [23,24].

**Esquema 3** - Obtenção de PCL por polimerização por abertura de anel (ROP).

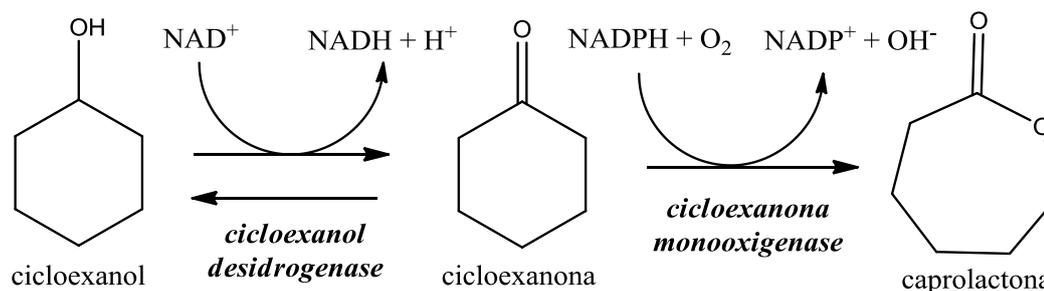


Mandal et al. [25] usaram células íntegras do fungo *Furasium oxysporum f. sp. ciceri* NCIM 1282 em biotransformação de cicloexanona e obtiveram  $\epsilon$ -caprolactona com alta seletividade (>99%). Seus resultados demonstraram que a biooxidação de Baeyer-Villiger foi fortemente dependente da concentração de cicloexanona no meio de reação.

Carballeira et al. [26], após triagem com 416 microorganismos de diferentes grupos taxonômicos (bactérias, leveduras, fungos filamentosos), frente a atividade de BVMO, selecionaram a cepa *Geotrichum candidum* NCYC49 com base em rendimentos quantitativos na conversão de cicloexanona a  $\epsilon$ -caprolactona, bem como na reprodutibilidade das condições de cultivo.

O estudo realizado pelos autores [26] mostrou que o uso de *Geotrichum candidum* NCYC49 na forma imobilizada apresentou resultados mais satisfatórios na biotransformação da cicloexanona. Ainda observaram que o cicloexanol e  $\epsilon$ -caprolactona, respectivamente, foram obtidos como resultado de uma redução e de uma oxidação de Baeyer-Villiger competitiva, que ocorria espontaneamente (**Esquema 4**). O produto preferencial foi dependente das condições reacionais.

**Esquema 4** - Biotransformações de Baeyer-Villiger com cicloexanona como substrato [26].



FONTE: Adaptado da referência [26]

Conforme destacado por Ratús et al. [23], a maior parte dos estudos sobre biooxidação de Baeyer-Villiger para obter  $\epsilon$ -caprolactonas reportam o uso de microorganismos geneticamente modificados, ou ainda, mais recentemente, enzimas isoladas [27, 28, 29].

Convencionalmente, células de *Escherichia coli* recombinantes que expressam BVMOs são as mais utilizadas em biotransformações de Baeyer-Villiger [30, 31, 32, 33, 34]. Por exemplo, Mthethwa et al. [35] usaram células inteiras de *E. coli* que expressam BVMOs geneticamente modificadas de origem fúngica (*Aspergillus flavus*) para a biotransformação de cicloexanona a  $\epsilon$ -CL e obtiveram conversão próxima a 100% ao produto  $\epsilon$ -CL em período de 2-4 horas. Interessantemente, nenhuma inibição ao substrato cicloexanona foi observada até a concentração 30 mM.

A síntese de  $\epsilon$ -caprolactona estimula o desenvolvimento de novas estratégias em biocatálise. Dentre elas, podemos destacar o emprego de células recombinantes que expressam a enzima monooxigenase de cicloexanona (CHMO) [36], o uso de enzimas isoladas comerciais e combinadas para reações “one pot” [28], imobilização ou co-imobilização de biocatalisadores [27], modificações genéticas de BVMOs [37], sistemas bifásicos [29], e exploração de novas CHMOs robustas [38] são alguns exemplos que têm sido utilizados para melhorar a produção de  $\epsilon$ -caprolactona via biotransformações B-V.

## 1.2 Biocatálise com lipases

As lipases são catalisadores biológicos pertencentes à classe das enzimas hidrolases e têm como nome sistemático triacilglicerol acilhidrolase (E.C 3.1.1.3) [39]. As lipases são definidas por sua capacidade de catalisar a hidrólise de triacilglicéris de longa cadeia acila com a formação de diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos, atuando numa interface entre a fase orgânica e a fase aquosa. Porém, em baixas concentrações de água, as lipases podem catalisar a síntese e a transesterificação de ésteres [39].

Muitas das propriedades das lipases podem variar de acordo com o gênero e espécie, o que torna difícil o estabelecimento de uma padronização nas metodologias. Como relata Castro e colaboradores [40], conforme a fonte, as lipases podem possuir massa molecular que varia entre 20 e 75 kDa, pH ótimo de atividade numa faixa de 4 a 9 e atuar numa temperatura que pode chegar até 70°C. Contudo, a maioria das lipases microbianas mostram atividade ótima entre pH 7-9 e temperatura ótima entre 30-40°C.

### 1.2.1 Seletividade das lipases

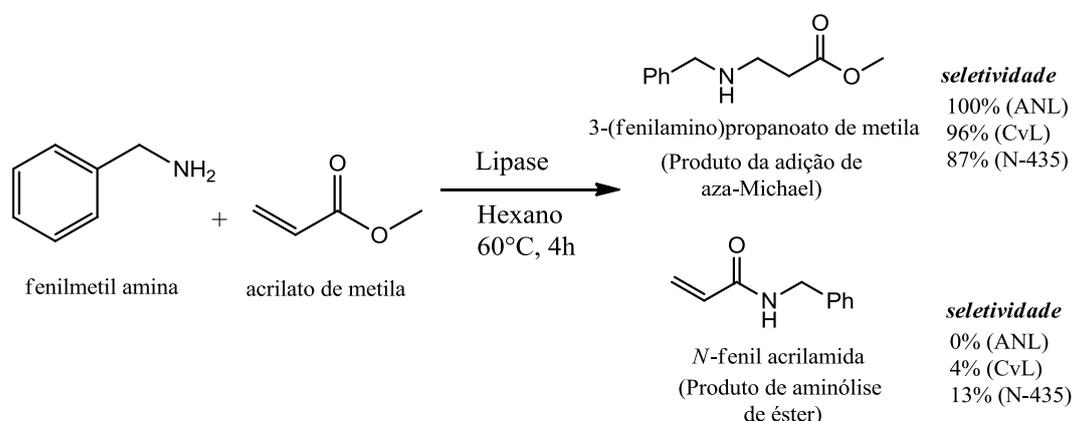
Uma das vantagens mais importantes das enzimas e que as diferenciam de catalisadores químicos é sua capacidade de catalisar reações com elevada especificidade ao substrato. As lipases são enzimas que exibem propriedades quimio-, régio- e enantiosseletivas, cuja especificidade é controlada pelas propriedades da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação da enzima ao substrato [41,42].

Nesse contexto, a quimiosseletividade [43], a estereosseletividade [44] e a regioespecificidade [45] de muitas lipases permitem que essas enzimas catalisem uma ampla variedade de reações orgânicas com mínimo de subprodutos, baixo custo de tratamento operacional e condições brandas de temperatura e pressão [42].

Com relação à **quimiosseletividade**, essa propriedade consiste na reação preferencial de uma molécula reagente para um grupo funcional na presença de outros grupos funcionais [39]. No processo reacional a enzima atua em grupo funcional específico, de modo que outros grupos funcionais são

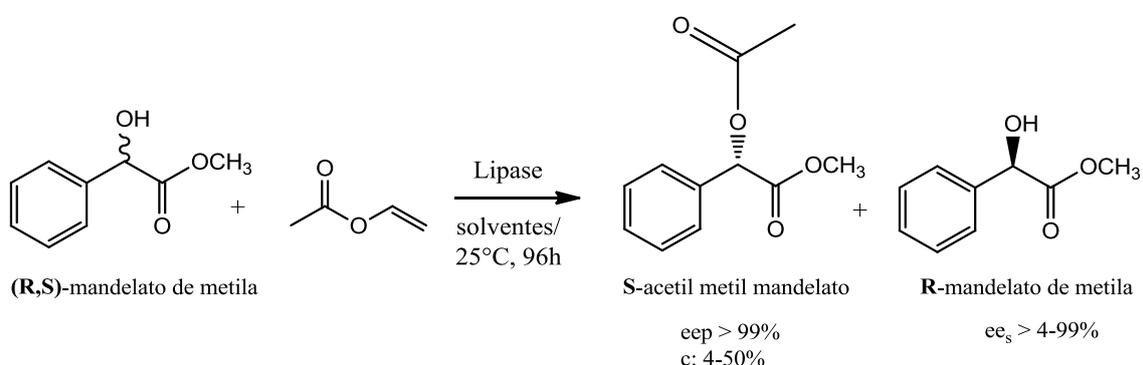
preservados (**Esquema 5**). Em síntese orgânica, por exemplo, tal propriedade permite evitar etapas de proteção e desproteção.

**Esquema 5** - Reação quimiosseletiva catalisada por lipases. *Aspergillus niger* lipase (ANL), *Chromobacterium viscosum* (CvL), Novozymes 435 (N-435) [43].



A **enantioseletividade** é uma propriedade que se refere à habilidade das enzimas distinguirem entre dois enantiômeros. A quiralidade intrínseca das enzimas permite que algumas reações biocatalisadas produzam compostos opticamente ativos. Com efeito, as lipases exibem enantiopreferência em reações estereosseletivas, o que possibilita sua aplicação em resolução cinética de misturas racêmicas [41,42,44] (**Esquema 6**).

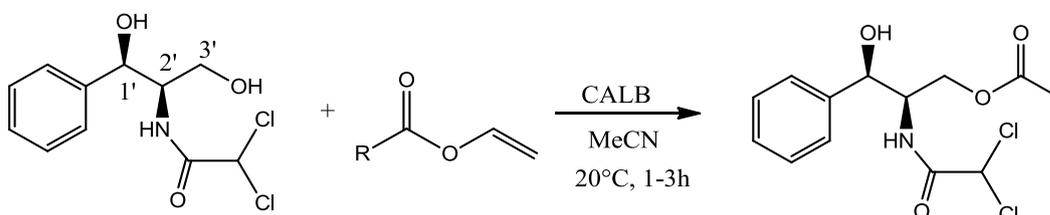
**Esquema 6** - Acilação enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila mediada por lipases [44].



As lipases também são **regiosseletivas**, isto é, possuem especificidade com relação à posição do grupo funcional da molécula no substrato. De acordo com Gupta et al. [42], tomando como base a especificidade ao substrato, as lipases podem ser classificadas em três

categorias: *lipases não-específicas*, *lipases 1,3 específicas* e *lipases ácido-graxo específicas*. Por exemplo, Silva et al. [45] mostraram que reações de acilação em tiofenicol com a lipase CALB foram completamente regioseletivas para o álcool primário (**Esquema 7**).

**Esquema 7** - Acilação regioseletiva de tiofenicol catalisada por lipase CALB [43].

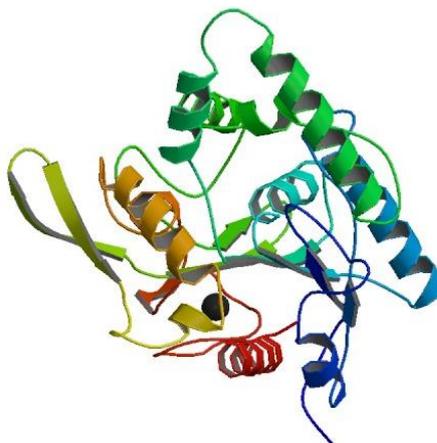


R = CH<sub>3</sub>-; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-

### 1.2.2 Lipase de *Burkholderia cepacia*

A lipase obtida de *Burkholderia cepacia* (BLC) é uma enzima comercial amplamente reconhecida por sua tolerância a solventes orgânicos, elevada estabilidade térmica e seletividade, comparada a outras lipases [46]. Devido a suas propriedades, uma das principais aplicações desta lipase em síntese orgânica envolve reações de transesterificação enzimática [46]. A lipase de *Burkholderia cepacia* é uma proteína de 320 aminoácidos e possui peso molecular de 33 kDa. A **Figura 2** mostra a estrutura de uma BCL.

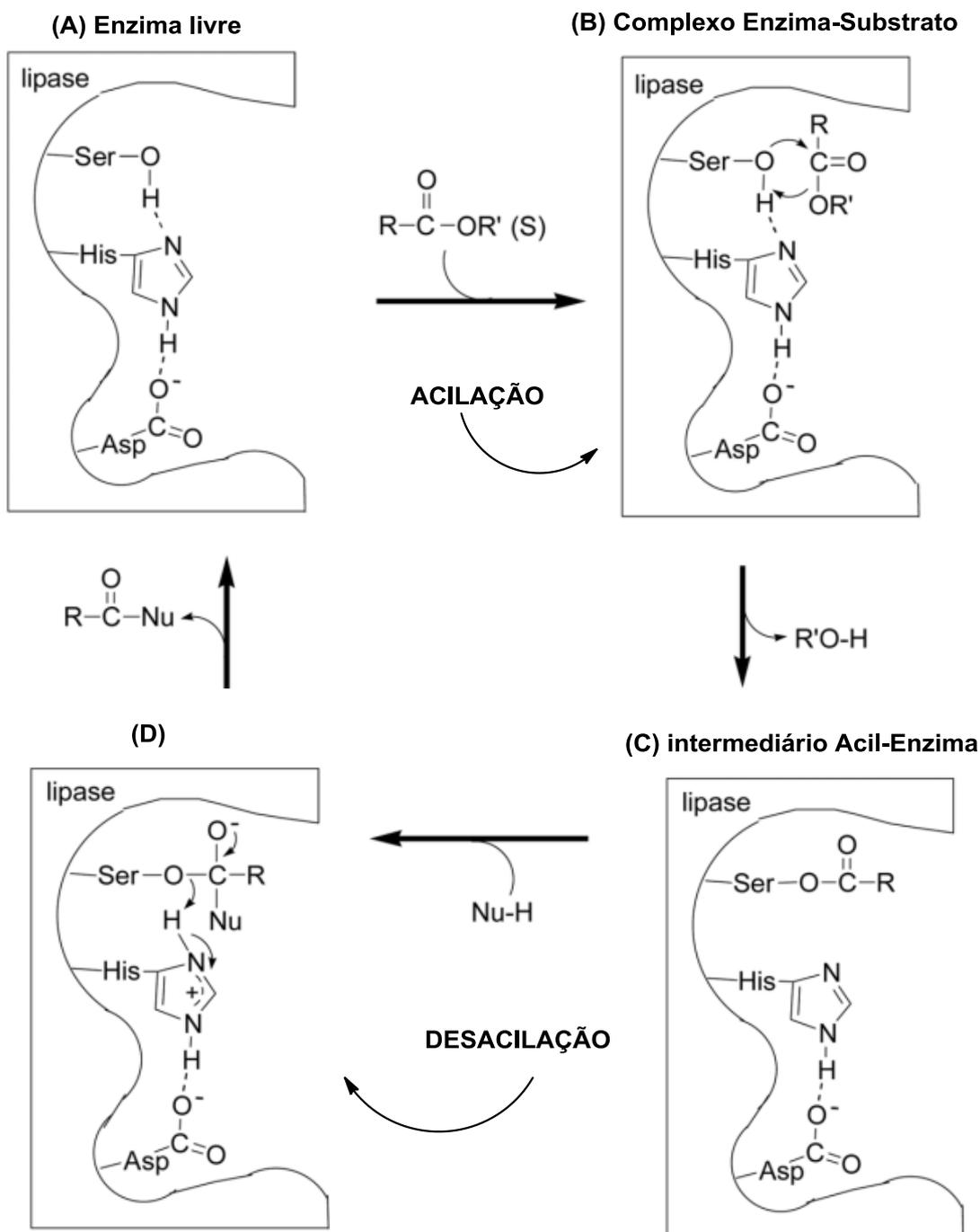
**Figura 2** - Estrutura de uma lipase de *Burkholderia cepacia* em conformação aberta [47].



FONTE: Protein Data Bank (PDB) [47]

O sítio ativo da BCL é formado pelos aminoácidos Ser87, His286 e Asp264 e resíduos hidrofóbicos constituem a parede do sítio ativo [46]. Um mecanismo de transesterificação de lipase pode ser representado na **Figura 3**:

**Figura 3** - Mecanismo de reação catalisada por lipase [48].



O mecanismo geralmente aceito de uma reação catalisada por lipase envolve duas etapas: uma etapa de acilação e outra de desacilação [48]. Pode ocorrer hidrólise se na etapa de desacilação o nucleófilo for água ou pode

ocorrer transesterificação se na desacilação o nucleófilo for um álcool do tipo R''-OH. Na primeira etapa (A), o resíduo de Histidina (His) do sítio catalítico auxilia no aumento da nucleofilicidade do oxigênio do resíduo de Ser que vai atuar como nucleófilo no ataque ao carbono carbonílico do substrato éster, ao mesmo tempo em que o grupo carboxilato do resíduo de Asp ajuda o grupo imidazol a capturar o hidrogênio da Ser. Isto leva a formação do intermediário acil-enzima com liberação de uma molécula de álcool R'-OH (B). Na etapa de desacilação (C), os aminoácidos His e Asp do sítio catalítico auxiliam o ataque nucleofílico ao intermediário acil-enzima para formar um complexo tetraédrico que após rearranjo libera o produto e restabelece o biocatalisador (D).

Na forma livre a lipase geralmente apresenta menor estabilidade e sua recuperação é muito difícil, de modo que seu reuso praticamente é inviável. Essas características diminuem o potencial de uso da lipase do ponto de vista prático, e daí decorre a necessidade de se buscar estratégias de estabilização e recuperação da enzima visando propostas em grande escala. A estratégia de imobilização de enzima é uma das mais promissoras e amplamente estudada nos últimos anos [46,49].

### **1.3 Estratégias de imobilização de biocatalisadores**

A imobilização de biocatalisadores tem se tornado uma estratégia chave para minimizar o custo relativamente alto das enzimas, de modo a viabilizar seu uso em escala comercial. Além disso, a busca por uma estabilidade enzimática desejável ao processo biocatalítico torna a pesquisa em imobilização de biocatalisadores um campo aberto e bastante fértil nesta área do conhecimento.

Ao longo dos anos, vários estudos têm sido realizados no sentido de se obter enzimas cataliticamente ativas e insolúveis no meio reacional e, ao mesmo tempo, reutilizáveis para novos processos catalíticos [1, 3, 9, 11, 50].

Organizou-se, em 1971, a primeira Conferência de Engenharia Enzimática, realizada em Henniker, EUA. Em tal conferência ficou estabelecida uma definição para o termo enzima imobilizada ou biocatalisador imobilizado, o qual foi empregado para denotar um biocatalisador fisicamente confinado ou

localizado numa certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, com a capacidade de ser repetida e continuamente utilizado [51].

De maneira geral, os métodos utilizados para imobilizar enzimas ou células de microrganismos podem envolver tanto processos físicos quanto químicos, e podem ser por adsorção ou sem a ocorrência de ligações a um suporte [3,11]. O processo de adsorção implica no ataque da enzima ou células em um suporte sólido, que pode ocorrer por interações covalentes e não-covalentes [3,11,52].

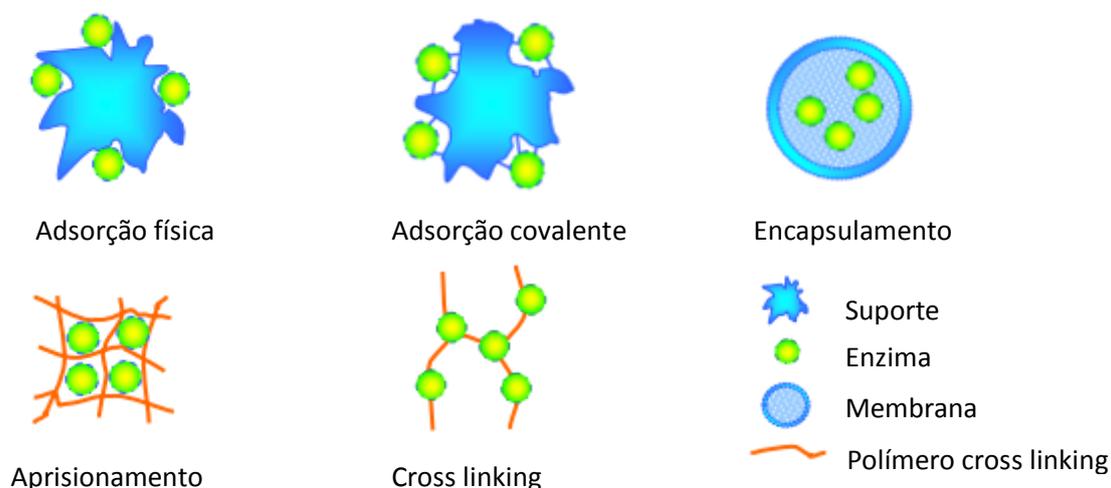
Reis et al. [53] reportaram que as principais contribuições para a diminuição da energia livre de Gibbs em um processo de imobilização de um biocatalisador em suporte sólido estão relacionadas à perda de moléculas de água, mudanças estruturais, interações eletrostáticas, interações de van der Waals e ligações específicas.

Outros métodos que podem ser empregados se referem à imobilização por confinamento, captura ou microencapsulamento sem a ocorrência de ligações físicas e/ou químicas na superfície de um suporte sólido [54,55]. Nesta situação, os biocatalisadores podem ser apenas retidos em uma membrana semipermeável ou encapsulados em um gel polimérico e sofrer uma delimitação por uma “barreira física”, que impede a sua dessorção para o meio externo, mas não restringe a sua mobilidade dentro do sistema. Desse modo, as enzimas são protegidas e ficam menos susceptíveis às mudanças estruturais [3,11,56].

Os diferentes métodos de imobilização de biocatalisadores (**Figura 4**) têm sido classificados de acordo com a natureza da interação enzima-suporte, ou ainda conforme a não utilização de um suporte [54,55,56,57,58]. A saber, podem ser divididos em:

- Adsorção física e/ou iônica (forças não-covalentes)
- Ligação covalente (Adsorção química)
- Ligações cruzadas (cross-linking)
- Encapsulamento (aprisionamento sol-gel)
- Entrapment (confinamento em membranas)

**Figura 4** - Tipos de imobilização de biocatalisadores.



FONTE: adaptado da referência [58]

Cabe ressaltar que não há um método universal de imobilização, cujo procedimento se aplique eficazmente para qualquer sistema biocatalisador. Logo, não há uma regra que prediga a magnitude da atividade e estabilidade de uma enzima após o processo de imobilização. Hanefeld et al. [59] também assinalam que a abordagem para o processo de imobilização envolve tipicamente procedimentos de tentativa e erro, até que um sistema satisfatório tenha sido desenvolvido. Nesse estágio, deve-se levar em conta, especialmente, a estabilidade alcançada após o processo de imobilização.

### 1.3.2 Sílica gel: considerações gerais

Um componente fundamental a ser considerado quando se pretende trabalhar com a Tecnologia de Imobilização de Biocatalisadores é o tipo ou a natureza do suporte.

É desejável que um material suporte para biocatalisadores, células íntegras ou enzimas isoladas, possua boa estabilidade mecânica, não se deteriore sob ação microbiana, viabilize a recuperação e reutilização do biocatalisador e ainda não seja oneroso [3,11,60].

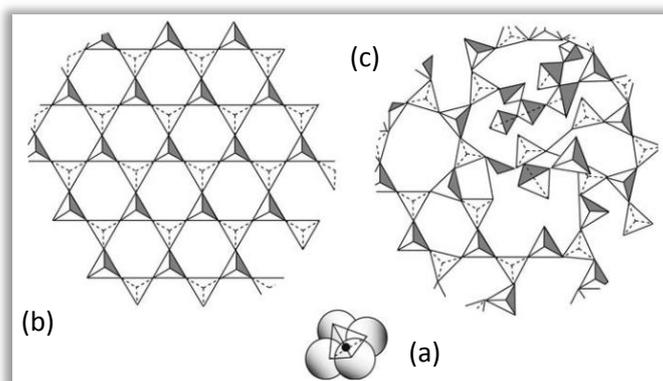
Por ser um material de baixo custo, facilmente disponível, com elevada estabilidade mecânica, resistência a ataque microbiano, morfologia porosa e

elevada área superficial [61,62], a sílica gel se apresenta como um material com potencial para imobilizar biocatalisadores, especialmente quando utilizado na forma funcionalizada.

A sílica apresenta fórmula geral  $\text{SiO}_2$ , ocorre em uma variedade de formas, podendo ser natural ou sintética, cristalina ou amorfa, com propriedades físicas e químicas ligeiramente diferenciadas. Estruturalmente, a sílica é um polímero inorgânico constituído de unidades tetraédricas de  $(\text{SiO}_4)^{4-}$  que formam uma rede tridimensional rígida, na qual quatro átomos de oxigênio estão nos vértices de um tetraedro regular com um átomo de silício na cavidade central [63].

A elevada flexibilidade da ligação Si-O-Si pode ser responsável pelas diferentes ligações de suas unidades tetraédricas, o que explica o polimorfismo da sílica, que se apresenta desde sistemas cristalinos a estruturas amorfas com sua irregularidade estrutural [63]. A **Figura 5** mostra diferentes estruturas de sílica baseadas no arranjo das unidades tetraédricas:

**Figura 5** - Representação esquemática de estruturas de sílica: (a) unidade tetraédrica, (b) estrutura regular ordenada e (c) estrutura amorfa.

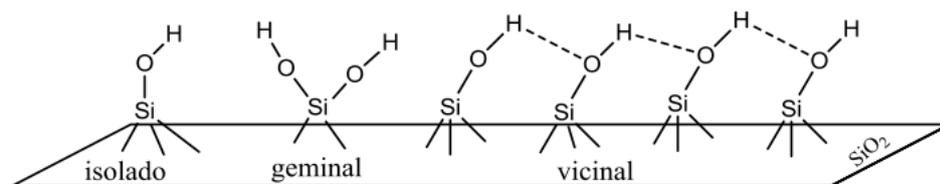


Fonte: adaptado da referência [64].

A sílica gel é uma variedade de sílica, sendo um sólido amorfo sintético, que pode ser preparado por diferentes métodos [63]. A sílica gel é constituída de grupos siloxanos ( $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ ), em sua maioria na estrutura interna, e grupos silanóis ( $\equiv\text{Si-OH}$ ) distribuídos na superfície [63,65].

As propriedades de superfície da sílica gel são fortemente dependentes dos grupos silanóis (**Figura 6**), que são considerados fortes sítios de adsorção [66]. Com efeito, a reatividade da superfície da sílica está associada à natureza, distribuição, concentração e acessibilidade dos grupos silanóis superficiais [67].

**Figura 6** - Tipos de grupos silanóis que podem estar presentes na superfície de sílica gel.



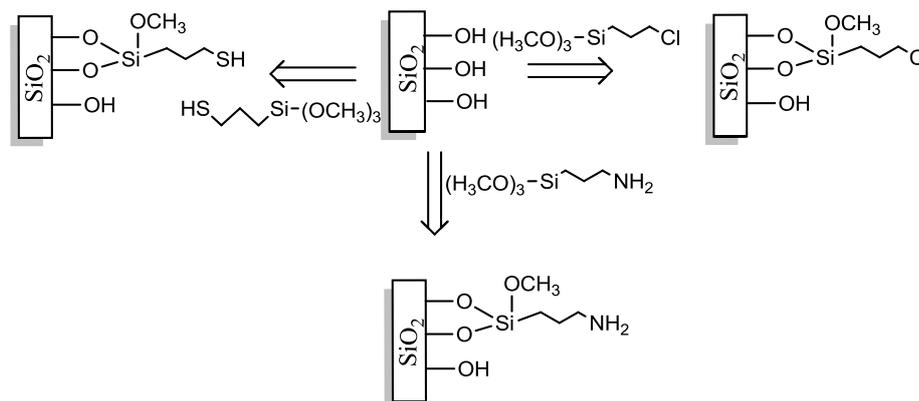
Uma vez que a estrutura da sílica gel amorfa é altamente desordenada, então é de se esperar uma distribuição irregular no arranjo dos grupos hidroxilas e, portanto, a superfície pode ser coberta por diferentes tipos de grupos silanóis em diferentes orientações.

### 1.3.3 Funcionalização de superfícies de sílicas

Uma das estratégias mais comumente utilizada para obter superfícies de sílica funcionalizadas (ou híbridas) é conhecida como método **grafting** (ou enxerto) [61,68].

Nesta estratégia, a sílica pré-formada (material comercial ou sintético) é submetida a uma ou mais reações com moléculas contendo grupos funcionais reativos frente aos silanóis superficiais da sílica. Um exemplo eficiente de modificação de superfícies da sílica ocorre através do uso de organosilanos como agentes modificadores (**Esquema 8**).

**Esquema 8** - Representação esquemática de reações de funcionalização por *grafting* com organosilanos trifuncionais em superfície de sílica.



Nesse processo de modificação da sílica gel, a reação ocorre entre grupos reativos do tipo alcoxi (metoxi, etoxi) presentes em alcoxissilanos mono, bi ou trifuncionais e os silanóis superficiais da matriz inorgânica [61]. O material obtido contém cadeias orgânicas covalentemente ligadas no suporte através de ligações do tipo  $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{R}$ , sendo hidrolíticas e termicamente estáveis, em que  $\text{R}$  representa uma cadeia orgânica contendo um grupo funcional específico. O material resultante pode ser chamado de um híbrido inorgânico-orgânico.

O híbrido inorgânico-orgânico obtido após um processo de silanização, notoriamente, altera as propriedades de superfície do suporte. Pode-se, ainda, ampliar de modo sequencial diferentes grupos moleculares ligados ao suporte, o que vai conferir maior caráter heterofuncional à superfície.

Neste contexto, a preparação de suportes funcionalizados é uma estratégia muito atrativa quando se pretende imobilizar biocatalisadores em um material sólido, pois permite a manipulação da química de superfície do suporte para atrair física ou quimicamente os biocatalisadores, tornando-os sistemas catalíticos mais estáveis.

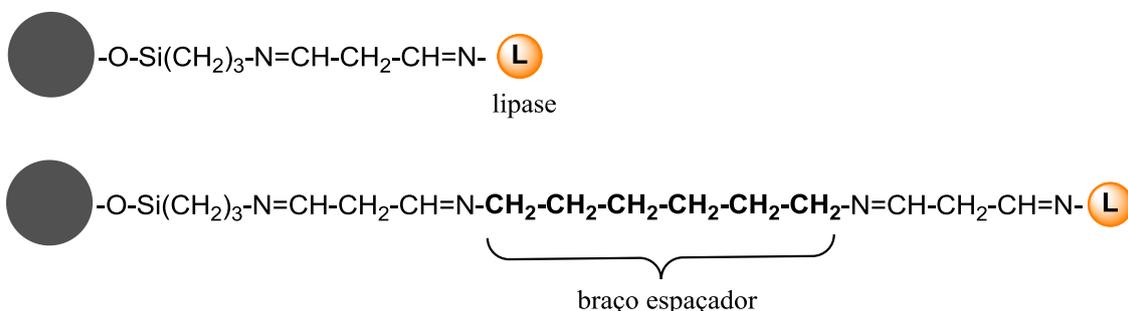
### 1.3.4 Recentes avanços na preparação de suportes heterofuncionalizados para imobilização de biocatalisadores

Um suporte heterofuncional pode ser definido como um material com funcionalidades distintas que permitem interações físicas e/ou químicas com a superfície de biocatalisadores [69].

Com base na ideia de heterofuncionalidade do suporte, novos materiais a base de sílica têm sido desenhados para possibilitar um controle estrito no processo de imobilização de biocatalisadores.

Gul Ozyilmaz [70] analisou o efeito de espaçadores, ligados na superfície de sílica gel, sobre a atividade hidrolítica e sintética de uma lipase de *Candida rugosa* covalentemente imobilizada no suporte (**Figura 7**).

**Figura 7** - Imobilização de lipase em suporte modificado com espaçadores.



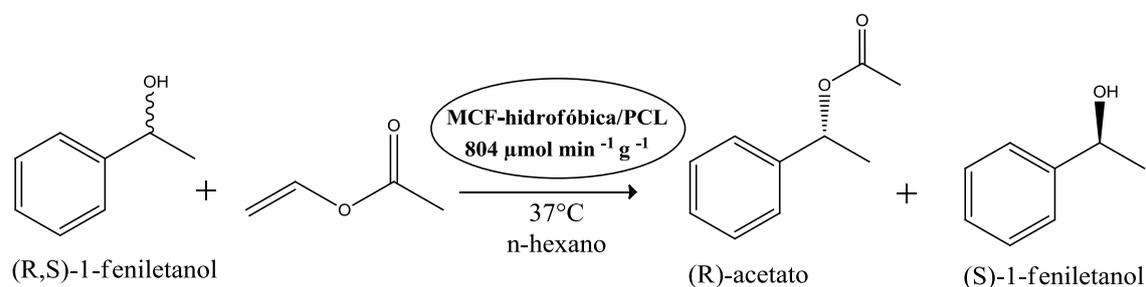
Fonte: adaptado da referência [70]

Os autores [70] observaram elevada estabilidade operacional da lipase imobilizada nos suportes modificados, rendendo mais de 50% de atividade catalítica mantida após 100 ciclos catalíticos repetidos na reação de síntese do p-nitrofenilpalmitato. Estes resultados demonstraram o efeito estabilizador do suporte contendo espaçadores heterofuncionais ligados na superfície da sílica.

Materiais mesoporos de sílica do tipo MCF (siliceous mesocellular foams) foram preparados para conter diferentes superfícies hidrofílicas/hidrofóbicas [71]. Esses materiais foram utilizados como suporte para imobilização da lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL). Os resultados deste estudo demonstraram que a lipase imobilizada no suporte MCF com superfície hidrofóbica exibiu maior performance catalítica, na reação de

transesterificação de 1-feniletanol (**Esquema 9**), do que a MCF com superfície hidrofílica.

**Esquema 9** - Reação de transesterificação do racêmico 1-feniletanol via lipase de *Pseudomonas* imobilizada em MCF de superfície hidrofóbica.

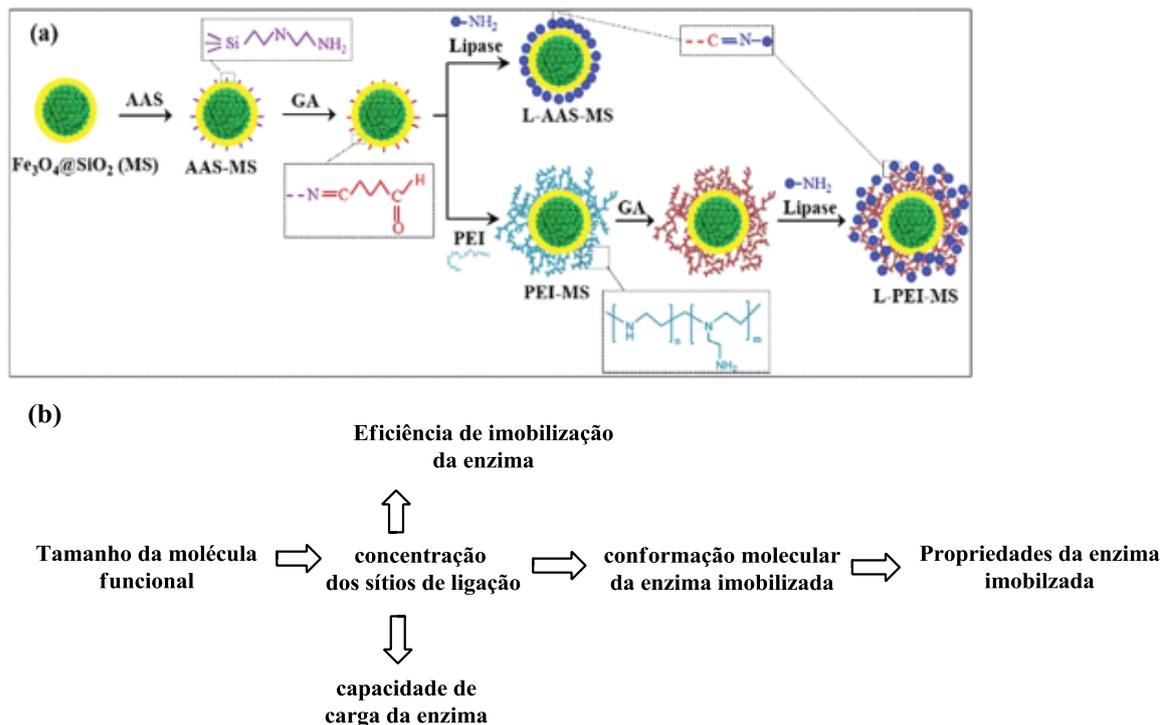


Os autores [71] atribuíram esse resultado ao fato de que uma superfície hidrofóbica pode induzir mudanças conformacionais tornando os sítios ativos da PCL mais acessíveis ao substrato e ao solvente, devido à própria natureza hidrofóbica de uma “lid” (“tampa”) que recobre o centro ativo da PCL.

Uma nova geração de suportes heterofuncionalizados tem sido desenvolvida a partir nanopartículas magnéticas revestidas com sílica funcionalizada. Essas nanopartículas magnéticas podem ser encapsuladas dentro de camadas de sílicas cuja superfície pode sofrer funcionalizações químicas de interesse para imobilização de biocatalisadores.

Ayyoob Arpanaei et al. estudaram o efeito do tamanho das moléculas funcionais ligadas em uma nanopartícula magnética do tipo core/shell encapsulada em sílica [72] (**Figura 8**).

**Figura 8** - Preparação de uma nanopartícula magnética com superfície de funcionalizada (a) para imobilização de lipase. (b) correlação entre parâmetros funcionais e propriedades da enzima imobilizada. AAS (3-(2-aminoetilamino)propiltrimetoxissilano), GA (glutaraldeído) e PEI (polietilenoimina).



Fonte: adaptado da referência [72].

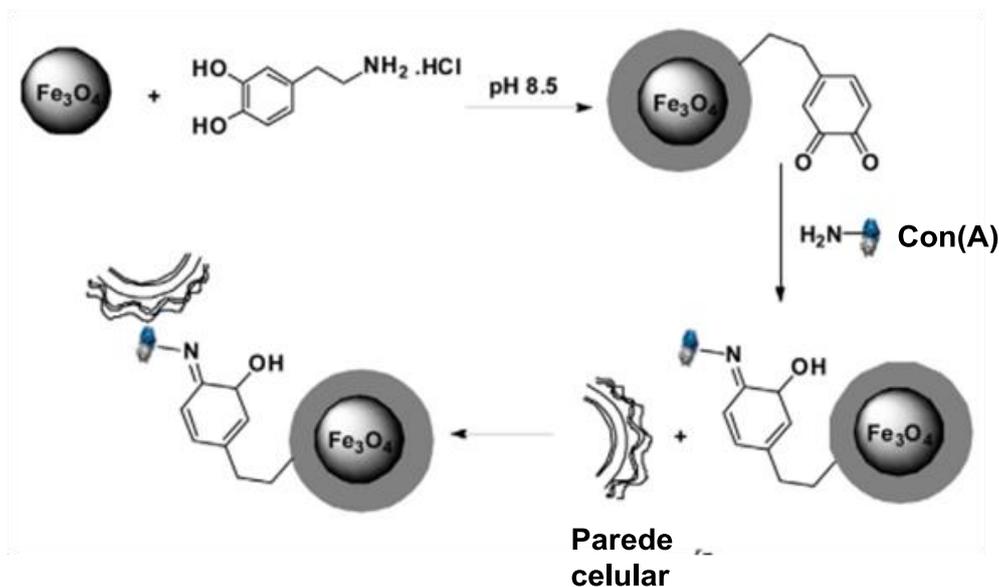
Os sólidos obtidos (AA-MS e PEI-MS-GA) foram utilizados para imobilização de lipases e os resultados da performance catalítica demonstraram que um método de funcionalização de superfície apropriado pode melhorar, não apenas a capacidade de carga do biocatalisador, mas também a conformação e a retenção da atividade biológica das lipases.

A Imobilização de células inteiras tem sido mais recentemente estudada como uma estratégia que pode superar limitações impostas por células livres ou enzimas isoladas.

Meng-Yao Zhuang et al [73] desenvolveram um método de imobilização baseado em nanopartículas magnéticas funcionalizadas contendo concanavalina A (ConA) como espaçador para imobilização de células íntegras (**Figura 9**). Células recombinantes de *E. coli* que expressam enzimas glicerol desidrogenases foram empregadas no processo de imobilização celular e ensaiadas na conversão biocatalítica de glicerol a 3-diidroxiacetona. As células

imobilizadas exibiram elevada atividade catalítica (340 U/g massa celular seca) e após 10 ciclos de reutilização mantiveram 62% da atividade catalítica inicial.

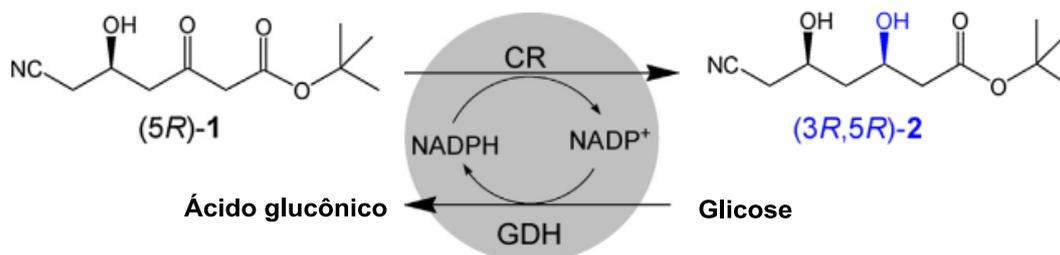
**Figura 9** - Preparação das nanopartículas magnéticas e imobilização das células recombinantes de *E. coli*.



Fonte: adaptado da referência [73].

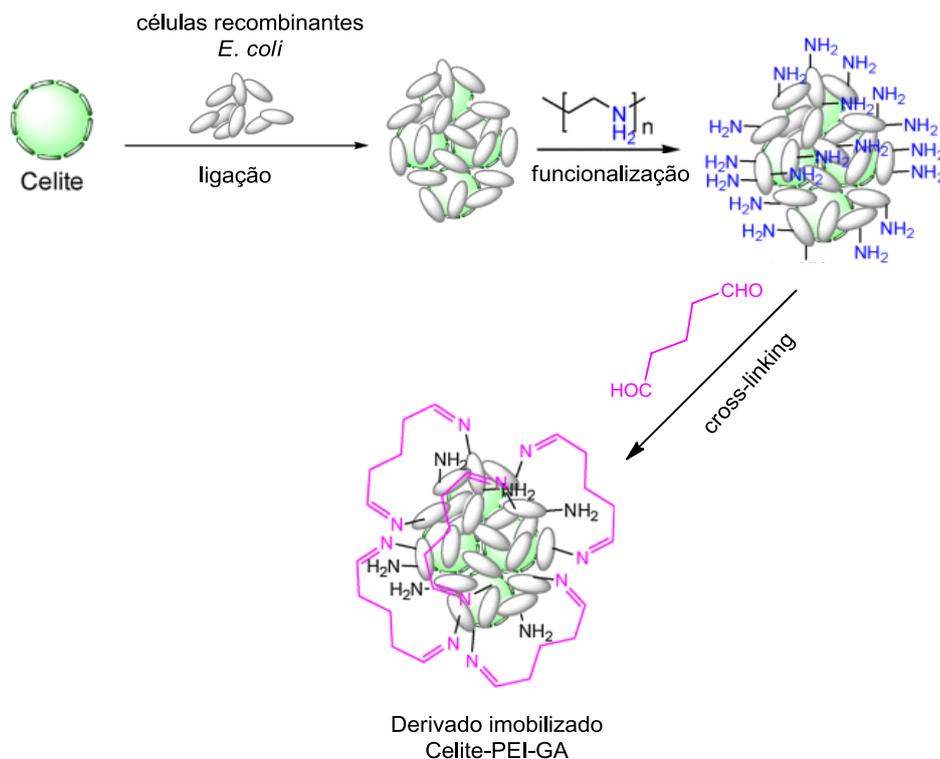
Um sistema de imobilização de células íntegras foi preparado por Wang et al. [74] utilizando o suporte Celite (terra diatomácias), polietilenoimina (PEI) e gluraldeído (GA). Células de *E. coli* recombinantes que co-expressam carbonil redutase e glucose desidrogenase foram empregadas no processo de imobilização. As células inteiras livres e imobilizadas foram aplicadas na biorredução *t*-butil 6-ciano-(5R)-hidroxil-3-oxolhexanoato (5R)-1 para obter (3R,5R)-2 (**Esquema 10**). Um esquema de preparação das células de *E. coli* imobilizadas é mostrado na **Figura 10**.

**Esquema 10** - Redução assimétrica de (5R)-1 a (3R,5R)-2 por carbonil redutase (CR) e glucose desidrogenase (GDH) expressas em células inteiras de *E. coli*.



FONTE: Adaptado da referência [74]

**Figura 10** - Preparação de processo de imobilização de células de *E. coli* com sistema Celite-PEI-GA.



FONTE: adaptado da referência [74]

Em comparação com as células livres, o sistema contendo células imobilizadas apresentou maior desempenho catalítico quanto à estabilidade operacional e reciclagem.

## 2 OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS

Apesar da extensa pesquisa e dos avanços em biocatálise obtidos com estudos de reações de Baeyer-Villiger com enzimas livres ou células íntegras e ainda em síntese orgânica catalisada por lipases, o emprego de biocatalisadores não imobilizados apresenta enormes dificuldades em termos de estabilidade e reciclagem dos sistemas enzimáticos. Além disso, a pesquisa com imobilização de biocatalisadores é um campo em desenvolvimento e novas abordagens são necessárias para o aprimoramento de sistemas mais estáveis e biocataliticamente versáteis.

Com base no exposto acima, o escopo desta tese foi propor a imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* e células íntegras de *Geotrichum candidum* em suportes de sílicas funcionalizadas, como estratégia de estabilização de biocatalisadores, usando como modelo biotransformações de cetonas via células do *G. candidum* e transesterificação enzimática de p-nitrofenilpalmitato.

Para tanto foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Preparar sílicas funcionalizadas a partir da sílica gel comercial
- Imobilizar os biocatalisadores nos suportes funcionalizados
- Estudar o potencial biocatalítico das células íntegras de *G. candidum* livres e imobilizadas em reações com cetonas cíclicas e/ou aromática
- Avaliar o potencial biocatalítico de lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em reação de transesterificação

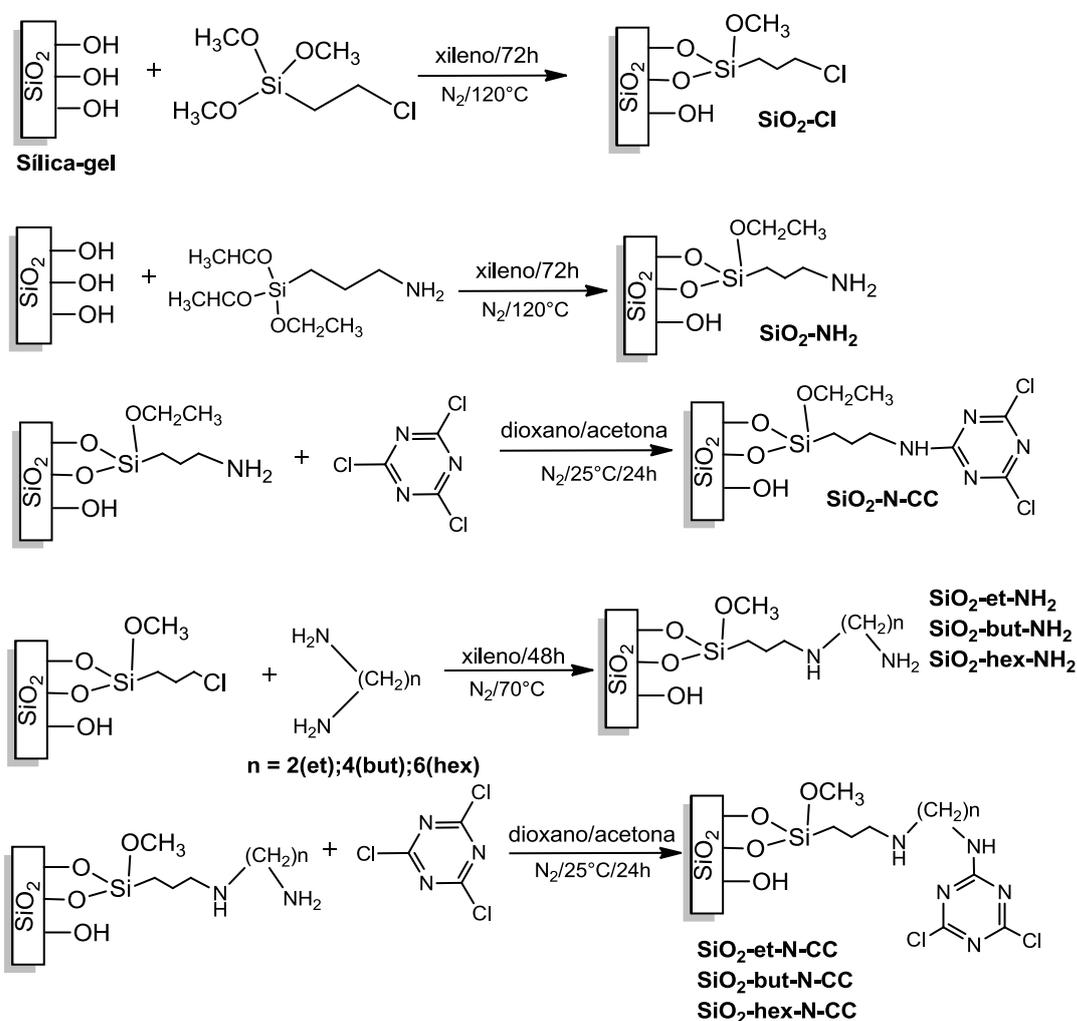
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

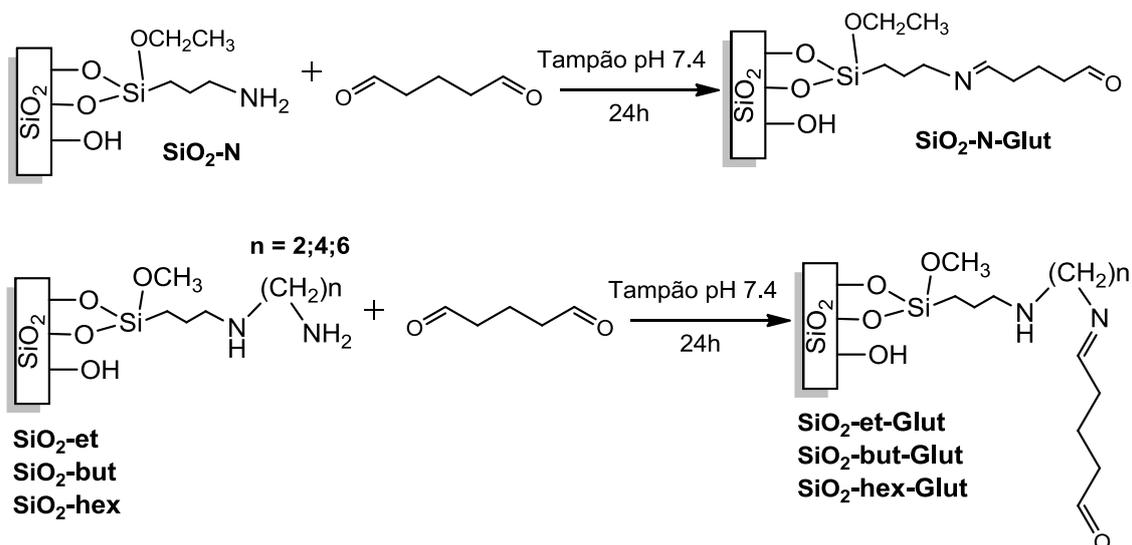
#### 3.1 Obtenção das superfícies de sílica funcionalizadas

As reações de modificação da superfície de sílica gel foram realizadas com a intenção de preparar suportes ativados para imobilização de biocatalisadores, neste caso, enzimas lipases isoladas e células íntegras de *G. candidum*. Neste sentido, foram utilizadas rotas de preparação de sílicas funcionalizadas com base em métodos já estabelecidos na literatura [75].

O **Esquema 11** apresenta um resumo geral da sequência de reações que foram propostas para a obtenção dos suportes funcionalizados, partindo do polímero inorgânico sílica gel:

**Esquema 11** - Resumo geral das reações de funcionalização da sílica gel.





Ao alcance do nosso conhecimento, os materiais SiO<sub>2</sub>-et-CC, SiO<sub>2</sub>-et-Glut, SiO<sub>2</sub>-but-CC, SiO<sub>2</sub>-but-Glut e SiO<sub>2</sub>-hex-Glut foram preparados pela primeira vez, utilizando a rota de funcionalização apresentada no **Esquema 10**.

Além disso, ao melhor do nosso conhecimento, os suportes funcionalizados obtidos neste trabalho foram empregados de forma inédita na imobilização, estabilização e reações de biotransformação com as células íntegras de *G. candidum* ou com a lipase.

Na primeira etapa de funcionalização da sílica, foram preparados os materiais de partida através de reações de silanização e utilizados diretamente como suportes na imobilização das células de *G. candidum*. Em outra etapa, as sílicas derivadas foram funcionalizadas em reações subsequentes para imobilização de lipases. Os materiais obtidos foram submetidos à caracterização físico-química para avaliar a sua química de superfície.

A **Tabela 2** mostra o percentual encontrado de carbono, hidrogênio e nitrogênio na composição química de alguns suportes:

**Tabela 2** - Dados de análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos nos materiais funcionalizados\*.

Superfície	%C	%H	%N	C (mmolg <sup>-1</sup> )	N (mmolg <sup>-1</sup> )	C/N (calc.)	C/N (Exp.)
SiO <sub>2</sub> -Cl	4,81	0,11	-	4,01	-	-	-
SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	5,21	1,61	1,82	4,34	1,30	4,00	3,34
SiO <sub>2</sub> -N-CC	5,72	1,52	3,08	4,76	2,20	1,80	2,20
SiO <sub>2</sub> -Et	5,54	0,75	2,33	-	-	-	-
SiO <sub>2</sub> -But	7,10	0,74	2,06	-	-	-	-
SiO <sub>2</sub> -Hex	8,10	1,84	2,13	6,75	1,52	5,00	4,44
SiO <sub>2</sub> -Et-CC	6,25	0,58	3,95	-	-	-	-
SiO <sub>2</sub> -But-CC	7,67	1,64	3,91	-	-	-	-
SiO <sub>2</sub> -Hex-CC	8,41	1,59	3,60	7,01	2,57	2,60	2,73

\* Todos os dados mostrados representam uma média de duas medidas experimentais.

A efetividade das reações de silanização do suporte sílica gel, obtida na primeira etapa, pode ser confirmada com a incorporação dos grupos cloropropil (4,81% C) e aminopropil (5,21% C) provenientes dos silanos 3-cloropropiltrimetoxissilano e 3-aminopropiltriethoxissilano, respectivamente, como mostra a **Tabela 2**. Considerando que a molécula do alcoxissilano é um reagente trifuncional (três grupos reativos no alcoxissilano) e a reação ocorreu em atmosfera anidra (N<sub>2</sub>), além disso, por razões estéricas, a reação de condensação com os grupos silanóis se dá predominantemente de forma mono e bifuncional [64], foi possível estimar a quantidade de grupos cloropropil e aminopropil imobilizados na sílica com base na **Equação 1**:

$$n_f = \frac{Pc}{MC \cdot 100 \cdot n_c} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que, Pc é porcentagem de carbono obtida na análise elementar, MC é a massa atômica do carbono e n<sub>c</sub> representa o número de átomos de

carbono presentes no ligante ancorado na superfície. Portanto, a quantidade de grupos cloropropil e aminopropil ancorados foi estimada em cerca de 1,00 mmol por grama de sílica. Foi assumido que existe somente uma estrutura orgânica na superfície da sílica e ao menos um grupo alcoxi não reagiu com os grupos silanóis. Esses resultados são compatíveis com valores reportados na literatura quando se trata de silanização de superfícies de sílica gel [76,77].

Para os sólidos obtidos em etapas subsequentes de funcionalização, também pode ser visto que o aumento na porcentagem de nitrogênio nos materiais modificados com as diaminas alifáticas e após a reação com o cloreto cianúrico sugere a incorporação dessas moléculas nas superfícies dos suportes.

Medidas de adsorção de nitrogênio  $N_2$ , mostrados na **Tabela 3**, foram realizadas para avaliar a área superficial específica, volume de poro e diâmetro de poro dos sólidos  $SiO_2$ ,  $SiO_2-Cl$  e  $SiO_2-NH_2$  e  $SiO_2-SH$ .

**Tabela 3** - Dados de medidas de área superficial, volume de poro e tamanho médio de poro pelo método (BET) para os suportes  $SiO_2$ ,  $SiO_2-Cl$ ,  $SiO_2-NH_2$  e  $SiO_2-SH$ .

<b>Suporte</b>	<b>Área superficial (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Volume de poro (cm<sup>3</sup>/g)</b>	<b>Tamanho de poro (Å)</b>
<b>SiO<sub>2</sub></b>	<b>452,1</b>	<b>0,795</b>	<b>70,39</b>
<b>SiO<sub>2</sub>-SH</b>	<b>390,2</b>	<b>0,568</b>	<b>58,22</b>
<b>SiO<sub>2</sub>-Cl</b>	<b>371,9</b>	<b>0,492</b>	<b>52,88</b>
<b>SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>	<b>281,5</b>	<b>0,474</b>	<b>54,01</b>

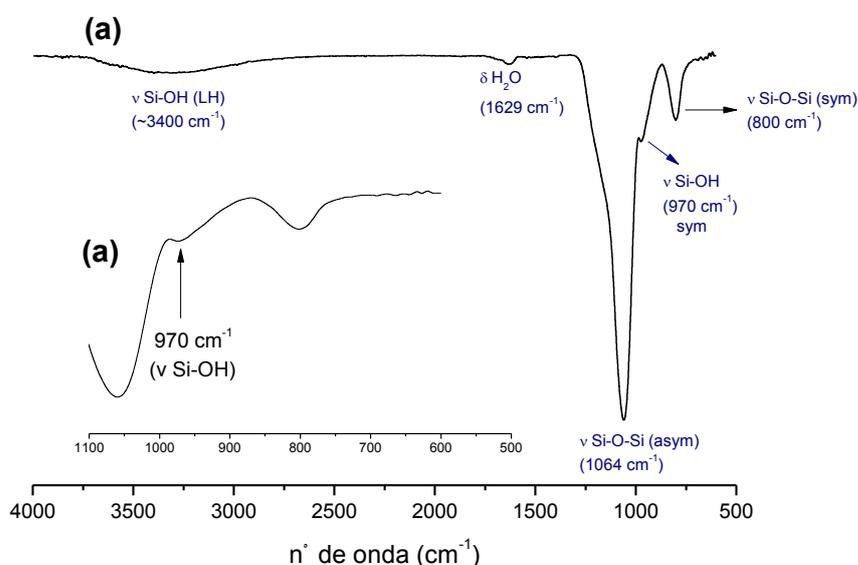
A partir dos dados obtidos da análise de adsorção de  $N_2$  pelo método BET, observa-se que em todos os materiais funcionalizados ocorreu diminuição dos parâmetros físicos área superficial, volume de poro e tamanho médio de poro, o que pode ser atribuído à introdução de grupos funcionais orgânicos na superfície e nos canais mesoporosos da sílica irregular que restringem o acesso e adsorção de  $N_2$  na superfície da sílica [78].

No caso da  $SiO_2-NH_2$  as alterações desses parâmetros físicos foi mais pronunciada, obtendo-se 38% de área superficial menor em relação à  $SiO_2$ , e isto evidencia maior densidade de fase orgânica quimicamente ligada neste

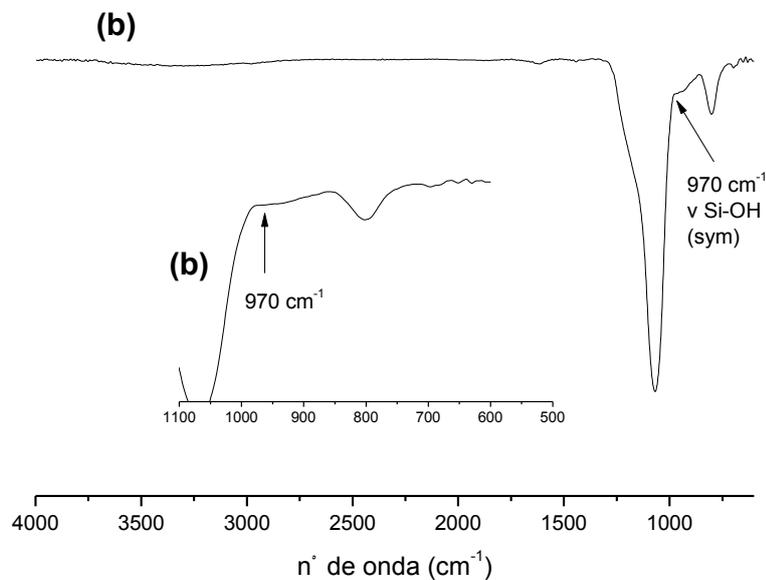
material. Por outro lado, para o sólido  $\text{SiO}_2\text{-SH}$  houve uma diminuição de área em 14%, o que representa menor densidade de grupos mercaptopropil ligado ao suporte. A mesma tendência foi observada por Walcarius et al. [79] quando utilizou sílica gel comercial Kieselgel 60 (K60) na silanização com aminopropiltrimetoxissilano (APTS) e mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTS). Neste estudo, os autores obtiveram 45 % de área superficial reduzida para K60 modificada com APTS e 26% de área superficial reduzida para K60 modificada com MPTS.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) obtidos para os materiais Sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ),  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  e  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  e são mostrados nas **Figuras 11, 12 e 13**, respectivamente. No espectro da  $\text{SiO}_2$ , bandas típicas do polímero inorgânico sílica gel são observadas na região de  $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  que podem ser atribuídas à frequência de estiramento O-H, e o pico de deformação é observado em  $1629\text{ cm}^{-1}$ . Vibrações de estiramento simétrico e assimétrico do grupo Si-O-Si podem ser vistos em  $800\text{ cm}^{-1}$  e  $1064\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente [80].

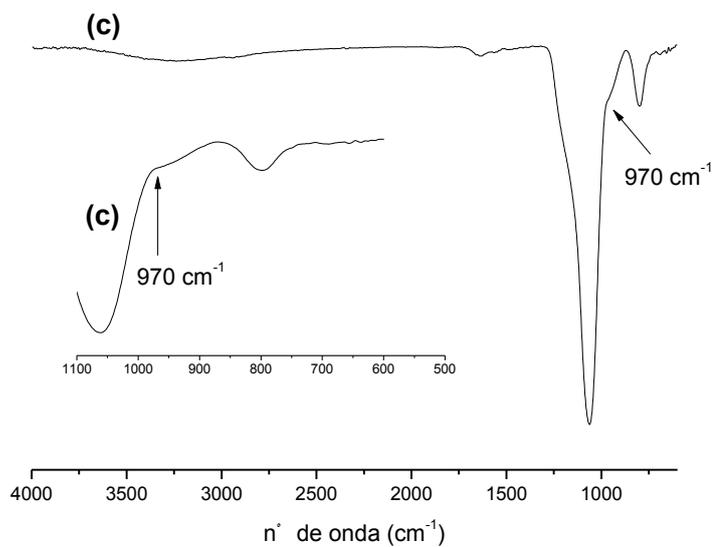
**Figura 11** - Espectros de absorção na região do infravermelho ( $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ ) utilizado a técnica FTIR-ATR para os suportes (a)  $\text{SiO}_2$ , (b)  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  e (c)  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



**Figura 12** - Espectros de absorção na região do infravermelho ( $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ ) utilizado a técnica FTIR-ATR para o suporte (b)  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$ .



**Figura 13** - Espectros de absorção na região do infravermelho ( $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ ) utilizado a técnica FTIR-ATR para o suporte (c)  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .

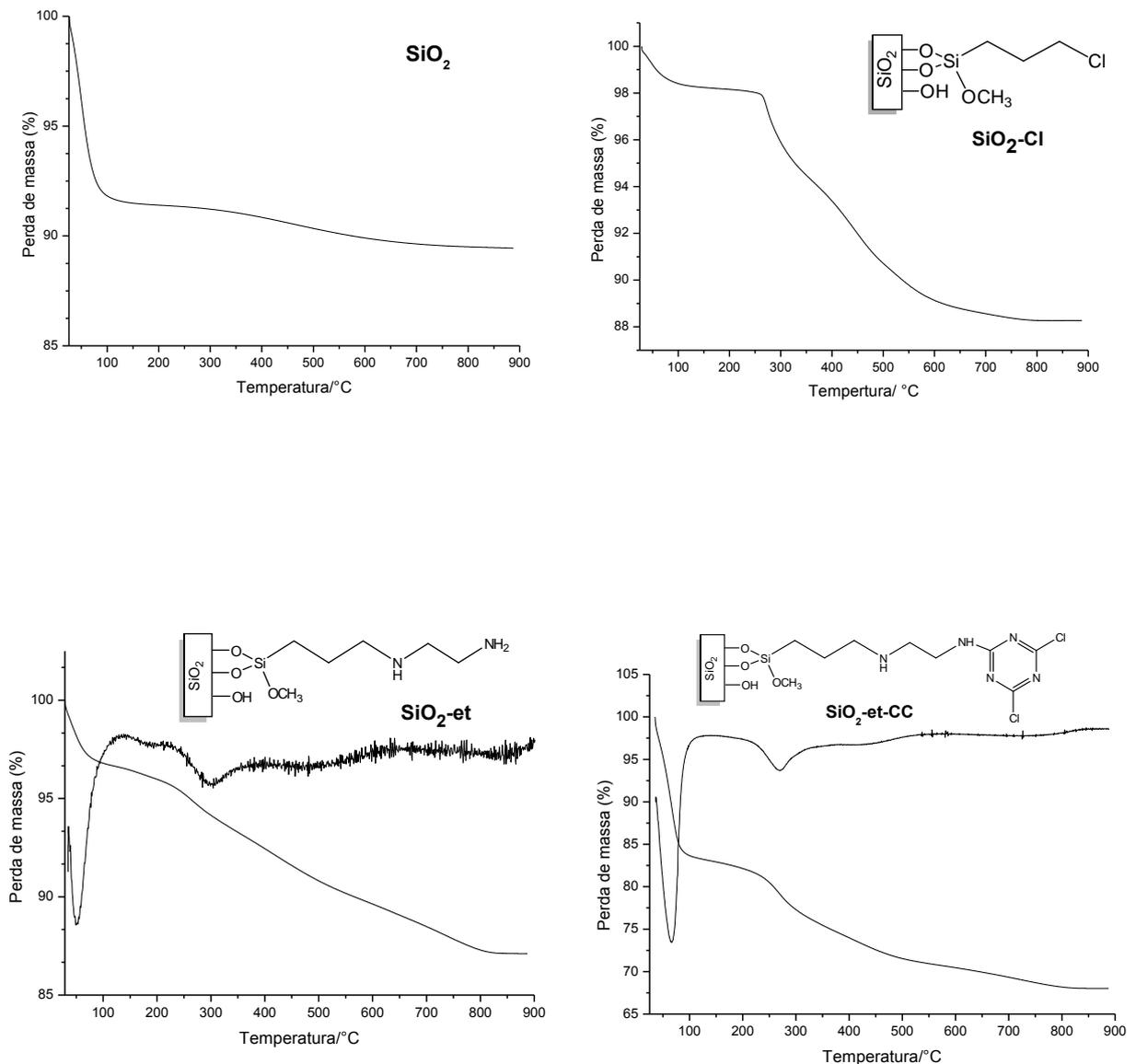


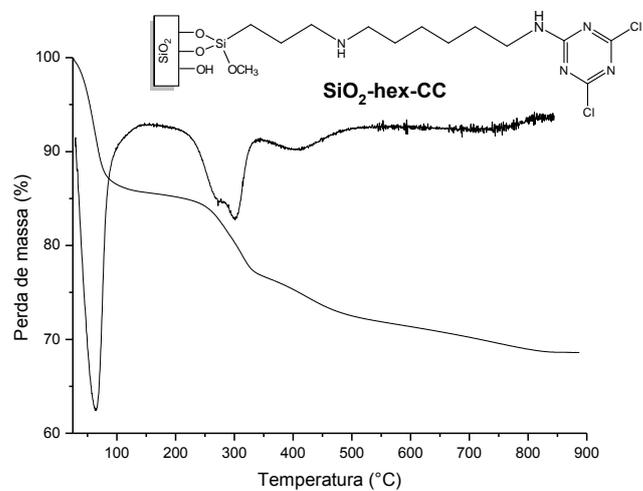
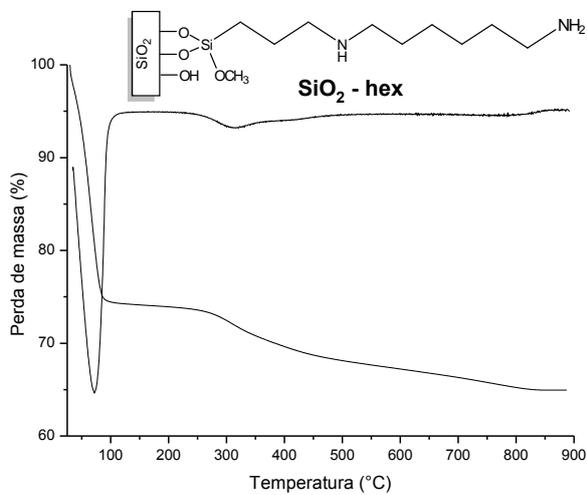
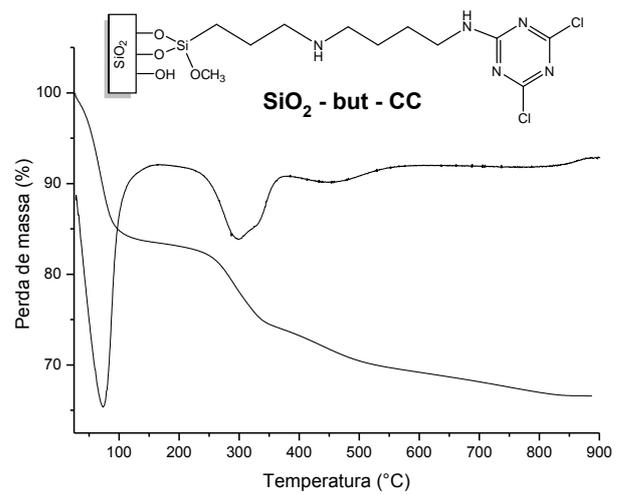
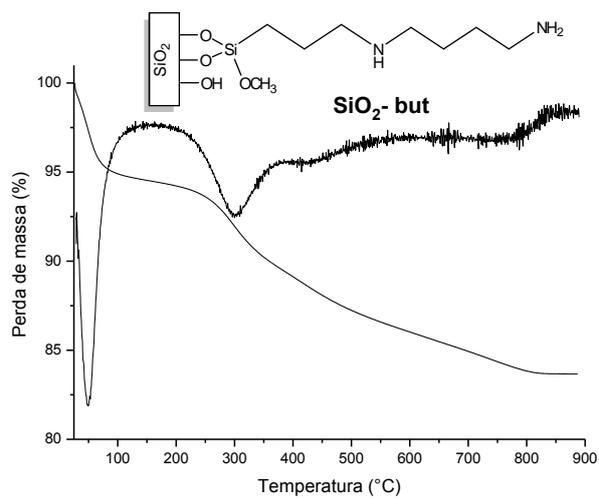
Pode-se observar que nos espectros das superfícies modificadas  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  e  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , há uma diminuição na banda de absorção em torno de  $970\text{ cm}^{-1}$  referente à vibração de estiramento simétrico dos grupos silanóis ( $\nu\text{ Si-OH}$ ). A

ausência ou diminuição dessa banda de absorção sugere fortemente a diminuição de grupos silanóis superficiais devido às reações de condensação entre estes e os grupos alcóxidos dos agentes sililantes 3-cloropropiltrimetoxissilano e 3-aminopropiltriethoxissilano.

Curvas termogravimétricas (**Figura 14**) foram obtidas para avaliar a estabilidade térmica dos suportes a partir da perda de massa dos materiais.

**Figura 14** - Curvas termogravimétricas para os suportes sílica gel pura  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  e  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ,  $\text{SiO}_2\text{-et}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-et-CC}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but-CC}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-hex}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-hex-CC}$ .





As porcentagens de perda de massa podem ser calculadas utilizando a **Equação 2:**

$$\%W = \frac{W_{Ti} - W_{Tf}}{W_{Ti}} \cdot 100$$

**(Eq. 2)**

Em que  $T_i$  é a temperatura inicial de perda de massa,  $T_f$  é a temperatura final de perda e  $\%w$  é a porcentagem de perda de massa no intervalo  $T_i - T_f$ .

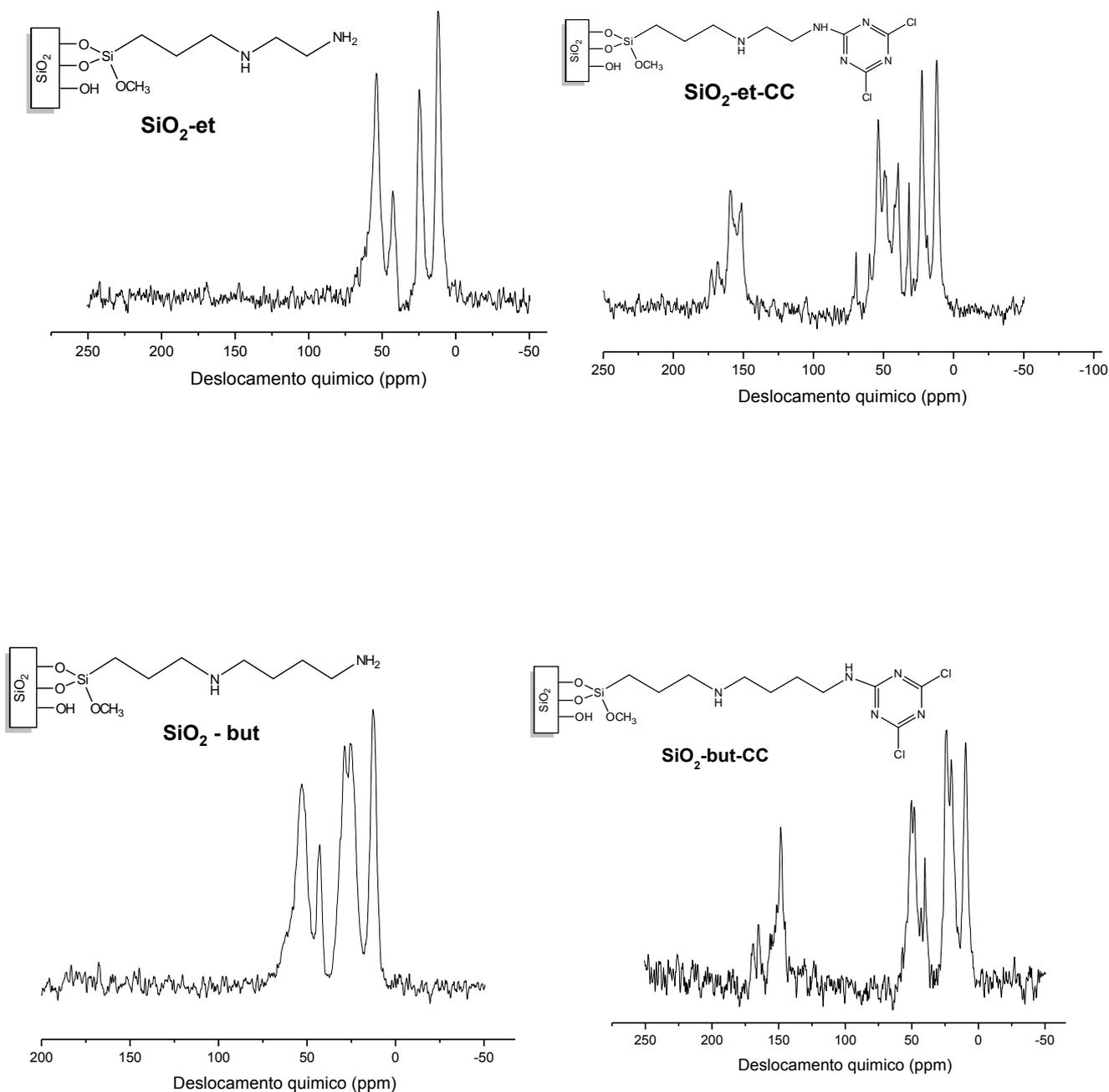
Na curva termogravimétrica da  $\text{SiO}_2$  se observa a ocorrência de uma etapa de perda de massa em aproximadamente 100 °C, que pode ser atribuída à eliminação de moléculas de água fisicamente adsorvidas e corresponde aproximadamente a 10% de moléculas de água removidas nesta etapa. Em etapas superiores a 250°C, é bem estabelecido que a ocorrência de perdas de massa na sílica gel pura deve estar associado à condensação de grupos silanóis do polímero inorgânico.

Nos materiais funcionalizados, as curvas termogravimétricas mostram claramente um aumento pronunciado e progressivo de perda de massa acima de 200°C, que pode estar associado à decomposição simultânea de grupos orgânicos ligados quimicamente à superfície da sílica. Alguns autores estimam que perdas de massa em sílicas funcionalizadas possam ocorrer no intervalo de 200-600 °C [76,77], contudo foi observado um intervalo de termodecomposição maior nos materiais funcionalizados neste estudo.

Conforme esperado, as curvas termogravimétricas das superfícies funcionalizadas na segunda etapa apresentaram maior perda de massa na faixa de temperatura estudada, quando comparadas às superfícies funcionalizadas na primeira etapa. Este resultado pode contribuir para confirmar a presença de fases orgânicas quimicamente ligadas após as reações de funcionalização referentes a alguns materiais obtidos na segunda etapa.

Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 15**) foram obtidos para os suportes modificados com as diaminas alifáticas  $\text{SiO}_2\text{-Et}$  e  $\text{SiO}_2\text{-but}$ , e após a reação com cloreto cianúrico  $\text{SiO}_2\text{-et-CC}$  e  $\text{SiO}_2\text{-but-CC}$  e estes foram comparados com espectros dos materiais  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-hex}$  e  $\text{SiO}_2\text{-hex-CC}$  (ver apêndice A).

**Figura 15** - Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos para os suportes modificados  $\text{SiO}_2\text{-et}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-et-CC}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but-CC}$ .



A incorporação do cloreto cianúrico no sólido  $\text{SiO}_2\text{-but}$  pode ser confirmada pelo aparecimento de novos picos relativos aos deslocamentos químicos observados em 149 ppm a 170 ppm, que podem ser atribuídos à

presença de carbono aromático no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do suporte  $\text{SiO}_2$ -but-CC.

Já no espectro obtido para o suporte  $\text{SiO}_2$ -et, após a reação com o cloreto cianúrico ( $\text{SiO}_2$ -et-CC), embora a presença dos picos entre 173 ppm e 151 ppm possam ser atribuídos a incorporação do cloreto cianúrico ao suporte, ocorreu também aparecimento de vários picos inesperados e de complexa interpretação. Considera-se provável que o surgimento dos vários picos estranhos à estrutura sugerida para o  $\text{SiO}_2$ -et-CC (**Figura 15**) pode ser o resultado de várias possibilidades de acoplamentos devido ao menor tamanho da molécula etilenodiamina comparada às outras diaminas.

Os materiais  $\text{SiO}_2$ -N-Glut,  $\text{SiO}_2$ -et-Glut,  $\text{SiO}_2$ -but-Glut e  $\text{SiO}_2$ -hex-Glut foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, em que foi observada a presença de banda de absorção na região próxima a  $2940\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$  que podem ser atribuídas ao estiramento  $\text{-C-H}$  e  $\text{-C=O}$  de grupo aldeído, respectivamente (ver apêndice A).

A reação do reagente bifuncional glutaraldeído com os suportes de sílica contendo grupos amino livres ocorreu com desenvolvimento de cor que variou do alaranjado para o vermelho intenso dependendo do suporte ativado com grupo amino. O sólido  $\text{SiO}_2$ -N-Glut foi obtido com coloração vermelha-marrom mais intensa enquanto o sólido  $\text{SiO}_2$ -et-Glut desenvolveu uma cor levemente alaranjada (ver apêndice D).

Zucca e Sanjust [75] relatam que o desenvolvimento de cor durante reação de um suporte com a molécula de glutaraldeído pode ser utilizada para estimar o grau de ativação do suporte. Uma coloração amarela indicaria baixa ativação, enquanto uma coloração alaranjada pode indicar uma ativação moderada e uma cor vermelho-marrom indica forte ativação do suporte. Embora geralmente se atribua a formação de base de Schiff entre o glutaraldeído e grupos amino livres, outros mecanismos têm sido propostos [81,82].

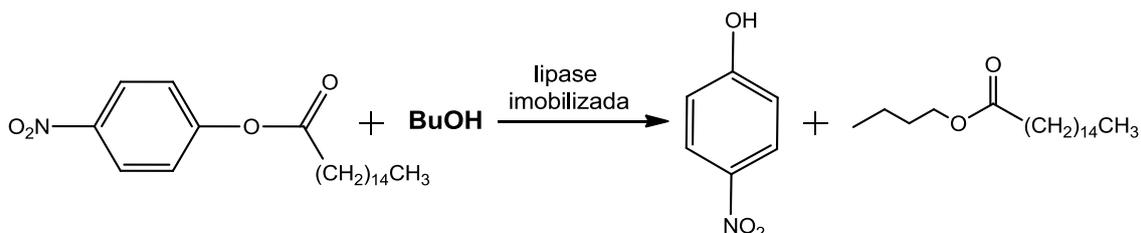
### 3.2 Ensaios biocatalíticos com lipase de *Burkholderia cepacia*

O ensaio biocatalítico com lipase imobilizada foi iniciado com o material  $\text{SiO}_2$ -hex-CC, que foi utilizado como suporte modelo para imobilização de lipase

com base em bons resultados obtidos de atividade de hidrólise enzimática por nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores [83].

Em um primeiro ensaio, a lipase de *Burkholderia cepacia* foi imobilizada no suporte SiO<sub>2</sub>-hex-CC e o biocatalisador imobilizado, chamado agora SiO<sub>2</sub>-hex-CC-BCL, foi aplicado na reação de transesterificação do p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) com o álcool n-butanol, como mostra a **Esquema 17**:

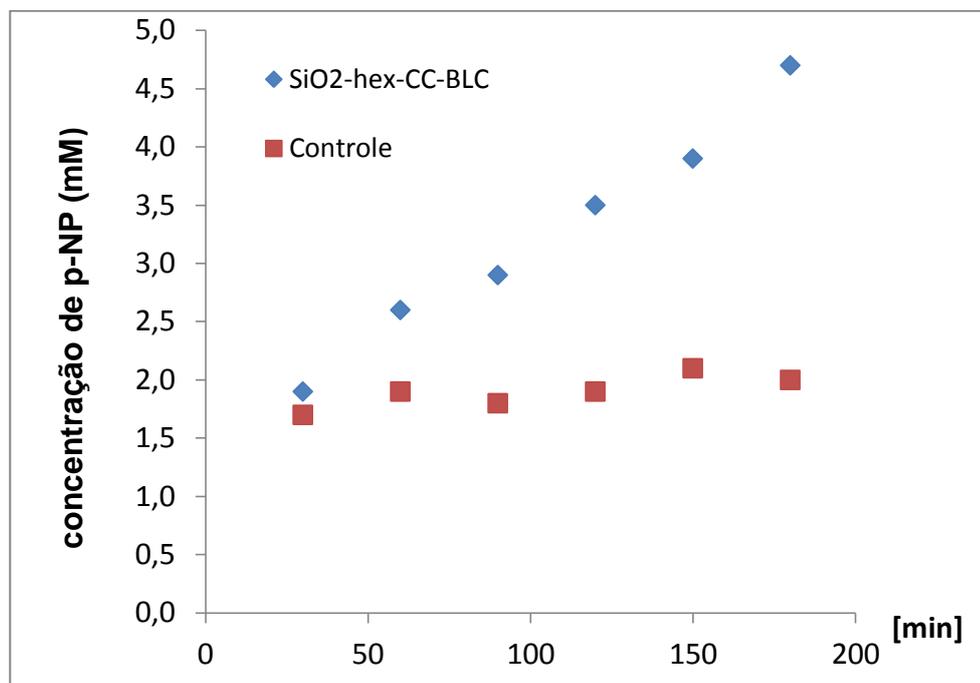
**Esquema 12** - Reação de transesterificação de p-NPP por biocatalisador SiO<sub>2</sub>-hex-CC-BCL.



O éster p-NPP é uma molécula modelo para investigar atividade enzimática de lipases, visto que a sua hidrólise ou transesterificação libera o p-nitrofenol que pode ser determinado espectrofotometricamente por UV-Vis. Neste estudo, a transesterificação do p-NPP que forma pNP foi acompanhada por mudanças na absorvância em 314 nm e a determinação quantitativa foi calculada com base na diferença dos coeficientes de extinção molar do substrato e do produto, conforme método adotado por Fu et al. [84]. Uma reação controle foi realizada sob as mesmas condições de transesterificação com o suporte sem a enzima para avaliar o efeito espontâneo da transesterificação.

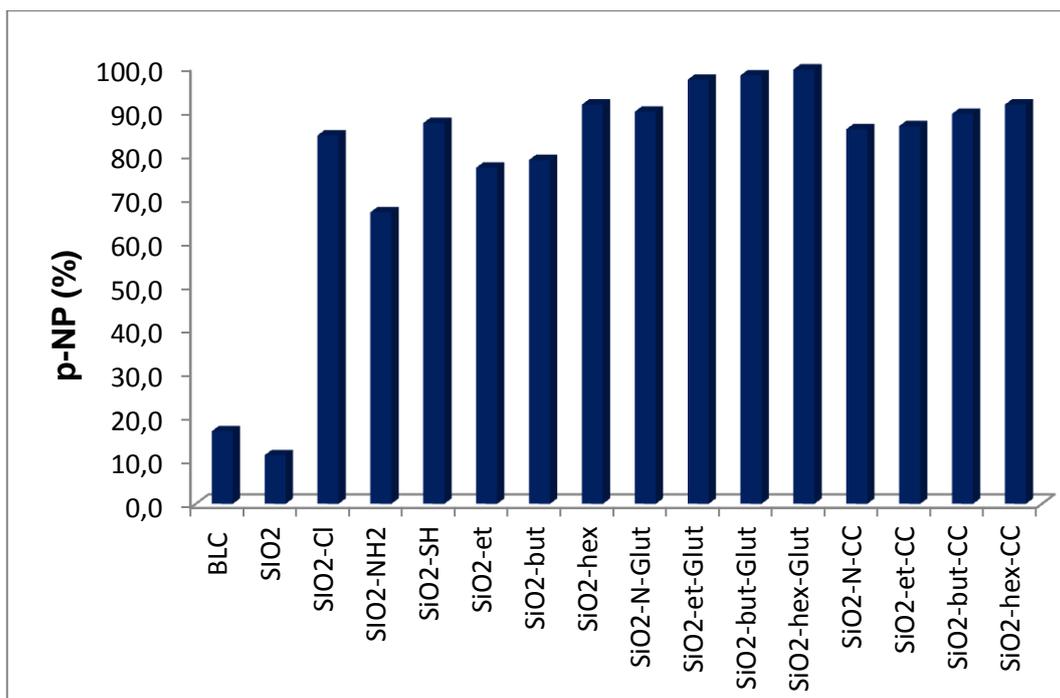
O resultado (**Figura 16**) demonstrou que a lipase ligada ao suporte foi cataliticamente ativa para a reação de transesterificação, convertendo 49% do substrato ao produto p-NP. Este resultado, de interesse meramente qualitativo em relação à performance da enzima, foi importante para avaliarmos o potencial de impacto da química de superfície do suporte às restrições conformacionais ao centro ativo da enzima.

**Figura 16** - Transesterificação de p-NPP por biocatalisador SiO<sub>2</sub>-hex-CC-BCL. Condições: 22,5 mg biocatalisador imobilizado, 5 cm<sup>-3</sup> p-NPP (10 mM), 460 μL BuOH.



De posse desses resultados, foram realizados experimentos de transesterificação do p-NPP com a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em diferentes suportes ativadas, no intuito de investigar a influência do tipo de superfície ativada, tamanho do espaçador e reuso do biocatalisador imobilizado. Os resultados são mostrados na **Figura 17**.

**Figura 17** - Transesterificação de p-NPP por vários biocatalisadores. Condições: 6,5 mg BCL livre ou 100 mg BCL imobilizada, 5 cm<sup>-3</sup>p-NPP (10 mM), 460 µL BuOH.



Como mostra a **Figura 17**, os resultados da transesterificação com a lipase imobilizada foram superiores em comparação a lipase livre. Embora isso possa ocorrer em alguns casos, é mais comum que atividade enzimática de biocatalisador imobilizado seja menor do que da enzima livre, uma vez que nem sempre toda proteína disponível para imobilização fica retida no suporte após a imobilização e geralmente ocorre perda de atividade catalítica no sistema imobilizado devido à ocorrência de alterações conformacionais no sítio catalítico da enzima promovidas pela ativação do suporte [46].

Em contraste com as afirmações acima, é importante considerar que lipase de *Burkholderia cepacia* é uma enzima com estrutura muito complexa, conhecida por sofrer ativação interfacial mediante interações hidrofóbicas que reorientam o sítio catalítico da enzima para sua forma ativa aberta [46,49,85]. Com efeito, a química de superfície do suporte pode fornecer uma estabilidade adicional a lipase ao permitir uma orientação favorável para a atividade enzimática.

Neste estudo, os suportes utilizados na imobilização da lipase foram desenhados para fornecer uma superfície heterofuncional, contendo

características mais hidrofóbicas ou mais hidrofílicas com grupos reativos capazes promover ligações covalentes ou eletrostáticas com a enzima, dependendo do tipo de ativação realizada.

Na sílica não silanizada, suporte  $\text{SiO}_2$ , foi observado menor porcentagem de transesterificação que pode estar relacionada perda de enzima no processo de imobilização devido à fracas interações entre enzima e sílica hidrofílica. Nas sílicas silanizadas, sem as diaminas, foi observado um potencial maior de transesterificação do p-NPP comparado com a sílica hidrofílica, 67% de conversão quando o suporte foi  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , 84% quando foi o  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  e 87% para a lipase imobilizada em  $\text{SiO}_2\text{-SH}$ .

No caso do suporte ativado com cloro ou com o grupo mercapto, há possibilidade de interações hidrofóbicas que ativam a lipase para uma orientação mais favorável durante o processo catalítico, o que também pode acontecer com a sílica ativada com o grupo amino, sendo que esse último contém o grupo amino que também pode interagir com a lipase por atração eletrostática entre os grupos amino protonados e parte negativa da superfície da enzima.

Nas sílicas ativadas com as diaminas foi observado maior conversão do p-NPP com leve tendência de crescimento quanto maior o tamanho da diamina ligada na superfície da sílica gel. Nestes materiais, o maior caráter hidrofóbico e maior distância entre a enzima e o suporte pode ter proporcionado maior estabilidade conformacional à enzima, o que resultaria em maior atividade catalítica.

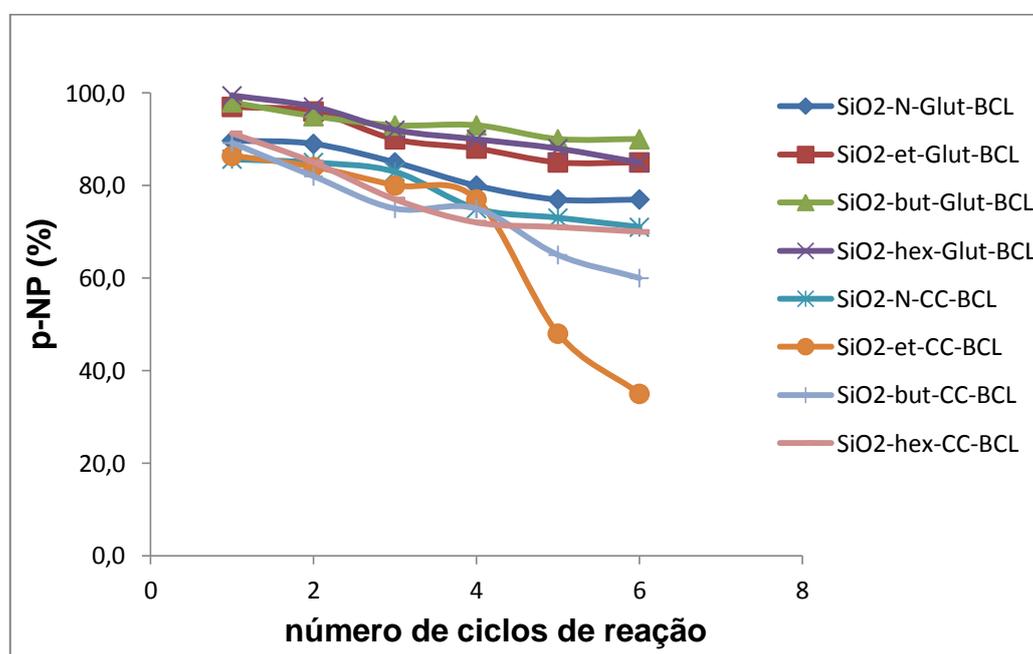
Nas superfícies de sílica ativada com diaminas como espaçadores contendo também glutaraldeído ou cloreto cianúrico para proporcionar ligações covalentes com a lipase mostraram que a presença de um espaçador sugere maior flexibilidade conformacional para a enzima. A influência de um espaçador ativado em um suporte sobre a performance catalítica de lipases é uma estratégia que vem sendo amplamente investigada por alguns autores [70,86, 87].

Contudo os resultados obtidos com os materiais contendo grupos reativos para formar ligações covalentes com grupos amino terminais da lipase pode exercer maior influência na performance catalítica da enzima, a depender do tipo grupamento envolvido na interação com a lipase. Nós observamos que

os suportes ativados com glutaraldeído proporcionaram maior atividade catalítica para a lipase, resultando em conversões acima de 95%. Esses resultados foram levemente superiores aos materiais ativados com cloreto cianúrico, o que sugere não apenas a efetividade superior do glutaraldeído como agente de ligação para a enzima, mas pode indicar também maior rigidez conformacional da enzima ligada aos suportes ativados com a molécula triazínica.

Para melhor entender o impacto da ativação do suporte na estabilidade da lipase BCL foram realizados experimentos de reuso com as superfícies ativadas com glutaraldeído e cloreto cianúrico. Os resultados são mostrados na **Figura 18**.

**Figura 18** - Reciclagem dos biocatalisadores após transesterificação de p-NPP. Condições: 100 mg BCL imobilizada, p-NPP (10 mM), 460  $\mu\text{L}$  BuOH em 5  $\text{cm}^3$  de hexano.



Nos experimentos de reuso dos biocatalisadores, após cada reação as mostras foram filtradas sob pressão reduzida e lavadas com hexano e imediatamente utilizada na transformação de p-NPP com n-butanol. Os resultados obtidos das reações de reciclagem confirmam a maior tendência de estabilização enzimática provocada pelos suportes ativados com glutaraldeído. Em todos os biocatalisadores suportados em superfícies de sílica ativada com

cloreto cianúrico houve uma perda mais pronunciada da atividade de transesterificação do p-NPP. Após seis ciclos de reuso, apenas até 71% de conversão foi observada para estes materiais. A menor conversão 35% foi observada para o sólido SiO<sub>2</sub>-et-CC-BCL, enquanto a maior conversão 90% após seis ciclos de reação foi observado para o material SiO<sub>2</sub>-but-Glut-BCL. Esses resultados evidenciam que para melhorar as propriedades da lipase como a BCL, não apenas a distância entre suporte e enzima ou somente o tipo de ligação efetiva entre enzima e suporte devem ser considerados.

### 3.3 Biotransformações com células de *Geotrichum candidum* CCT 1205

Biotransformações de Baeyer-Villiger foram realizadas com células de *Geotrichum candidum* CCT 1205 livres e imobilizadas, em que foram utilizados como substratos o cicloexanol, cicloexanona e cicloexenona.

Inicialmente, a cicloexenona foi usada como substrato na reação de biotransformação para estudar reações em cascata através de processos de redução *one-pot* e de oxidação biológicas. Nos ensaios iniciais dois meios de cultura foram testados, extrato para levedura (Yeast Media-YM) e Sabouraud, assim como também foi investigado a influência da presença de glicose como regenerador de cofatores nas reações de biotransformação da cicloexenona.

As reações foram realizadas com 1 grama de massa úmida das células de *G. candidum* em solução Tampão fosfato com pH 6,5 e acompanhadas por cromatografia gasosa (CG-FID). Como resultado desses testes preliminares, após 24 de reação foi possível verificar a conversão total do substrato ao produto desejado, a  $\epsilon$ -caprolactona, apenas quando se utilizou as células crescidas no meio **YM** e na ausência de glicose durante a biotransformação. Observamos também que a presença de glicose na reação de biotransformação inibe a reação de oxidação, de modo que, apenas produtos da redução das ligações **C=C** e **C=O** foram obtidos.

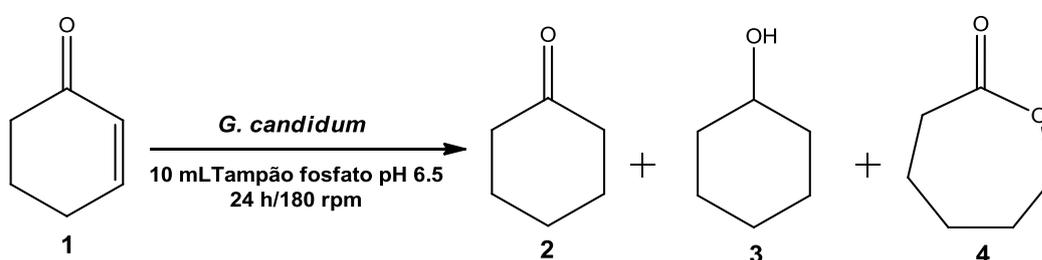
Esses primeiros resultados foram muito importantes na definição do meio de cultivo das células de *G. candidum*, assim como a otimização para evitar a presença de glicose durante o processo de biotransformação da cicloexenona, já que nosso maior interesse era a produção de lactonas. Para

isso as células de *Geotrichum candidum*, após centrifugadas, foram lavadas para retirada do excesso de glicose residual do meio YM.

### 3.3.1 Biotransformação da cicloexenona

Para otimizar resultados obtidos da biotransformação de cicloexenona com o meio YM, vários testes foram realizados com diferentes concentrações dos substratos e das células úmidas do *G. candidum* no meio reacional. As reações foram acompanhadas por cromatografia gasosa com uso de padrões comerciais dos produtos. Os resultados são mostrados na **Tabela 4**.

**Tabela 4** - Biotransformação de cicloexenona usando várias condições.



Entrada <sup>a</sup>	Biomassa <sup>b</sup> (gramas)	Substrato [mM]	1 (%) cicloexenona	2 (%) cicloexanona	3 (%) cicloexanol	4 (%) ε-CL
1	1,0	3,1	0	67	14	18
2	1,0	10,3	63	33	4	0
3	2,0	10,3	29	62	9	0
4	3,0	10,3	0	0	0	100

<sup>a</sup> porcentagem de conversão foi determinada usando cromatografia gasosa. <sup>b</sup>biomassa refere-se à peso de células úmidas lavadas.

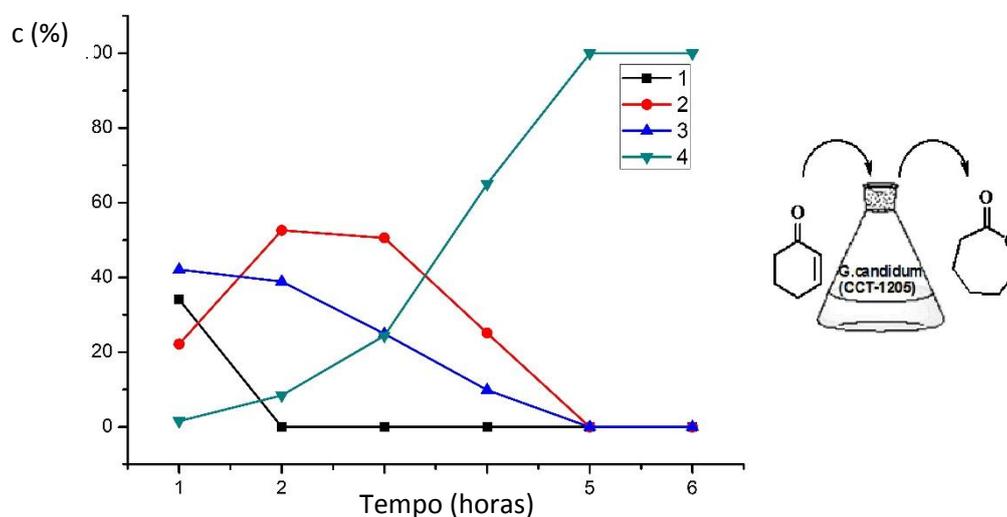
Conforme se observa na **Tabela 4**, não ocorre biotransformação da cicloexenona para dar o composto **4** (**ε-CL**) quando a concentração do substrato foi 10,3 mM (entradas 2 e 3), e apenas as atividades das enzimas *eno-redutase* (ERED) produzindo o composto **2** e álcool desidrogenases (ADH) produzindo o respectivo composto **3** foram observadas no decorrer da reação. Para a cicloexenona **1**, só foi possível observar atividade enzimática da *Baeyer-Villiger monoxigenase* (BVMO) em baixa concentração do substrato (entrada 1) ou quando a quantidade de biomassa foi triplicada (entrada 4).

Neste último, a concentração de células do *G. candidum* no meio foi aumentada para 3 g (entrada 4), e observou-se que a atividade da BVMO foi significativamente predominante, em que o substrato **1** foi completamente convertido no produto  $\epsilon$ -CL (**4**).

Foi escolhido, arbitrariamente nestes primeiros testes, o tempo de 24 horas de reação para estimar a conversão do produto **4**. Embora a proporção biomassa/substrato nas entradas e 1 e 4 sejam bem próximas, observamos que o volume da reação é o mesmo para os dois sistemas e, portanto a atividade BVMO é mais ativa na reação mais concentrada (Entrada 4)

Para melhor entender o processo catalítico da reação em cascata e estimar a concentração dos intermediários em função do tempo de biotransformação, determinou-se o curso do tempo de reação, usando a entrada **4**, mas com um tempo reacional de seis horas, em que alíquotas foram extraídas de uma em uma hora e analisadas por cromatografia gasosa (**Figura 19**).

**Figura 19** - Curso do tempo de reação de biotransformação de cicloexenona. Condições: 3 g *G. candidum*, 10  $\mu$ L de substrato, 10 mL of pH 6.5 tampão fosfato, 6h de reação, agitação em 180 rpm. A **conversão (%) dos intermediários e produtos**

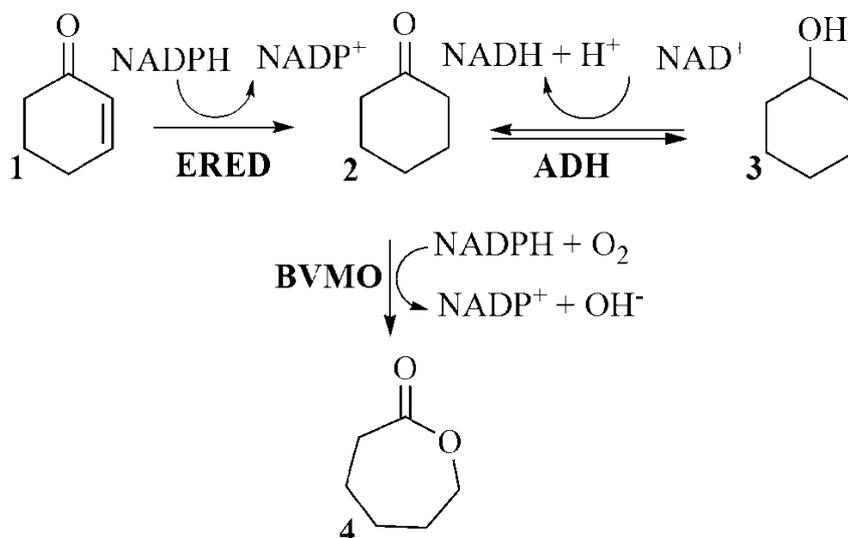


Como mostra a **Figura 19**, a ligação endocíclica C=C da enona foi reduzida pela enzima ERED, enquanto a redução da ligação C=O pode ser atribuída à atividade da enzima ADH. Após duas horas de reação o substrato **1** foi completamente consumido, enquanto a concentração de  $\epsilon$ -CL (**4**) aumenta

devido à oxidação subsequente dos intermediários **2** e **3**, mediante ação das enzimas ADH e BVMO, respectivamente.

Ao longo da reação, a concentração do produto **4** aumentou a medida que a concentração dos produtos **2** e **3** diminuíram, e após cinco horas de reação somente o produto **4** foi obtido com rendimento quantitativo. Esse perfil cinético mostra que a conversão do substrato **1** ao produto **4** é extremamente rápida na biotransformação com as células do *G. candidum*, requerendo apenas cinco horas do tempo reacional. O **Esquema 13** ilustra as reações ocorridas acima.

**Esquema 13** - Redução e oxidação microbiológica de ciclohexenona (**1**). O produto da oxidação de Baeyer-Villiger é a  $\epsilon$ -caprolactona ( $\epsilon$ -CL).



Os resultados encontrados neste trabalho corroboram os resultados obtidos por Carballeira et al. [26], os quais mostraram que a produção de  $\epsilon$ -caprolactona envolve um equilíbrio entre os intermediários **2** e **3**. O rendimento obtido aqui usando biotransformação em cascata one-pot foram maiores do que os que foram obtidos por Mihovilovic et al. [88], que obteve somente 52% de  $\epsilon$ -CL m 48 horas de reação usando BVMO expressa em *E. Coli*.

### 3.3.2 Biotransformação da ciclohexanona

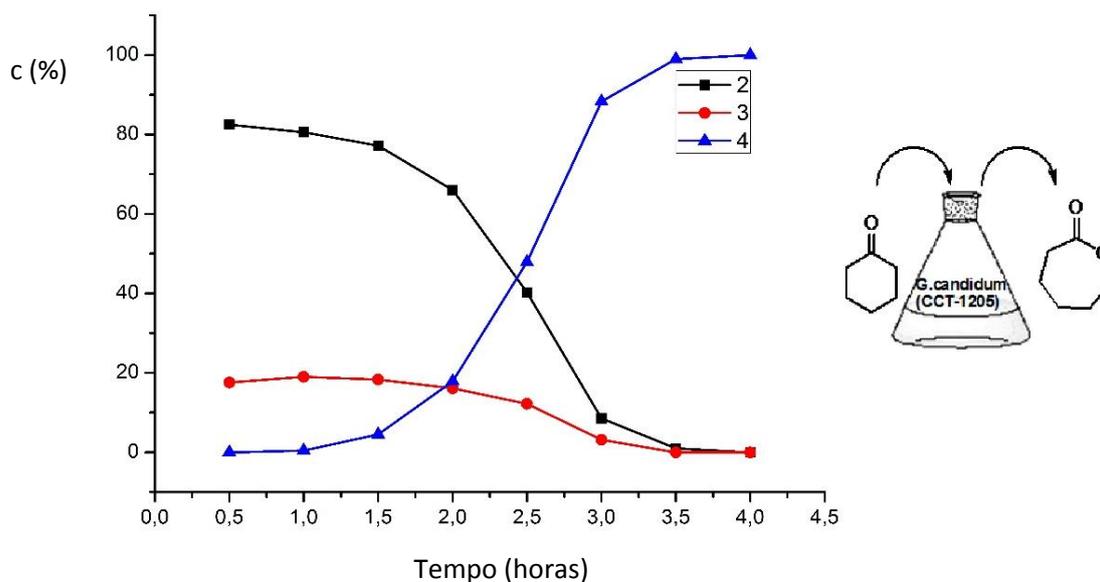
Para melhor entender o equilíbrio entre os intermediários ciclohexanona e cicloexanol (**2** e **3**) durante a conversão da  $\epsilon$ -CL, estudou-se a

biotransformação dos substratos **2** e **3** com as células de *G. candidum*. Inicialmente, as melhores condições para a conversão de **2** a **4** foram investigadas.

Observou-se que a biotransformação nos produtos **2** a **4** ocorre de modo extremamente rápido, em que apenas 1g de células úmidas de *G. candidum* e 10  $\mu$ L da ciclohexanona em meio aquoso conduziram a formação completa de  $\epsilon$ -CL, em apenas 4 horas de reação.

Os resultados obtidos com a ciclohexanona foram mais eficientes do que os reportados por Carballeira et al. [26], que obtiveram  $\epsilon$ -CL (**4**) a partir da ciclohexanona com rendimento quantitativo em 72 horas de reação, usando uma cepa de *G. candidum* NCYC49 imobilizada em várias matrizes. A **Figura 20** mostra o curso reacional da biotransformação da ciclohexanona com as células de *G. candidum*.

**Figura 20** - Curso do tempo de reação da biotransformação da ciclohexanona. Condições: 1 g da biomassa de células inteiras, 10  $\mu$ L do substrato, 10 mL de Tampão fosfato pH 6,5, 4 horas de reação e agitação em 180 rpm. Conversão dos intermediários e produtos foi monitorada por cromatografia gasosa (ver apêndice B).

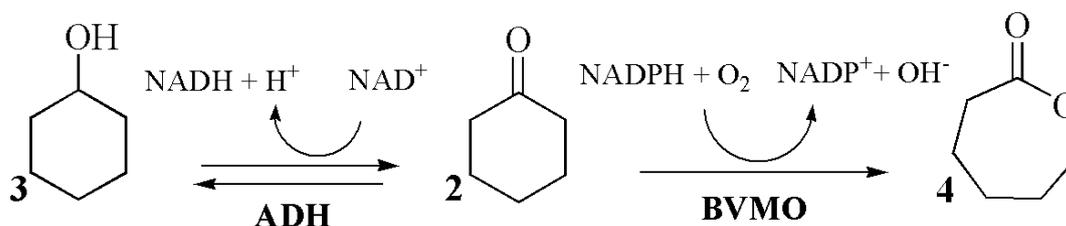


Como pode ser visto na **Figura 20**, o intermediário **3** é obtido já com 30 min de reação, como resultado da atividade da enzima ADH, e somente após uma hora observou-se a formação do produto **4** ( $\epsilon$ -CL) que foi devido à

atividade da BVMO. Analogamente ao que foi obtido por Carballeira et al. [26], nós observamos um processo reversível entre o substrato **2** e o intermediário **3** durante as primeiras quatro horas da reação de biotransformação.

A reação de oxidação ocorre simultaneamente via atividade enzimática de ADH e BVMO. Nesse processo,  $\epsilon$ -caprolactona (**4**) foi rapidamente convertida com rendimento quantitativo em apenas quatro horas. O **Esquema 14** mostra a reversibilidade da conversão do substrato **2** e a evolução da biotransformação para formação do produto **4**.

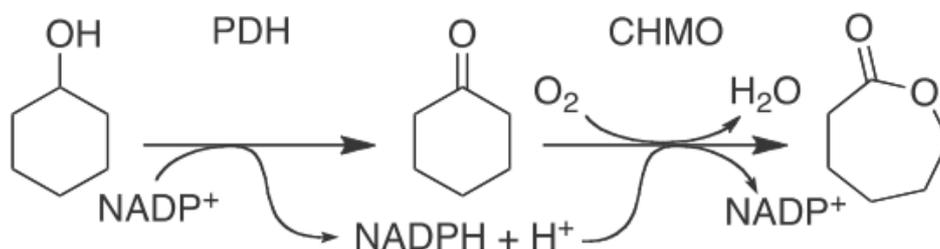
**Esquema 14** - Redução da ciclohexanona (**2**) e oxidação microbiniana. O produto da oxidação de Baeyer – Villiger é a  $\epsilon$ -caprolactona.



### 3.3.3 Biotransformação de cicloexanol

Industrialmente,  $\epsilon$ -caprolactona é obtida via oxidação da ciclohexanona, entretanto, estudos recentes têm demonstrado que  $\epsilon$ -CL pode ser produzida através da bio-oxidação de cicloexanol. Por exemplo, no intuito de estabelecer uma nova rota biocatalítica de produção one-pot de  $\epsilon$ -caprolactona, Malin et al. [27] estudaram a biotransformação B-V de cicloexanol a caprolactona usando a combinação de duas enzimas com regeneração interna do cofator NADPH, a desidrogenase de polioliol (PDH) e a monooxigenase de cicloexanona (CHMO), ambas em suas formas livres ou co-imobilizadas em suporte ativado com glutaraldeído (Relizyme TM HA403) (**Esquema 15**):

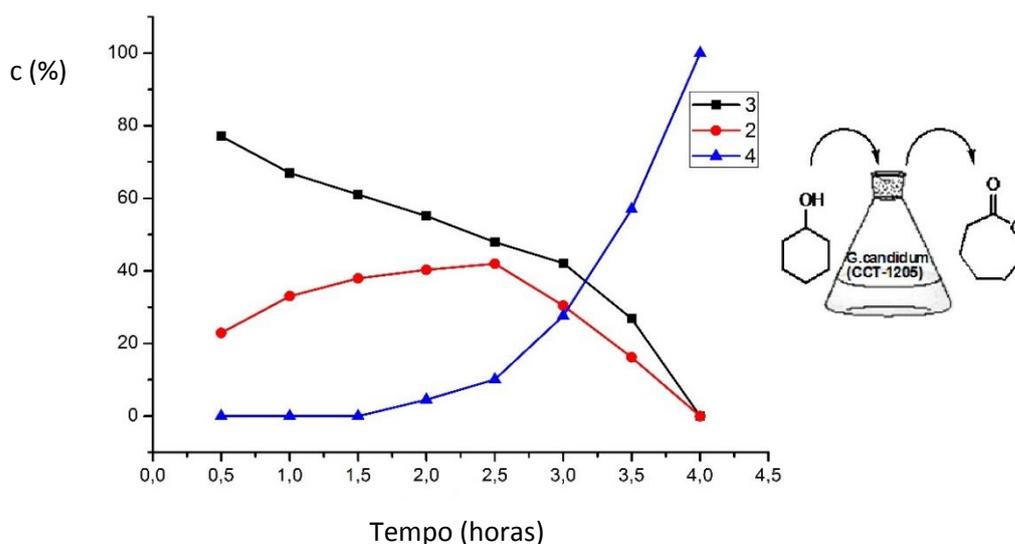
**Esquema 15** - Biotransformações de Baeyer-Villiger one-pot com cicloexanol [72].



Os resultados obtidos pelos autores [27] mostraram que o cicloexanol pode ser convertido a  $\epsilon$ -caprolactona com 83% de conversão, quando foram usadas enzimas livres e 34% quando utilizaram os biocatalisadores co-imobilizados.

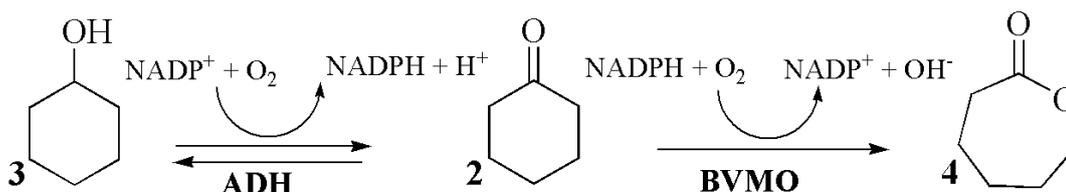
Nessa direção, resolvemos ensaiar reações de biotransformação com células íntegras de *G. candidum* usando o cicloexanol como substrato. A reação foi monitorada por cromatografia gasosa e alíquotas foram removidas e analisadas em cada meia hora. A biotransformação do cicloexanol a  $\epsilon$ -CL também se mostrou significativamente rápida (**Figura 21**).

**Figura 21** - Curso do tempo de reação da biotransformação do cicloexanol. Condições: 1 g da biomassa de células inteiras, 10  $\mu$ L do substrato, 10 mL de tampão fosfato pH 6,5, 4 horas de reação e agitação em 180 rpm. Conversão dos intermediários e produtos foi monitorada por cromatografia gasosa.



Conforme se observa na **Figura 21**, a atividade redutora da enzima ADH ocorre rapidamente, formando o intermediário **2**. A conversão do intermediário **2** é lenta e um processo reversível ocorre entre o substrato **3** e o intermediário **2**. Depois de duas horas, uma segunda oxidação ocorre, mas agora é uma oxidação de Baeyer-Villiger devido à atividade da enzima BVMO, que resultou no produto  $\epsilon$ -caprolactona com rendimento quantitativo em quatro horas. Com efeito, duas reações de oxidação são realizadas em um processo “one pot”. (**Esquema 16**).

**Esquema 16** - Oxidação microbiana do cicloexanol (3). O produto da oxidação de Baeyer–Villiger é  $\epsilon$ -caprolactona.



Devido à rápida conversão na biotransformação dos três substratos em  $\epsilon$ -CL (4), buscou-se avaliar a capacidade de reciclagem e reuso das células íntegras de *G. candidum* (CCT 1205) em reações com o substrato cicloexanona (2). Procedimentos de lavagens das células com tampão de reação foram utilizados antes de cada ensaio. Após seis ciclos de reuso, conversões completas a  $\epsilon$ -CL (4) foram obtidas nos quatro primeiros ciclos, 96% de conversão no quinto e 88% no sexto.

Esses resultados demonstram que há potencial de reciclagem e reuso das células íntegras do *G. candidum*, porém foi observado que a atividade enzimática da BVMO entra em declínio após o quinto ciclo de reuso. Esse fato pode estar associado, principalmente, a perda natural de atividade enzimática nas células vivas.

Contudo, o potencial de reuso demonstrado pelas células vivas na biotransformação da cicloexanona nos permitiu a seguinte indagação: A imobilização das células de *G. candidum* em um suporte possibilitaria maior estabilidade enzimática? Isto é, seria viável, do ponto de vista da reutilização das células íntegras, uma imobilização física e/ou química em um suporte mecânica e quimicamente estável?

Baseando-se nestas indagações, considerou-se estudar a imobilização das células íntegras do *G. candidum* aplicadas em reações Baeyer-Villiger.

### 3.4 Biotransformação via Baeyer-Villiger com células de *G. candidum* imobilizadas

Os suportes utilizados para a imobilização das células de *G. candidum* foram  $\text{SiO}_2$  e suas formas funcionalizadas  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-SH}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  e  $\text{SiO}_2\text{-N-Glut}$ . A escolha destes materiais como suporte foi baseada nas características

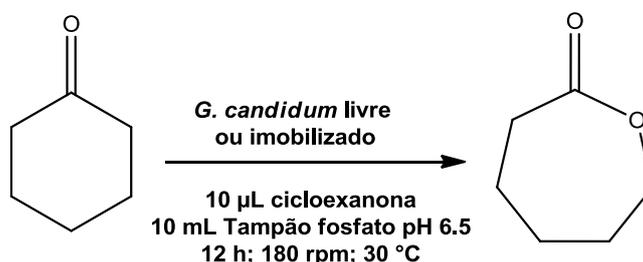
físico-químicas de suas superfícies que podem permitir interações por adsorção física e/ou química com a parede celular das células íntegras do *G. candidum*.

Um aspecto importante a ser considerado na etapa de imobilização é que as interações entre as superfícies das sílicas e as células poderiam exibir algum nível de toxicidade às células e comprometer seu metabolismo durante a biotransformação.

Os primeiros ensaios de imobilização celular foram realizados com os suportes  $\text{SiO}_2$  e  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$ , visando estabelecer as condições reacionais adequadas para a reação de biotransformação com células imobilizadas. Após a etapa de centrifugação das células de *G. candidum*, os micélios ainda úmidos foram suspensos em 20 mL de tampão fosfato pH 6.5 contendo 1 g do suporte e a mistura foi agitada em shaker por 12 horas. O material resultante, depois de filtrado, foi submetido diretamente em reações de biotransformação.

Para tanto, avaliou-se a influência da quantidade de biomassa celular imobilizada do *G. candidum* e comparou-se com as células livres na reação de biotransformação em um tempo de contato fixado em 12 horas. O sistema reacional foi monitorado por cromatografia gasosa. Os dados obtidos estão apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** - Variação da biomassa celular livre ou imobilizada na conversão da caprolactona (ver apêndice B8-B13).



Entrada	Biomassa (g)	G. c. livre <sup>a</sup>	Sil-pura-Gc <sup>b</sup>	Sil-Cl-Gc <sup>c</sup>
		% (caprolactona)		
1	0,5	20,9	84,6	nd
2	1,0	100	100	100
3	2,0	100	100	100
4	3,0	49,8	100	100

<sup>a</sup>Células do *Geotrichum candidum* livres. <sup>b</sup>Células imobilizadas em sílica gel. <sup>c</sup>Células imobilizadas em sílica cloropropil; nd = não detectado.

Usando a cicloexanona como substrato (10  $\mu$ L), os resultados mostram que a conversão a  $\epsilon$ -caprolactona se completou quando a biomassa celular foi de 1 grama e 2 gramas na mistura de reação para as células do *G. candidum* imobilizadas tanto com sílica gel pura quanto com ela funcionalizada com cloropropil (Entrada **2** e **3**). Contudo, para as células livres observou-se uma conversão mais baixa quando se empregou três gramas de biomassa celular (entrada **4**), possivelmente devido a uma atividade mais lenta da BVMO nessas condições, ocasionada pela disputa com as enzimas ADHs em altas concentrações.

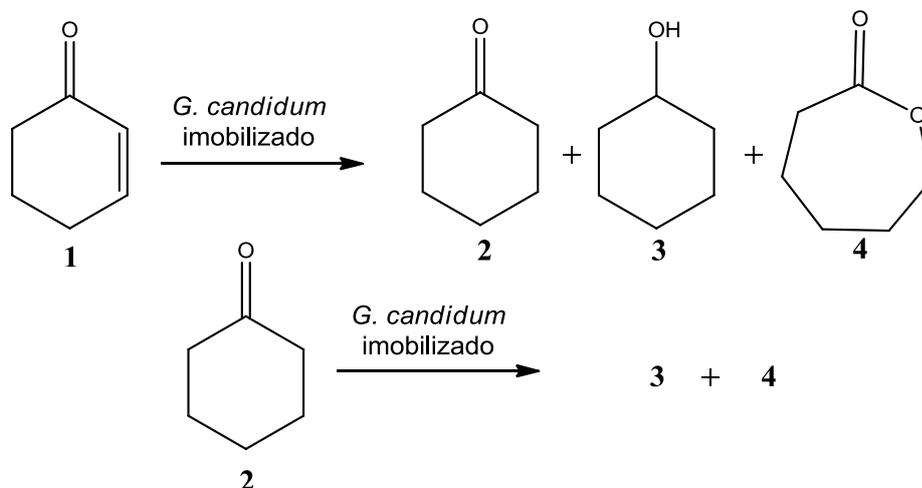
A partir desses resultados, novos ensaios foram realizados para avaliar o perfil reacional dos substratos cicloexenona e cicloexanona via biotransformação com as células imobilizadas no suporte SiO<sub>2</sub>-Cl, em que foram observados o período de conversão completa a caprolactona e a formação de possíveis intermediários na reação.

A escolha pelo suporte SiO<sub>2</sub>-Cl foi baseada na sua química de superfície, uma vez que a presença do grupo cloropropil ancorado na sílica pode conferir interações mais fortes entre a superfície das células e a superfície do suporte, já que na sílica pura apenas interações físicas fracas devem ocorrer entre sua superfície hidrofílica e as células do microrganismo.

Durante o curso reacional, em intervalos de tempo pré-determinados, foram retiradas alíquotas da mistura de reação, que foram submetidas à análise em cromatografia gasosa.

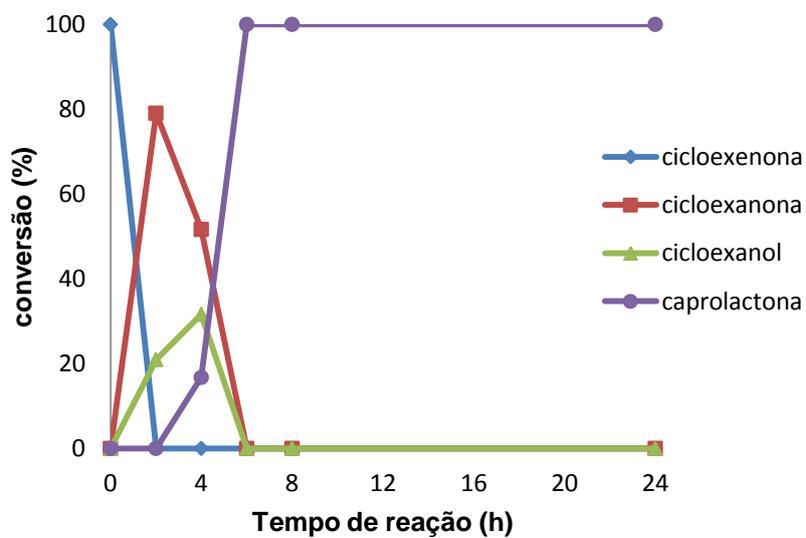
A reação de biotransformação com as células imobilizadas (**Esquema 17**) mostrou que no perfil de reação para o substrato **1** (**Figura 22**) ou **2** (**Figura 23**) houve conversão completa a caprolactona com a presença de intermediários no curso reacional, igualmente ao demonstrado para a biotransformação com as células livres.

**Esquema 17** - Biotransformação de cicloexenona 1 e cicloexanona 2 com uso de células de *G. candidum* imobilizadas no suporte SiO<sub>2</sub>-Cl. Condições: 10 µL de 1 ou 2; 10 mL de tampão fosfato (pH 6,5); 2-24 horas de reação; 28 °C; 150 rpm de agitação.

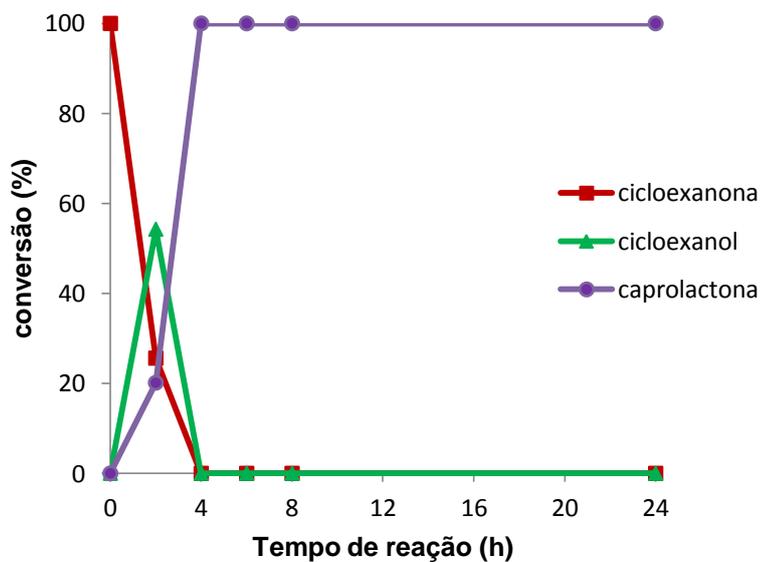


Ao comparar o perfil do composto **1** (Figura 22) e **2** (Figura 23), foi observado que a conversão completa ocorre mais rapidamente para o composto **2**, nas condições reacionais estudadas, em apenas 4 horas de reação. Esses resultados foram compatíveis com os perfis reacionais obtidos para as células livres, o que demonstra claramente que a presença do suporte no meio reacional não é tóxica ao microrganismo. Isso permite inferir que o *G. candidum* apresenta potencial para desempenhar atividade biocatalítica quando imobilizado.

**Figura 22** - Perfil reacional de reação da cicloexenona via células de *G. candidum* imobilizadas no suporte SiO<sub>2</sub>-Cl.



**Figura 23** - Perfil reacional de reação da cicloexanona via células de *G. candidum* imobilizadas no suporte SiO<sub>2</sub>-Cl.



Após a análise do perfil reacional da biotransformação dos compostos **1** e **2**, a cicloexanona foi escolhida como substrato para estudos do efeito do tempo de contato, viabilidade celular em diferentes concentrações do substrato e reciclagem das células imobilizadas.

#### **3.4.1 Performance catalítica das células imobilizadas: Efeito do tempo de contato**

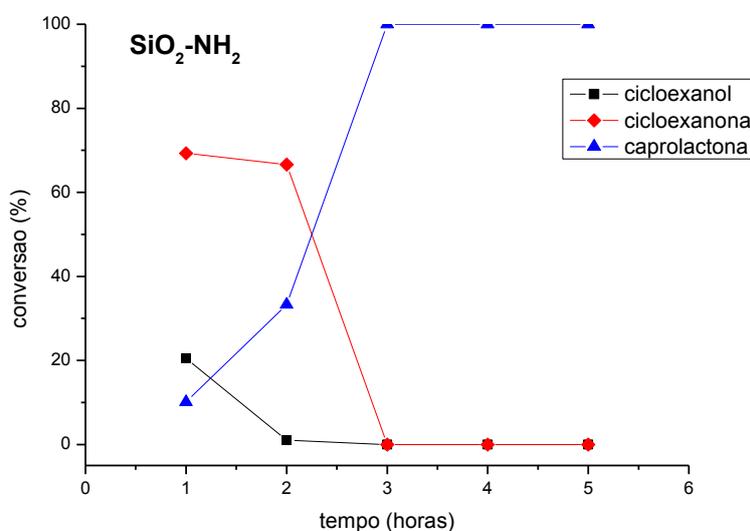
O estudo realizado com o *G. candidum* imobilizado no suporte SiO<sub>2</sub>-Cl permitiu aferir a viabilidade do uso de um material estranho ao metabolismo celular durante o processo químico em que atuam diferentes tipos de enzimas presentes nas células do microrganismo. Foi possível constatar que uma superfície de sílica funcionalizada com grupos alcoxissilano mostrou-se eficiente como suporte para o microrganismo estudado, pois os resultados obtidos demonstraram claramente que a presença do suporte não alterou a quimiosseletividade observada no processo com as células livres, o que mostra baixa ou nenhuma inibição das enzimas frente ao suporte, considerando as condições empregadas no estudo.

Esses resultados serviram de inspiração para ampliar o espectro de funcionalidade desejável no suporte e explorar o efeito da química de superfície do suporte no processo de biotransformação com as células imobilizadas.

Um estudo do efeito do tempo de contato na reação de conversão da cicloexanona foi realizado com o *G. candidum* imobilizado nas superfícies de sílicas com diferentes funcionalidades, apresentadas nos sólidos SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>-N-Glut e SiO<sub>2</sub>-SH. As reações foram acompanhadas por cromatografia gasosa (CG-FID).

A **Figura 24** mostra a biotransformação da cicloexanona com *G. candidum* imobilizado em SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

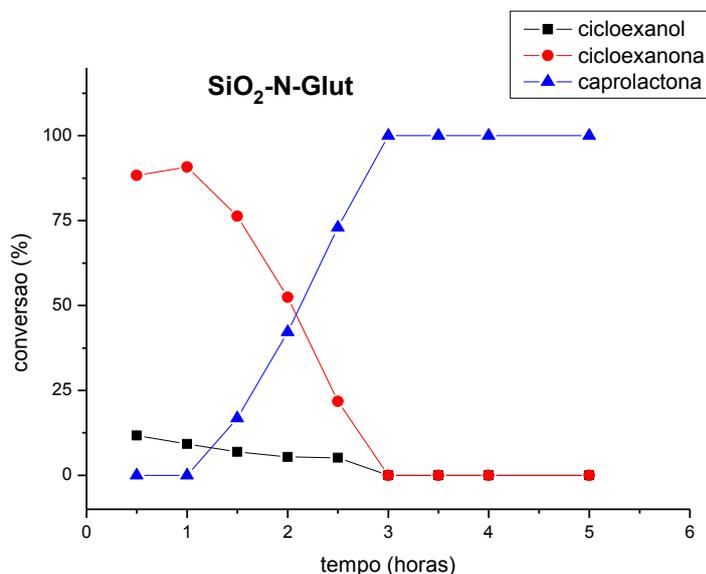
**Figura 24** - Biotransformação da cicloexanona com *G. candidum* imobilizado em SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>. Condições: 1,0 g células imobilizadas, 10 mL de tampão fosfato pH 6,5, 10 µL de cicloexanona, 180 rpm em shaker, 5 horas.



A reação progride para conversão completa em apenas 3 horas de reação. Assim como nas reações anteriores com as células livres e imobilizadas no suporte SiO<sub>2</sub>-Cl, não foi observado quimiosseletividade no processo reacional. Contudo, as células imobilizadas no suporte SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> demonstraram maior rapidez de conversão a caprolactona do que nos casos anteriores. Quando a reação atinge 2 horas, mais de 30% de conversão ao produto caprolactona foi observada e não houve mais formação de cicloexanol.

O suporte modificado com glutaraldeído foi utilizado para imobilizar as células de *G. candidum* e o efeito do tempo de contato na conversão de cicloexanona é mostrado na **Figura 25**:

**Figura 25** - Biotransformação da ciclohexanona com *G. candidum* imobilizado em SiO<sub>2</sub>-N-Glut. Condições: 1,0 g células imobilizadas, 10 mL de tampão fosfato pH 6,5, 10 µL de ciclohexanona, 180 rpm em shaker, 5 horas.



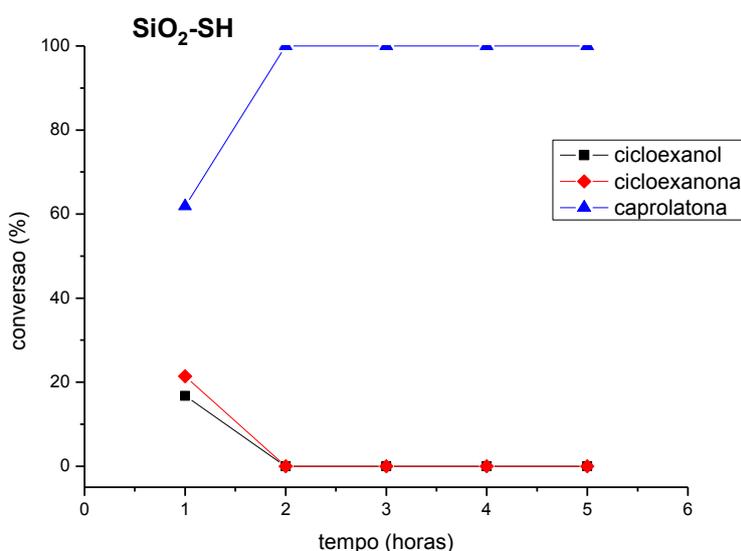
Como pode ser visto na **Figura 25**, a conversão da ciclohexanona é muito rápida, em apenas 2 horas de reação quase 50 % da ciclohexanona é convertida em cicloexanol e caprolactona, sendo o último o produto majoritário 42%. A reação progride para conversão completa em 3 horas de reação. Neste sistema também não foi observada quimiosseletividade no processo reacional.

A presença de um grupo funcional reativo no suporte pode ser capaz de promover ligações químicas efetivas com a parede celular das células que são revestidas por quitina e glicoproteínas. A quitina é um polissacarídeo natural que ocorre em vários organismos e constitui o principal componente da parede celular de fungos filamentosos. O *G. candidum* é um fungo filamentoso, e devido à presença de vários grupos funcionais na parede celular dos micélios do fungo podem ocorrer reações químicas diretamente com os grupos reativos do suporte. Isso pode explicar a possibilidade de barreiras difusionais que restringem a mobilidade celular, o que poderia afetar a atividade de algumas enzimas. Neste caso, sugere-se que a atividade das enzimas álcool desidrogenases foi afetada, uma vez que a concentração do cicloexanol no meio de reação foi muito baixa (5%) em duas horas de reação comparada com

as células imobilizadas no suporte  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  que mostrou mais de 55% no mesmo tempo de contato com o substrato ciclohexanona.

A sílica funcionalizada com 3-mercaptopropiltrimetoxissilano ( $\text{SiO}_2\text{-SH}$ ) foi utilizada para imobilizar as células de *G. candidum* e o efeito do tempo de contato na conversão de ciclohexanona também foi avaliado e é mostrado na **Figura 26**:

**Figura 26** - Biotransformação da ciclohexanona com *G. candidum* imobilizado em  $\text{SiO}_2\text{-SH}$ . Condições: 1,0 g células imobilizadas, 10 mL de tampão fosfato pH 6,5, 10  $\mu\text{L}$  de ciclohexanona, 180 rpm em shaker, 5 horas.



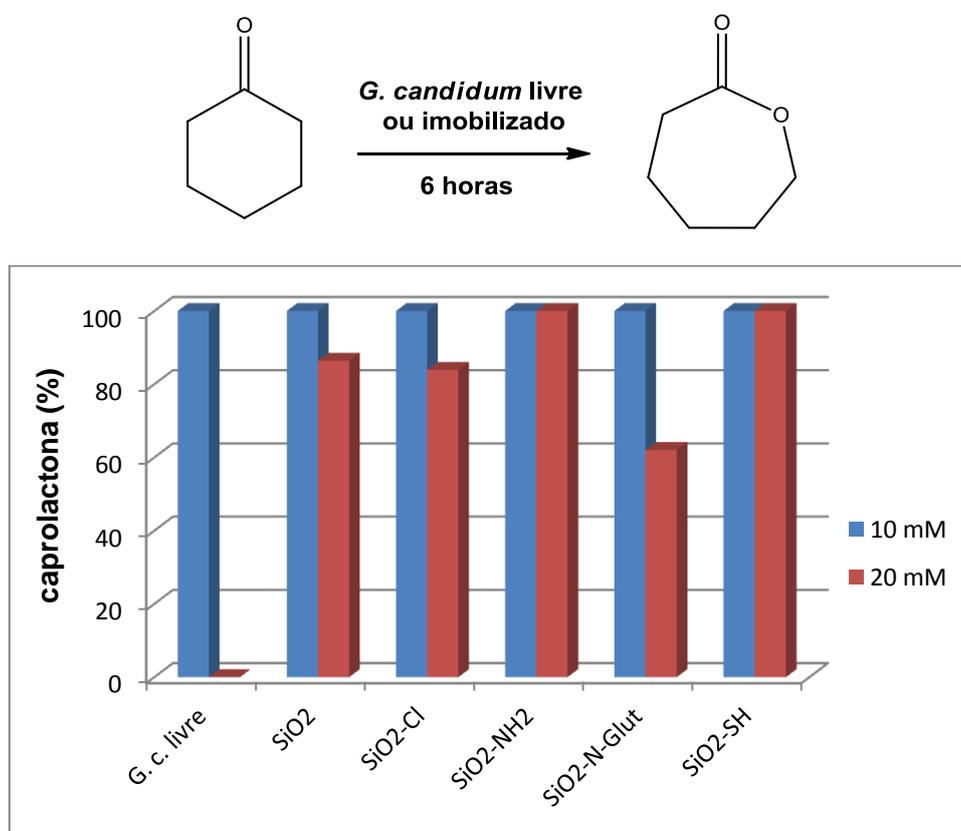
A biotransformação da ciclohexanona com as células imobilizadas no suporte  $\text{SiO}_2\text{-SH}$  (**Figura 26**) mostraram elevada atividade da monooxigenase de Baeyer-Villiger. Em apenas 1 hora de reação, cerca de 60% de conversão ao produto caprolactona foi observada e reação se completa no período de 2 horas. Também foi observado que a quimiosseletividade da reação não foi alterada porque o ciclohexanol também foi obtido durante a biotransformação. Entretanto, a rápida e elevada atividade da BVMO observada neste processo evidencia uma tendência de inibição das enzimas ADHs, ocasionada possivelmente por restrições difusionais impostas pelo suporte ou por interações desfavoráveis entre o suporte e as enzimas álcool desidrogenases.

### 3.4.2 Performance catalítica das células imobilizadas: Efeito da concentração do substrato

Inicialmente, a performance dos biocatalisadores foi avaliada quanto ao efeito da concentração da ciclohexanona durante as biotransformações com as células do *G. candidum* livres e imobilizadas em diferentes suportes.

Devido à conhecida toxicidade da ciclohexanona às células o *G. candidum* [26], nesse estudo optamos por trabalhar com o substrato em duas concentrações: 10 mM e 20 mM. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo as reações acompanhadas por cromatografia gasosa e os resultados representam a média de três experimentos, expressos em porcentagem de conversão à caprolactona (**Figura 27**).

**Figura 27** - Efeito da concentração na performance dos biocatalisadores na reação de biotransformação da ciclohexanona após 6 horas de reação. Experimentos realizados em triplicata).

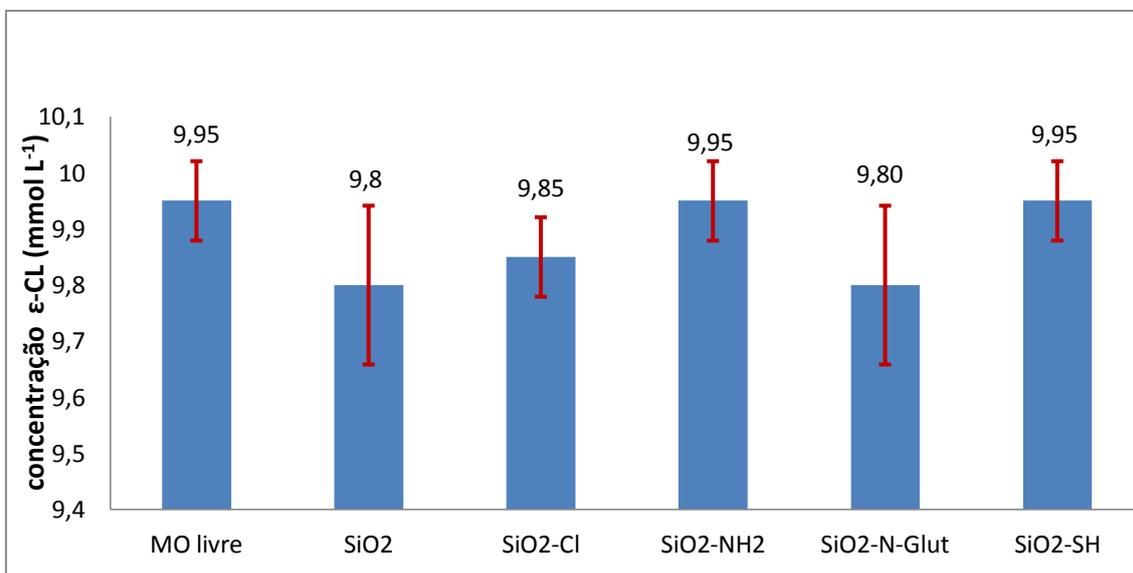


Conversão de 100% ao produto caprolactona empregando tanto as células livres como as células imobilizadas foi obtida, quando a concentração do substrato foi 10 mM. Contudo, quando se realizou a biotransformação com

dobro da concentração da cicloexanona foi observado que somente as células imobilizadas converteram a cicloexanona ao produto desejado  $\epsilon$ -caprolactona, como mostra a **Figura 27**. Dentre os suportes utilizados neste estudo,  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  e  $\text{SiO}_2\text{-SH}$  apresentaram maior eficiência na conversão ao produto  $\epsilon$ -CL em maiores concentrações. Tais resultados mostram um possível efeito da capacidade protetora dos suportes quanto à toxicidade da cicloexanona às células íntegras.

O efeito da concentração do substrato (10 mM) na transformação da cicloexanona em caprolactona foi acompanhado para determinação quantitativa da caprolactona através de uma curva de calibração interna obtida por cromatografia gasosa (GC-FID), em que foi usado o decano como padrão interno (ver Apêndice C).

**Figura 28** - Concentração da caprolactona obtida após 6 horas de reação biotransformação da cicloexanona. (Experimentos realizados em duplicata).



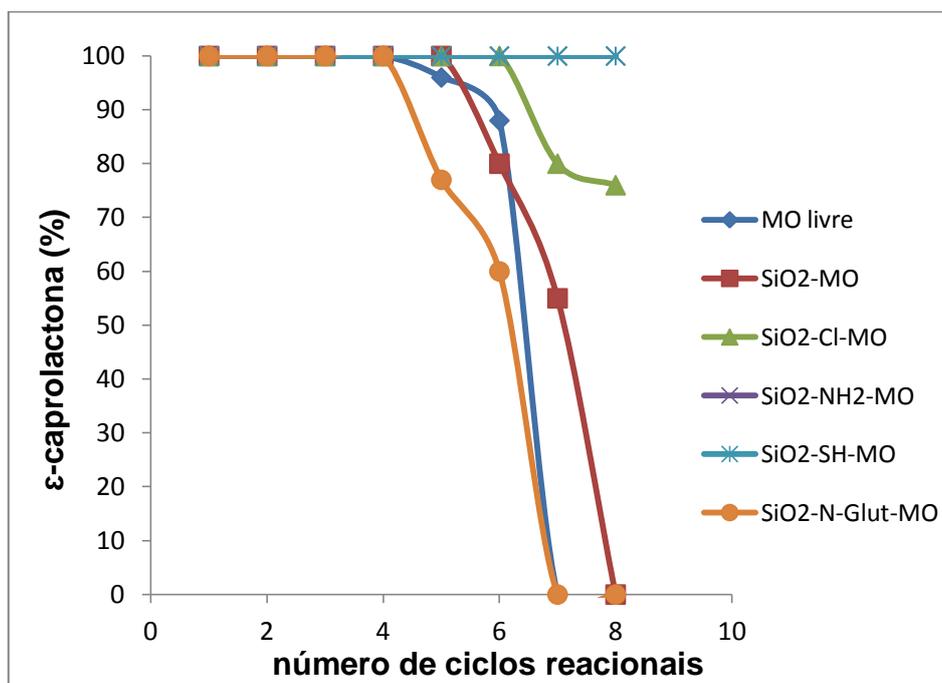
Como pode ser visto na **Figura 28**, praticamente toda cicloexanona oferecida no meio de reação (10 mmol L<sup>-1</sup>) é convertida em caprolactona quando se utiliza tanto as células de *G. candidum livre* como imobilizadas. Os valores médios obtidos em todos os sistemas com células imobilizadas utilizadas na transformação da cicloexanona por reação de Baeyer-Villiger sustentam a afinidade das células de *G. candidum* para as sílicas funcionalizadas. Quando imobilizadas, as células mostraram eficiência

catalítica completamente compatível com sua forma livre. Com efeito, estes resultados evidenciam que a presença de interações entre o suporte e as células não estabeleceram restrições difusionais importantes nem ao substrato nem ao produto desejado.

### 3.4.3 Performance catalítica das células imobilizadas: Efeito da reciclagem das células

Um dos aspectos mais vantajosos quando se utiliza a estratégia de imobilização de biocatalisador é a possibilidade de fácil recuperação e reuso do sistema biocatalítico em novos ciclos reacionais. Para a maioria dos biocatalisadores na sua forma livre, a reciclagem pode ser muito difícil e a recuperação da atividade catalítica torna-se impraticável. No caso das células livres de *G. candidum* nós avaliamos a possibilidade de reciclagem e reuso das células intactas e imobilizadas através de simples processo filtração, seguido por imediata aplicação em reação transformação da ciclohexanona em concentração 10 mM. A reação foi monitorada por cromatografia gasosa (GC-FID, coluna capilar RTx-5) e os resultados são mostrados na **Figura 29**.

**Figura 29** - Efeito da reciclagem das células na forma livre e imobilizada na transformação de ciclohexanona após 6 horas de reação. (Os valores em porcentagem representam uma média experimental).



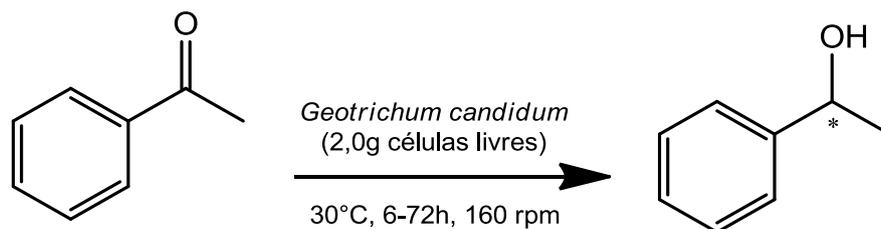
Conforme pode ser observado na **Figura 29**, somente durante os quatro primeiros ciclos de reação com as células livres (MO livre) houve conversão completa ao produto  $\epsilon$ -caprolactona, embora atividade de BVMOs tenha sido mantida até o sexto ciclo com 88% de conversão. Contudo, nenhuma atividade da monooxigenase de Baeyer-Villiger foi observada após reuso no sétimo e oitavo ciclo de reação. Esse resultado sugere fortemente a perda de estabilidade celular quando o microrganismo é submetido a uma condição de stress mecânico e químico devido à pela reutilização em novas reações.

Por outro lado, para as células imobilizadas podemos observar maior atividade da monooxigenase de Baeyer-Villiger, sendo que o microrganismo imobilizado na sílica ativada com glutaraldeído ( $\text{SiO}_2\text{-N-Glut-MO}$ ) apresentou menor performance catalítica, sendo ativo até o sexto ciclo reacional, enquanto a biotransformação da cicloexanona com os biocatalisadores  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-MO}$  e  $\text{SiO}_2\text{-SH-MO}$  ocorreu com 100% de conversão até o oitavo ciclo de reuso. Esses resultados sugerem que o suporte ativado com grupamentos químicos capazes de estabelecer ligações mais efetivas com as células do *G. candidum* pode desestabilizar o metabolismo das células, o que causaria a inibição ou mesmo a desativação das enzimas que catalisam a reação de Baeyer-Villiger.

### 3.5 Biotransformação de acetofenona

A biotransformação de acetofenona foi realizada com suspensão de células livres em meio aquoso a fim de observar o efeito do tempo de contato dos biocatalisadores na redução do substrato. As células do *G. candidum* foram suspensas em tampão fosfato e colocadas em contato com o substrato (10 mM) e o sistema foi monitorado por um período de até 72 horas de reação (**Esquema 18**).

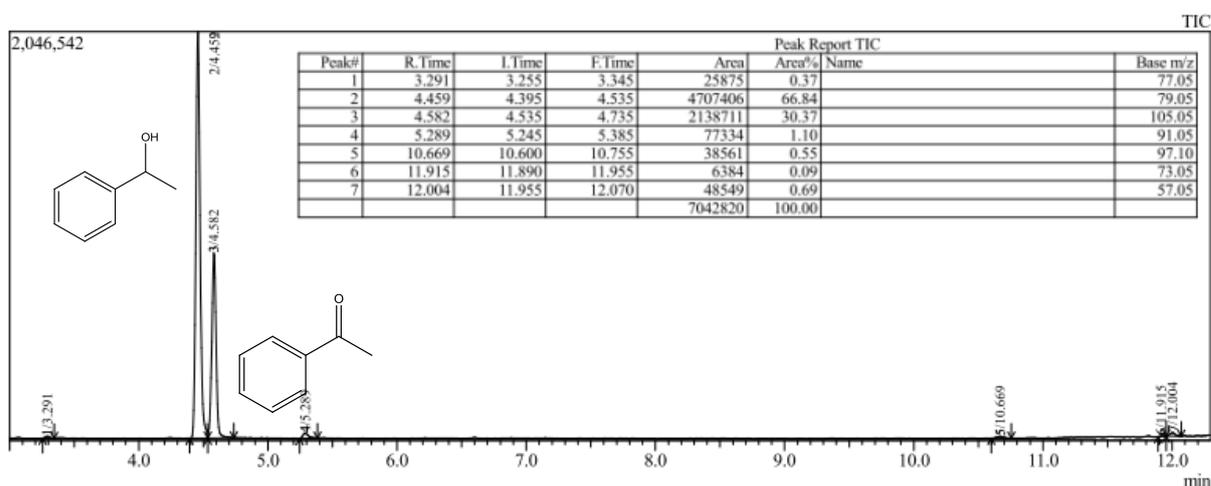
**Esquema 18 - Biotransformação da acetofenona com células de *G. candidum*.**



A biotransformação de acetofenona foi realizada, inicialmente, sem adição de glicose uma vez que as células úmidas do *G. candidum*, após o cultivo, podem conter traços de glicose necessária para reciclagem dos cofatores  $\text{NADP}^+ / \text{NAD(P)H}$  que auxiliam no processo de transferência de hidrogênio na reação de redução da cetona proquiral. Em tempos pré-determinados, alíquotas do meio reacional foram extraídas e analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

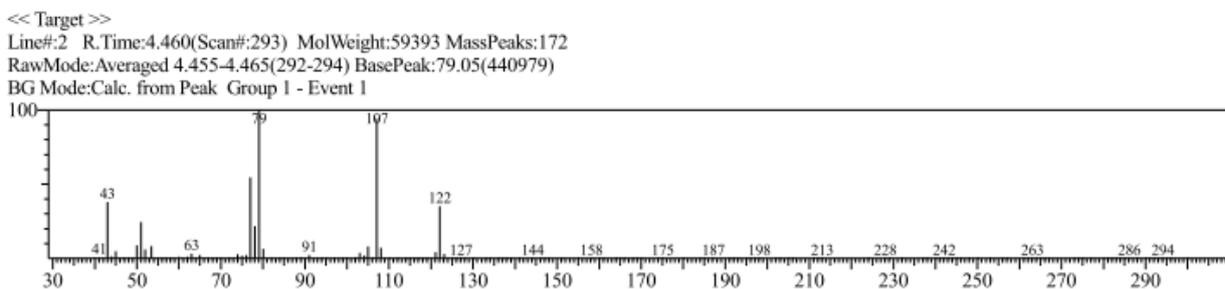
Os resultados mostraram que já nas primeiras 6 horas de reação (**Figura 30**) houve conversão ao produto esperado de redução 1-feniletanol (tempo de retenção = 4,46 min) com conversão de 67%. A redução da acetofenona pode ser atribuída à ação de enzimas álcool desidrogenases (ADHs) presentes nas células do *G. candidum*.

**Figura 30** - Cromatograma obtido por GC-MS de uma alíquota de 6 horas da bioedução de acetofenona com *G. candidum* sem adição de glicose.



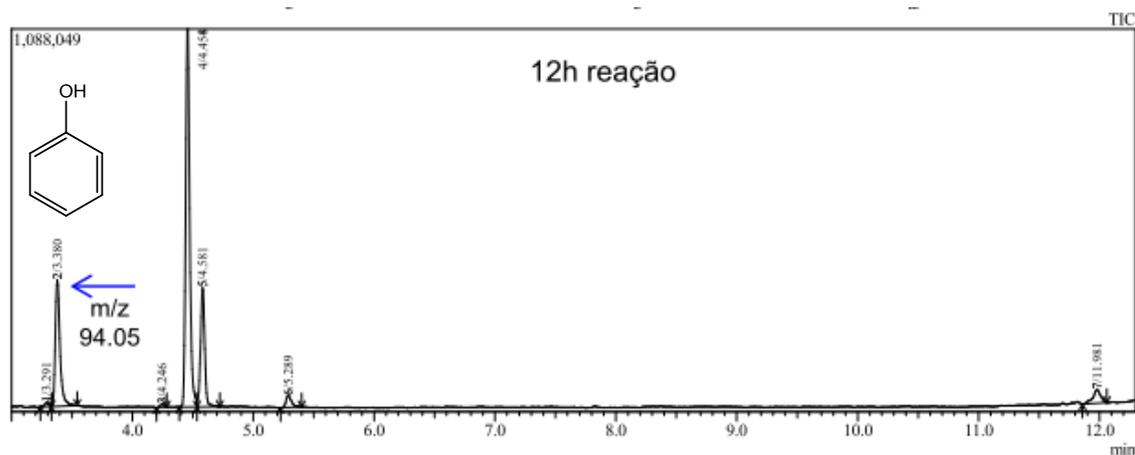
A presença do álcool foi confirmada pelo espectro de massa (**Figura 31**) que mostrou padrão de picos característicos para a molécula 1-feniletanol com razão massa/carga ( $m/z$ ) 122 ( $M^+$ ), 107 e 79.

**Figura 31** - Espectro de massa obtido de uma alíquota de 6 horas da bioedução de acetofenona com *G. candidum* sem adição de glicose.



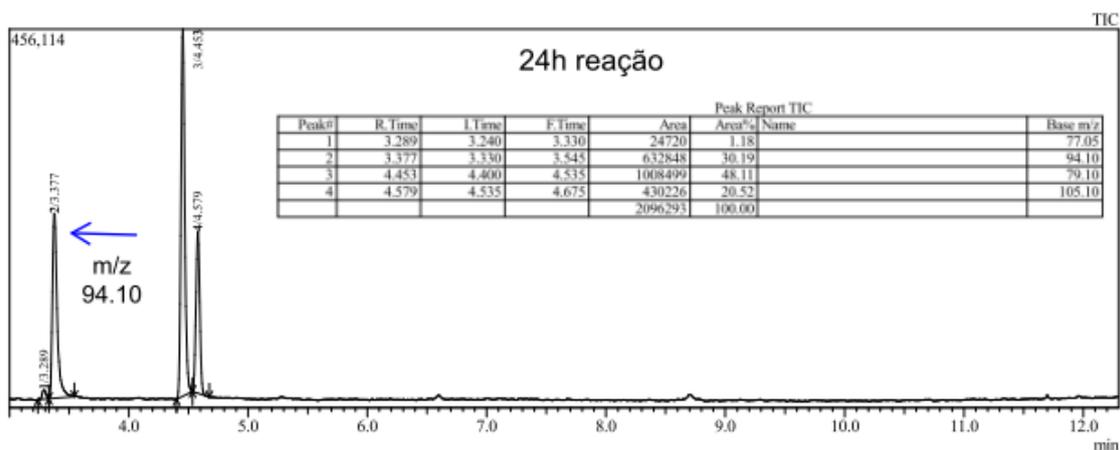
Ao acompanhar o curso reacional através da cromatografia gasosa, observa-se que pico da acetofenona (TR = 4,58 min) diminui gradualmente no decurso, porém além do álcool desejado com pico em tempo de retenção de 4,46 min, observamos o surgimento de um pico com tempo de retenção em 3,38 min após 12 horas de reação, como mostra a **Figura 32**:

**Figura 32** - Cromatograma obtido por CG-MS de uma alíquota de 12 horas da bioedução de acetofenona com *G. candidum* sem adição de glicose.

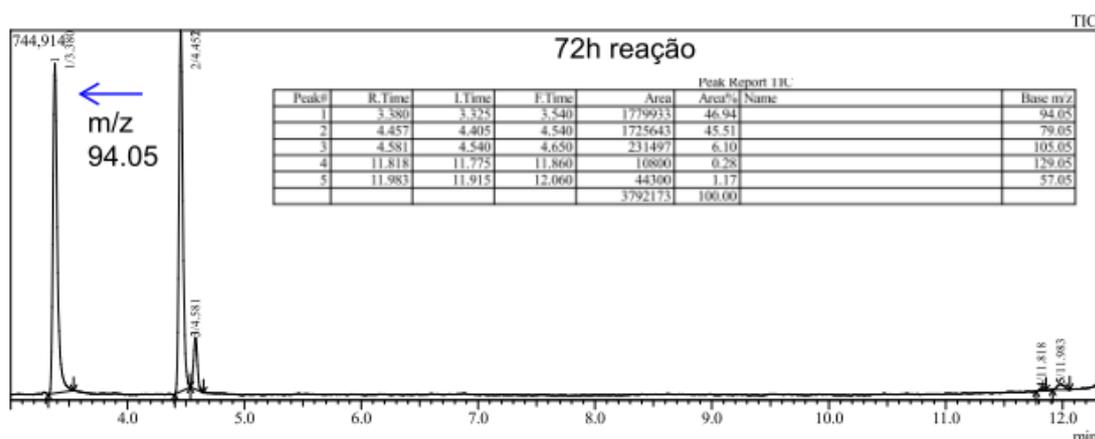


Esse pico com TR = 3,38 min, obtido da reação de redução sem adição de glicose, nos chamou a atenção, dado que durante o curso reacional, tal pico característico persistia e se intensificava, conforme se observa nos cromatogramas obtidos das alíquotas de 24 e 72 horas de reação (**Figuras 33 e 34**), respectivamente.

**Figura 33** - Cromatograma obtido por CG-MS de uma alíquota de 24 horas da bioredução de acetofenona com *G. candidum* sem adição de glicose.

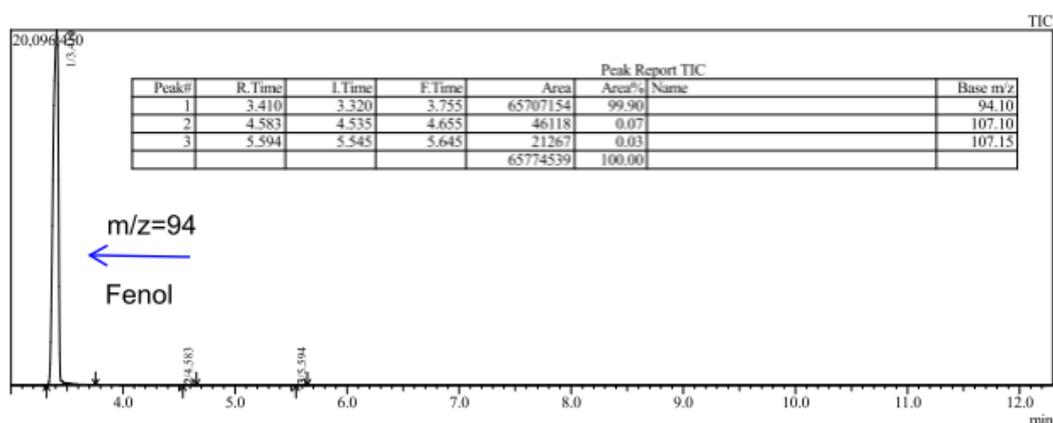


**Figura 34** - Cromatograma obtido por CG-MS de uma alíquota de 72 horas da bioredução de acetofenona com *G. candidum* sem adição de glicose.



Através da análise da espectrometria de massa, tendo como base a relação  $m/z = 94$  (pico base) juntamente com fragmentos característicos obtidos em  $m/z = 66$  e  $m/z = 65$ , foi possível identificar o novo composto como sendo o fenol. Além disso, o espectro de massa e o tempo de retenção do produto identificado como fenol foram comparados com os de uma amostra padrão de fenol (**Figura 35**).

**Figura 35** - Cromatograma obtido por análise em GC-MS de uma amostra padrão de fenol.



O pico com R.T. = 3,41min (m/z em 94) na amostra padrão do fenol confirma que um dos produtos obtidos na biotransformação da acetofenona no decurso reacional foi de fato o fenol. Esse resultado demonstra que a reação de biotransformação com as células de *G. candidum* pode ser consequência da ação de diferentes tipos de enzimas. Anteriormente demonstramos que células íntegras do *Geotrichum candidum* CCT 1205 foi capaz de promover uma rápida conversão de cetonas cíclicas no éster cíclico  $\epsilon$ -caprolactona. Essa reação ocorre via oxidação de Baeyer-Villiger devido à ação de enzimas oxidoreduzases do tipo Monooxigenase de Baeyer-Villiger (BVMO). Desse modo, a presença de enzimas ADHs e BVMOs nas células do *Geotrichum candidum* CCT 1205 pode proporcionar reações paralelas e competitivas com diferentes mecanismos, o que explicaria a formação do fenol que se iniciou rapidamente a partir de uma oxidação de Baeyer-Villiger, seguida da hidrólise do éster correspondente.

Não é incomum a formação de fenol como co-produto em reações microbianas de redução de acetofenona com células capazes de catalisar reações de Baeyer-Villiger. Por exemplo, Nakamura et al., conforme citado por Fugii et al. [89] encontraram quantidades traços de fenol (menor que 1%) na redução de acetofenona por *Dipodascus magnusii* NBRC 4600 e *Galactomyces reessii* NBRC 1112. Com base nesses resultados, Fugii et al. [89] estudaram o controle da quimiosseletividade da biotransformação de acetofenona com células de *D. magnusii* NBRC 4600, na presença de resina XAD-7, com o intuito de melhorar a oxidação de Baeyer-Villiger sobre a reação de redução.

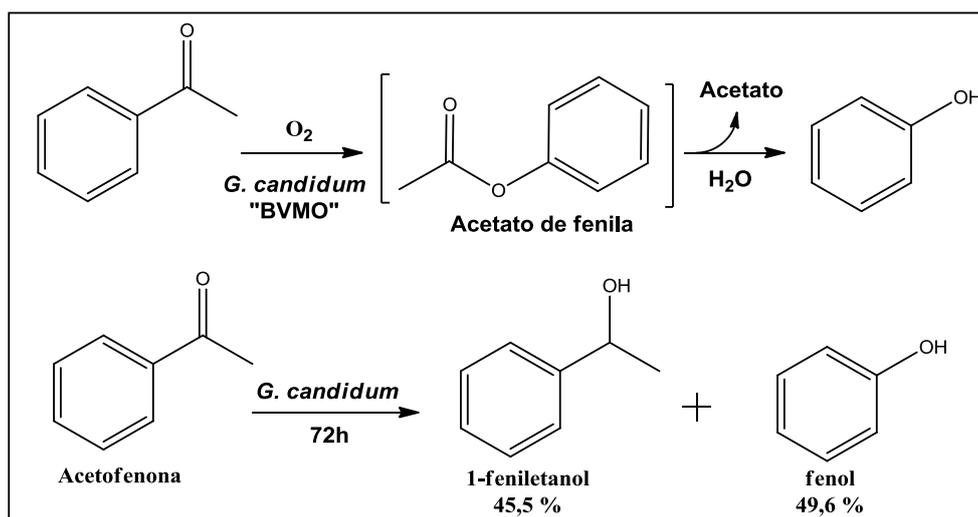
Nesse estudo os autores [89] mostraram que em condições otimizadas, da quantidade de resina XAD-7, foi obtido 42 % de fenol em 24 horas de reação. Foi demonstrado que a reação de redução da acetofenona competiu com a oxidação de Baeyer-Villiger que teve como produto da oxidação o fenil acetato, o qual no meio de reação foi rapidamente hidrolisado a fenol. Para efeito de confirmação da formação de fenol via Baeyer-Villiger, na mistura de reação adicionaram o acetato de fenila e observaram que o éster foi hidrolisado a fenol em 3 horas sob mesmas condições de reação.

O grupo de Nagaki e colaboradores [90] estudaram a biotransformação de acetofenona com o fungo *Colletotrichum acutatum* e observaram uma reação muito lenta na conversão do substrato ao produto 1-feniletanol, e obtiveram na composição dos produtos 38,1 % (1-feniletanol) e 61,5 % (fenol) no final de 18 dias de reação.

Já em nossos estudos da biotransformação da acetofenona realizada com o *G. candidum*, nós observamos formação do fenol nas primeiras 12 horas, e ao final de 72 horas de reação a composição dos produtos rendeu 46,9 e 45,5 % do fenol e 1-feniletanol, respectivamente.

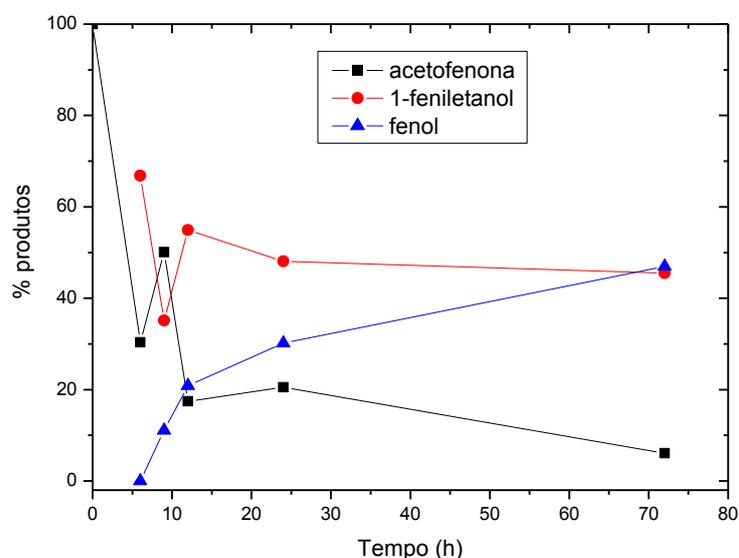
Sugere-se então que na biotransformação da acetofenona com o *G. candidum* deve ocorrer oxidação de Baeyer-Villiger com formação de fenil acetato e sua consequente hidrólise no meio de reação leva a formação de fenol. Uma proposta de mecanismo para a biotransformação da acetofenona foi baseada no mecanismo apresentado por Nagaki et al. [90] (**Esquema 19**).

**Esquema 19** - Proposta mecanística de biooxidação de acetofenona por células de *G. candidum*.



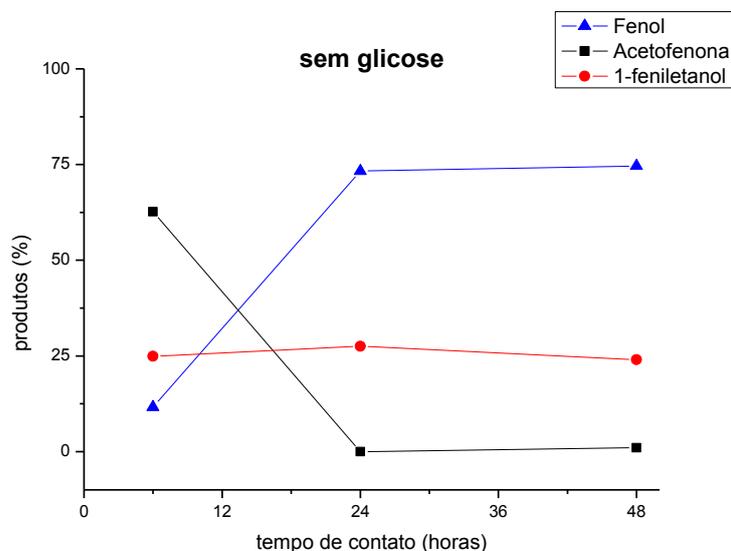
No mecanismo proposto para a reação biocatalisada, a redução da acetofenona ao álcool 1-feniletanol é catalisada por enzimas ADHs, enquanto uma reação competitiva ocorre mediante a ação de enzimas BVMOs, em que acetofenona é primeiramente convertida em acetato de fenila via biooxidação de Baeyer-Villiger. A reação progride com a formação de fenol através da hidrólise do acetato de fenila, uma vez que biotransformação ocorre em meio aquoso. O curso do tempo da reação de biotransformação da acetofenona (**Figura 36**) mostra como a formação do fenol progride gradualmente no decurso de 72 horas.

**Figura 36** - Curso do tempo de biotransformação da acetofenona por *G. candidum*.



No intuito de investigar o efeito da glicose na biotransformação com células do *G. candidum*, foram conduzidos experimentos que visam analisar a composição da mistura de reação, após a adição de glicose no meio reacional e a reação totalmente livre de glicose, isto é, após o crescimento das células, a biomassa de micélios foi lavada (4x) para eliminar qualquer traço de glicose no meio de reação. Os resultados dos experimentos realizados sem adição de glicose e com adição de 200 mg de glicose no meio de reação são mostrados nas **Figuras 37 e 38**, respectivamente.

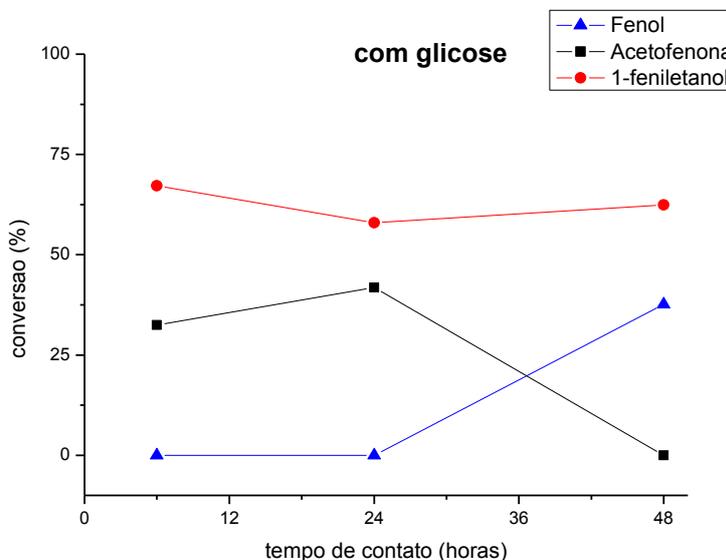
**Figura 37** - Curso do tempo de biotransformação da acetofenona por *G. candidum* sem adição de glicose (células 4x lavadas com água destilada).



Como pode ser visto na **Figura 37**, na reação de conversão de acetofenona realizada com células do *G. candidum*, lavadas 4x com água destilada e sem adição de glicose no meio de reação, forneceu cerca de 11% e fenol e 25% de 1-feniletanol nas primeiras 6 horas de reação. O fenol ocorre como produto majoritário em 73% já em 24 horas no meio reacional. Esses resultados reforçam a hipótese de ocorrência de reação de Baeyer-Villiger na biotransformação da acetofenona com as células de *G. candidum*, seguida da hidrólise do éster obtido como intermediário da reação.

Contudo, nos experimentos realizados com adição de glicose, não foi possível observar formação de fenol no período de 24 horas de reação. No período de 48 horas de reação foi observado 37,5% de fenol na mistura de reação (**Figura 38**). Esses resultados contrastam com os obtidos nos ensaios sem adição de glicose, pois neste uma biotransformação de Baeyer-Villiger ocorreu mais rapidamente enquanto no procedimento de biotransformação com adição glicose houve maior inibição da atividade das monooxigenases de Baeyer-Villiger. A presença de uma fonte de hidrogênio como a glicose é necessária para promover a atividade de desidrogenases que dependem de cofatores para auxiliar no processo redox.

**Figura 38** - Curso do tempo de biotransformação da acetofenona por *G.candidum* com adição de glicose.



A formação de fenol no meio de reação pode ser confirmada pelo teste de fenol com cloreto férrico em meio aquoso [91]. Os fenóis foram complexos coloridos ao reagirem cloreto de ferro (III). A coloração pode variar do azul ao vermelho. No experimento realizado para confirmação de fenol foi observado coloração verde após adição de cloreto férrico 3% na amostra da reação de biotransformação da acetofenona após 24 horas de contato (**Figura 39**). Esse resultado constata formação de fenol no meio de reação durante a biotransformação.

**Figura 39** - Teste de identificação de fenol com cloreto férrico 3% em meio aquoso para a mistura de reação de biotransformação da acetofenona sem adição de glicose após 48 horas de contato. Fonte: próprio autor.



## 4 CONCLUSÕES

A imobilização de biocatalisadores em suportes quimicamente estáveis se apresenta como uma tendência ascendente no campo da aplicação em biocatálise. Nesta perspectiva, o presente estudo teve como propósito contribuir para o estado da arte na busca de estratégias que viabilizem a estabilização de biocatalisadores em bioprocessos. Além disso, o estudo da utilização células vivas em biocatálise enriquece o debate científico para a viabilidade de produção em grande escala com custos menos onerosos.

Os resultados aqui apresentados mostraram que o emprego de células vivas de *G. candidum* CCT 1205 em reações de Baeyer-Villiger possibilitou rápidas conversões de cetonas cíclicas em  $\epsilon$ -caprolactona, quando comparados a outros microrganismos já reportados.

Células íntegras de *G. candidum* CCT 1205 imobilizadas em suportes de sílica silanizadas foram empregadas em biotransformações de Baeyer-Villiger e pela primeira vez foram obtidas evidências que sílicas funcionalizadas promovem estabilização do meio celular ao diminuir a toxicidade do substrato às células, quando em meios reacionais mais concentrados.

No estudo da biotransformação de acetofenona com as células de *G. candidum*, observamos que o fenol é o produto majoritário da biotransformação quando se emprega células do *G. candidum* sem a presença de glicose, devido a uma inibição da atividade de enzimas álcool desidrogenases em favor da monooxigenase de Baeyer-Villiger.

O potencial biocatalítico da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em superfícies de sílicas funcionalizadas foi evidenciado na transesterificação do p-nitrofenilpalmitato.

## 5 PERSPECTIVAS

Dado o potencial biotecnológico dos sistemas estudados neste trabalho de tese, é desejável que novos estudos possam ser desenvolvidos a partir dos resultados aqui obtidos. Neste contexto, podemos traçar algumas perspectivas para continuidade dos estudos aqui desenvolvidos:

- Estudar novas rotas de imobilização de células do *G. candidum* e outros microrganismos em suportes de sílica;
- Investigar a seletividade das reações de biotransformação com células imobilizadas em substratos moleculares mais complexos e de interesse industrial;
- Estudar a viabilidade celular em reações de biotransformação com os sistemas de células imobilizadas em processos de fluxo contínuo e escalas mais amplas
- Investigar parâmetros termodinâmicos e cinéticos nas reações de biocatálise com os biocatalisadores livres e imobilizados

## 6 PARTE EXPERIMENTAL

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise (LASOB). Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho, os métodos empregados na preparação dos suportes, imobilização dos biocatalisadores e biotransformação, bem como a síntese de padrões e caracterização dos materiais obtidos estão descritos nas próximas seções.

### 6.1 Reagentes e solventes

Sílica gel comercial Kieselgel 60 (Aldrich) (270-300 mesh) de pureza cromatográfica foi utilizada na preparação de suportes funcionalizados para imobilização das células fúngicas e da enzima lipase de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich). Todos os solventes foram de grau P.A. e utilizados sem purificação prévia.

Reagentes utilizados na funcionalização do suporte sílica gel: 3-cloropropil-trimetoxissilano 97% (Sigma-Aldrich), 3-aminopropil-trimetoxissilano 97% (Sigma-Aldrich), mercaptopropiltrimetoxissilano 98% (Acros Organics), 1,2-diaminoetano > 99% (Sigma-Aldrich), 1,4-diaminobutano > 99% (Sigma-Aldrich), 1,6-diaminohexano > 99% (Sigma-Aldrich), cloreto cianúrico 99% (Acros Organics) e glutaraldeído > 99% (Acros Organics).

Reagentes utilizados em biocatálise com lipases: 4-nitrofenilpalmitato, 4-nitrofenol (9), ácido butírico > 99% (Vetec), n-butanol (Merk), Boroidreto de sódio (Vetec), metanol > 99% (Vetec), acetofenona > 98% (Sigma-Aldrich), 1-feniletanol e acetato de feniletanol.

Reagentes utilizados nas reações de biotransformação com as células de *G. candidum*: cicloexanona 99,8% (Sigma-Aldrich), cicloexanol 99,8% (Sigma-Aldrich), cicloexenona 99,8% (Sigma-Aldrich),  $\epsilon$ -caprolactona >99% (Sigma-Aldrich), acetofenona > 98% (Sigma-Aldrich).

Solventes: Acetato de etila P.A. 99,5% - ACS (Química Moderna), tolueno HPLC (Tedia), xileno (Sint), hexano P.A 98,5% (Química Moderna) e água destilada.

## 6.2 Preparação dos suportes: secagem da sílica gel

40 g de Sílica gel comercial (270-300 mesh) de pureza cromatográfica sem tratamento prévio foi submetida a aquecimento (120°C) em estufa de esterilização por 12 horas para eliminação de moléculas de água fisicamente adsorvidas. Em seguida, o material foi seco em linha de vácuo por 2 horas antes de ser imediatamente utilizado para caracterização ou em reações de funcionalização.

IV – (ATR,  $v_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1064s, 800w (v Si-O-Si)

Área superficial BET - 452,1  $\text{m}^2/\text{g}$

### 6.2.1 Reação da sílica gel com agente sililante 3-cloropropiltrimetoxissilano

Em um balão de fundo redondo acoplado a um agitador mecânico, 40 g da sílica gel seca foi suspensa em 150,0  $\text{cm}^3$  de xileno, seguido da adição de 40,0  $\text{cm}^3$  (219,0 mmol) do 3-cloropropiltrimetoxissilano com o auxílio de uma seringa. A mistura reacional foi mecanicamente agitada em atmosfera de  $\text{N}_2$  e aquecida em 120°C durante 72 h. Após esse período e depois do resfriamento em temperatura ambiente, o sólido foi filtrado sob pressão reduzida e lavado com o solvente da reação para retirar o excesso de silano seguido da lavagem com etanol e acetona, respectivamente. O material obtido foi chamado  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  e armazenado em dessecador antes de ser utilizado em reações subsequentes.

IV – (ATR,  $v_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 930w (v C-Cl), 1064s, 800w (v Si-O-Si)

RMN de  $^{13}\text{C}$  – (600 MHz, ppm):  $\delta$  12 ( $\text{CH}_2 - \text{C}1$ ),  $\delta$  29 ( $\text{CH}_2 - \text{C}2$ ),  $\delta$  48 ( $\text{CH}_2 - \text{C}3$ ),  $\delta$  53 ( $\text{O}-\text{CH}_3 - \text{C}4$ )

Área superficial BET - 371,9  $\text{m}^2/\text{g}$

### 6.2.2 Reação da sílica gel com agente sililante 3-aminopropiltrimetoxissilano

10 gramas da matriz inorgânica que foi suspensa em 150,0 mL de tolueno, seguida da adição de 15,0 mL (86,0 mmol) do organossilano contendo o grupo funcional amino. O sistema reacional foi mantido sob agitação e refluxo

do solvente em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 72 h. O sólido obtido ( $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ) foi lavado com o solvente e etanol, nesta ordem.

**IV** – (ATR,  $v_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1560 w ( $\delta$  N-H), 1064s, 800w (v Si-O-Si)

**Área superficial BET** - 281,5  $\text{m}^2/\text{g}$

### 6.2.3 Reação da sílica gel com agente sililante 3-mercaptopropiltrimetoxissilano

20 gramas da matriz inorgânica que foi suspensa em 150 mL de tolueno, seguida da adição de 10 mL do organossilano contendo o grupo funcional mercapto. O sistema reacional foi mantido sob agitação e refluxo do solvente em atmosfera de nitrogênio a 100 °C por 28 h. O sólido obtido ( $\text{SiO}_2\text{-SH}$ ) foi lavado com o solvente de reação e etanol, nesta ordem.

**IV** – (ATR,  $v_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2950 w (v C-H), 1064s, 800w (v Si-O-Si).

**Área superficial BET** - 390,2  $\text{m}^2/\text{g}$

### 6.2.4 Reação de funcionalização com 1,2-diaminoetano, 1,4-diaminobutano e 1,6 diaminohexano

10 g da  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  foram suspensas em 100,0  $\text{cm}^3$  de xileno e a esta suspensão foram adicionados 299,16 mmol de cada diamina em sistemas paralelos. A mistura reacional foi mecanicamente agitada em velocidade constante e mantido em refluxo sob atmosfera de nitrogênio por 48 h a 70-80 °C. Após esse período e depois do resfriamento, em temperatura ambiente, o material resultante foi filtrado a pressão reduzida e lavado com o solvente da reação para remover o excesso das moléculas que não reagiram, sendo depois lavado com etanol e acetona. Os sólidos obtidos foram denominados **SiO<sub>2</sub>-et** para a reação com 1,2-etildiamino, **SiO<sub>2</sub>-but** para a reação com 1,4-butildiamino e **SiO<sub>2</sub>-hex** para a reação com 1,6-hexildiamina. Os materiais foram armazenados em dessecador antes do uso.

### 6.2.5 Reação de funcionalização com cloreto cianúrico

Os sólidos (5,0 g) de **SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**, **SiO<sub>2</sub>-et**, **SiO<sub>2</sub>-but** ou **SiO<sub>2</sub>-hex** foram suspensos em 2,3 g da molécula triazínica dissolvida em uma mistura de 1,4-dioxano/acetona 4:1. A suspensão foi mantida em refluxo sob atmosfera de nitrogênio e mecanicamente agitada por 12 h em temperatura ambiente (~25

°C). Após esse período, os sólidos obtidos foram filtrados e lavados com o solvente de reação, em seguida foram submetidos à secagem em linha de vácuo por 12 h e depois armazenados em dessecador, antes do uso.

#### **6.2.6 Reação de funcionalização com glutaraldeído**

2,0 gramas dos materiais **SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**, **SiO<sub>2</sub>-et**, **SiO<sub>2</sub>-but** ou **SiO<sub>2</sub>-hex** foram suspensos em 10 mL de solução glutaraldeído (5% v/v, pH 8,0) e mantidas em agitação magnética por 12 h em temperatura ambiente (~25 °C). Após esse período, os sólidos obtidos foram filtrados, lavados com solução tampão de reação e em seguida submetidos à secagem em linha de vácuo por 12 h, e depois armazenados em dessecador antes do uso. Os materiais obtidos foram chamados **SiO<sub>2</sub>-N-Glut**, **SiO<sub>2</sub>-et-Glut**, **SiO<sub>2</sub>-but-Glut** e **SiO<sub>2</sub>-hex-Glut**.

#### **6.3 Procedimento de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia***

10 mL da lipase BCL (1,0 mg mL<sup>-1</sup>), preparada em tampão fosfato de potássio (pH 6,5), foi adicionada dentro de frascos Erlenmeyers contendo 150 mg das sílicas funcionalizadas. Os frascos foram selados e a reação de imobilização foi realizada em incubadora tipo Shaker sob agitação (150 rpm) e temperatura ambiente (25°- 28°C) por 12 horas. Após o processo de filtragem e secagem, as enzimas imobilizadas foram imediatamente utilizadas nos ensaios de transesterificação do p-nitrofenilpalmitato.

#### **6.4 Condições de cultivo das células de *Geotrichum candidum***

A primeira etapa do trabalho consistiu em realizar a fermentação do fungo *Geotrichum candidum* utilizando para isso os meios de cultura apropriados. Os microrganismos utilizados neste trabalho de pesquisa foram adquiridos da Fundação André Tosello, Parque Taquaral, Campinas-SP pertencentes à Coleção de Cultura Tropical (CCT).

Empregou-se o meio de cultura YM (yeast medium) em água destilada para o crescimento dos micro-organismos. Composição: extrato de levedura (1,5 g), extrato de malte (1,5 g), peptona (2,5 g) e glucose anidra (5,0 g) para meio com 500 mL de água destilada. Após o preparo do meio, seguiu-

se para esterilização em autoclave sob condições de 120°C, 15 psi por 15 minutos.

Em seguida, o meio esterilizado foi inoculado com o *Geotrichum candidum* em câmara de fluxo laminar. Para o crescimento celular, o meio contendo o micro-organismo foi incubado a 30°C, 180 rpm por 48h. Após o crescimento das células, a suspensão celular foi centrifugada, os micélios lavados com água destilada esterilizada e depois filtrados. Então, amostras da biomassa celular úmida foram pesadas e imediatamente submetidas em reações de biotransformação.

#### **6.4.1 Procedimento geral de imobilização das células de *G. candidum***

Para a imobilização das células íntegras de *G. candidum* foram empregados os suportes **SiO<sub>2</sub>**, **SiO<sub>2</sub>-Cl**, **SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**, **SiO<sub>2</sub>-N-Glut** e **SiO<sub>2</sub>.SH**. Inicialmente, 1g de células frescas do microrganismo (massa úmida), previamente centrifugadas e lavadas com água destilada, foram suspensas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de tampão fosfato (pH 6.5) e mantidas em agitação manual por alguns segundos. Em seguida, 0,5 g do suporte foram adicionados à suspensão e a mistura foi agitada em shaker (160 rpm) por 12 horas a 28°C. A mistura resultante foi filtrada sob pressão reduzida e a biomassa imobilizada obtida foi imediatamente utilizada em biotransformação ou armazenada em geladeira (2-8°C) antes do uso.

### **6.5 Ensaio biocatalíticos**

Esta parte experimental consistiu investigar o potencial sintético dos biocatalisadores em reações com lipase de *Burkholderia cepacia* (livre e imobilizada) e biotransformações com células de *G. candidum* (livres e imobilizadas).

#### **6.5.1 Condições gerais da reação de Transesterificação do p-nitrofenilpalmitato (p-NPP)**

Uma mistura reacional contendo 10 mmol L<sup>-1</sup> de p-NPP e 1 mol L<sup>-1</sup> de 1-butanol em 5 mL de n-hexano foi preparada em frascos Erlenmeyers de 50 mL. A reação foi iniciada com adição da enzima livre (6,5 mg) ou imobilizada (100 mg). Os frascos foram selados e os experimentos conduzidos com

agitação de 200 rpm em shaker e 28°C por 1 hora. Após a reação, 30 µL da solução límpida sobrenadante foi extraída e transferida para um tubo de ensaio contendo 3 mL de etanol 95% P.A. Um experimento controle foi preparado sob as mesmas condições de reação mas sem a presença da enzima. A amostra diluída foi analisada por espectrofotometria UV em 314 nm contra um controle branco. As conversões foram determinadas com base em curva de calibração (ver Apêndice C).

#### **6.5.2 Procedimento geral da reação de biotransformação dos substratos cicloexenona, cicloexanona, cicloexanol e acetofenona com células *G. candidum* livres**

Em cada reação 1,0 grama de células (massa úmida) de *G. candidum* livres foi suspensa em frasco Erlenmayer contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6,5 e à mistura foi adicionada 10 µL do substrato correspondente. A mistura reacional foi mantida sob agitação em shaker a 30°C por intervalos de tempo pré-determinados. Ao término da reação a mistura foi filtrada e uma alíquota da amostra extraída com acetato de etila foi analisada por CG/EM ou CG-FID (ver Apêndice B).

#### **6.5.3 Procedimento geral da reação de biotransformação dos substratos cicloexenona, cicloexanona, cicloexanol com células de *G. candidum* CCT 1205 imobilizadas**

Em cada reação 2,0 gramas de células de *G. candidum* imobilizadas foram suspensas em 10 mL de tampão fosfato pH 6,5 e a esta mistura foi adicionada 10 µL do substrato correspondente. A mistura reacional foi mantida sob agitação em shaker a 30°C por intervalos de tempo pré-determinados. Ao término da reação a mistura foi filtrada e uma alíquota da amostra extraída com acetato de etila foi analisada por CG/EM ou CG-FID (ver Apêndice B).

#### **6.5.4 Procedimento geral da reação de biotransformação do substrato acetofenona com células de *G. candidum* CCT 1205 com adição de glicose**

2,0 gramas de células de *G. candidum* foram suspensas em 10 mL de tampão fosfato pH 6,5 e à esta mistura foi adicionada 10 µL do substrato

acetofenona e 200 mg de glicose. A mistura reacional foi mantida sob agitação em shaker a 30°C por intervalos de tempo pré-determinados. Ao término da reação a mistura foi filtrada e uma alíquota da amostra extraída com acetato de etila foi analisada por CG/EM ou CG-FID (ver Apêndice B).

## **6.6 Métodos de caracterização dos materiais**

Amostras dos materiais suportes e dos biocatalisadores imobilizados foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de RMN de  $^{29}\text{Si}$  e  $^{13}\text{C}$ , análise termogravimétrica, análise elementar de CHN e análise de área superficial. Os produtos obtidos das reações de biocatálise foram caracterizados por análise cromatográfica (GC-FID), cromatografia acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e espectrofotometria UV-Vis.

### **6.6.1 Análise de adsorção de nitrogênio**

As medidas de área superficial, volume e tamanho médio dos poros das amostras de sílica pura e suas formas modificadas foram feitas no analisador de área superficial e de porosidade Micrometrics ASAP 2020, e foram baseadas no método de adsorção-dessorção de nitrogênio. As medidas de área superficial específica foram determinadas conforme o método desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (B.E.T.) [92]. Os valores obtidos foram calculados com base na determinação do volume de nitrogênio adsorvido a diferentes pressões em temperatura constante. As análises foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

### **6.6.2 Análise elementar de C, H e N**

As análises das amostras de sílicas organicamente modificadas foram realizadas em analisador Fisons Instruments Elemental Analyzer, Model EA-1110 CHN, em que foram investigadas quanto ao teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio. As análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp.

### 6.6.3 Termogravimetria

As análises termogravimétricas foram realizadas no aparelho TA instruments, sob atmosfera de argônio, sendo a massa de amostra empregada aproximadamente 20 mg e a faixa de temperatura variou entre 25°C e 900°C. Todas as análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp.

### 6.6.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos para a sílica gel pura e suas formas quimicamente modificadas. As amostras foram preparadas em almofariz de ágata utilizando pastilhas de KBr numa proporção KBr:amostra aproximadamente 10:1. As análises foram realizadas no espectrofotômetro Shimadzu® e os espectros foram analisados na região entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de algumas amostras também foram registrados utilizando-se a técnica de FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer Attenuated Total Reflectance – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada). Os espectros foram registrados em um Espectrofotômetro Vertex 70 da Bruker®, pertencente ao Laboratório de Caracterização do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

### 6.6.5 Espectroscopia de RMN $^{29}\text{Si}$ e $^{13}\text{C}$

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{29}\text{Si}$  e  $^{13}\text{C}$  das sílicas organofuncionalizadas neste trabalho foram obtidos através do espectrômetro de RMN Bruker 600 MHz, utilizando a técnica de polarização cruzada e rotação de ângulo mágico CP-MAS. As análises foram realizadas empregando uma frequência de 75,47 MHz para carbono e 59,63 MHz para silício. Todas as análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp.

### 6.6.6 Análises cromatográficas e espectrometria de massas

As reações de biotransformação foram acompanhadas por cromatografia gasosa, sendo os cromatogramas registrados em um Cromatógrafo Gasoso GC-QP 2010 da Shimadzu, equipado com detector FID – Flame Ionization Detector (pertencente ao Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise da Universidade Federal da Paraíba – UFPB). Para o acompanhamento das reações de Baeyer-Villiger foi utilizada a coluna capilar Rtx-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm), usando N<sub>2</sub> como gás de arraste (1mL/min); gradiente 60°C (1min), 100°C (35°C/min), 150°C (25°C/min) e 240°C (45°C/min).

Biotransformação de Baeyer-Villiger e reações de bioedução da acetofenona foram acompanhadas por técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas – CG-EM. Os cromatogramas e os espectros de massas foram registrados no equipamento Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas GCMS-QP 2010 Ultra da Shimadzu em coluna capilar Rtx-5MS com dimensões (30m x 0,25mm x 0,25µm). As análises foram realizadas na Unidade de Caracterização Análise, UNICAL, do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB.

### 6.6.7 Análise espectrofotométrica UV-Vis

Experimentos foram realizados no espectrofotômetro Shimadzu UV-NIR (UV-3600 PLUS). Foram construídas curvas analíticas para determinação da atividade sintética de lipase livre e imobilizada (UV 314 nm). A curva de calibração para cálculo da atividade de lipase foi realizada em seis níveis 0,01 mM – 0,12 mM para o reagente p-NPP e para o produto da transesterificação p-NP, ambos em meio etanólico. O cálculo dos rendimentos obtidos foi realizado com base nos coeficientes de extinção molar da curva de calibração, de acordo com a equação:  $C \text{ (mol L}^{-1}\text{)} = [(A_2 - A_1)/(\epsilon_2 - \epsilon_1)] \times F$ , em que

**C** = é a concentração de p-NP

**A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub>** = Absorbância da amostra – Absorbância da reação controle

**ε<sub>2</sub> - ε<sub>1</sub>** = coeficiente de extinção molar de pNP- pNPP

**F** = Fator de diluição da amostra

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] SHELDON, R. A., WOODLEY, J. M. **Chem. Rev.** v, 118, p. 801-838, 2018.
- [2] TRUPPO, M. D. **ACS Med. Chem. Lett.** v. 8, p. 476–480, 2017.
- [3] ZAJKOSKA, P., REBRO, M. S., ROSENBERG, M. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 97, p. 1441 – 1455, 2013.
- [4] CHOI, J., HAN, S., KIM, H. **Biotechnology Advances.** v. 33, p. 1443-1454, 2015.
- [5] SUN, H., ZHANG, H., ANG, E. L., ZHAO, H. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 26, p. 1275-1284, 2018.
- [6] SHODA, S., HIROSHI, U., KADOKAWA, J., KIMURA, S., KOBAYASHI, S. **Chem. Rev.**, v. 116, p. 2307 – 2413, 2016.
- [7] ACHTMEISTER J., ROTHER. D. **Current Opinion in Biotechnology.** v. 42, p. 169–177, 2016.
- [8] HUDLICKY, T., REED, J. W. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p. 3117–3132, 2009.
- [9] SCHENKMAYEROVA, A., BUCĀKO, M., GEMEINER, P., LACĀK, D. C. I. **Biotechnol Lett.** v. 34, p. 309–314, 2012.
- [10] STERGIU P., et al. **Biotechnology Advances.** v. 31, p. 1846–1859, 2013.
- [11] KISUKURI M. C., ANDRADE, L. H. **Org. Biomol. Chem.**, v. 13, p. 10086–10107, 2015.
- [12] WEISER, D. et al. **Green Chem.** v. 19, p. 3927–3937, 2017.
- [13] HOLLMANN, F., ARENDS, I. W. C. E., HOLTMANN, D. **Green Chem.** v. 13, p. 2289, 2011.
- [14] BUĀKO, M. et al. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 100, p. 6585 – 6599, 2016.
- [15] LEISCH, H., MORLEY, K., LAU, P. C. K. **Chem. Rev.** v. 111, p. 4165 – 4222, 2011.
- [16] HUSSAIN et al. **RSC Adv.**, v. 4, p. 12882, 2014.
- [17] ALPHAND, V. et al. **TRENDS in Biotechnology.** v. 21, 2003.
- [18] PAZMINO, D. T., DUDEK, H. M., FRAAIJE, M. W. **Current Opinion in Chemical Biology.** v. 14, p. 138–144, 2010.
- [19] MIRZA et al. **J. Am. Chem. Soc.** v. 131, p. 8848–8854, 2009.

- [20] YACHNIN, B. J., LAU, P. C. K., BERGHUIS, A. M. **(BBA) proteins and proteomics**. v. 1864, p. 1641-1648, 2016.
- [21] FRIED, J.; THOMA, R. W.; KLINGSBERG, A. **J. Am. Chem. Soc.** v. 75, p. 5764, 1953.
- [22] LABET, M., THIELEMANS, W. **Chem. Soc. Rev.** v. 38, p. 3484–3504, 2009.
- [23] RATÚS, B. et al. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 45, p. 156–163, 2009.
- [24] KAWAMOTO, M. et al. **Biotechnol Lett**; v. 30, p. 1655–60, 2008.
- [25] MANDAL, D., AHMAD, A., KHAN, M. I., KUMAR, R. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v. 181, p. 237–241, 2002.
- [26] CARBALLEIRA, J. D., ÁLVAREZ, E., SINESTERRA, J. V. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 28, p. 25–32, 2004.
- [27] MALLIN, H., WULF, H., BORNSCHEUER, U. T. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 53, p. 283–287, 2013.
- [28] STAUDT, S. et al. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 53, p. 288–292, 2013.
- [29] BORNADEL, A. et al. **Tetrahedron**. v. 72, p. 7222-7228, 2016.
- [30] WALTON, A. Z., STEWART, J. D. **Biotechnol. Prog.**, v. 18, p. 262-268, 2002.
- [31] LEE, W. H., Et. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 123, p. 827-836, 2005.
- [32] MARTINEZ, I. et al. **Metabolic Engineering**. v. 10, p. 352–359, 2008.
- [33] REBROS, M., LIPTAK, L., ROSENBERG, M., BUCKO, M., GEMEINER, P. **Letters in Applied Microbiology**. v. 58, p. 556-563, 2014.
- [34] CECCOLI, R. D. et al. **AMB Express**. v. 7, p. 1-13, 2017.
- [35] MTHETHWA, K. S. et al. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 106, 11–17, 2017.
- [36] LEE et al. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 76, p. 329 – 338, 2007.
- [37] PARRA, L. P., ACEVEDO, J. P., REETZ, M. T. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, p. 1354 – 1364, 2015.
- [38] ROMERO, E., CASTELLANOS, J. R. G., MATTEVI, A., FRAAIJE, M. W. **Angew. Chem. Int. Ed.** v. 55, p. 1-5, 2016.
- [39] STERGIU, P. et al. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846–1859, 2013

- [40] CASTRO, H. F. et al. **Quim. Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.
- [41] KAPOOR, M., GUPTA, M. N. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555–569, 2012.
- [42] GUPTA, R., GUPTA, N. RATHI, P. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p.763–781, 2004.
- [43] STEUNENBERG, P. et al. **J. Org. Chem.** v. 78, p. 3803, 2013.
- [44] QUEIROZ, N., NASCIMENTO, M. G. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 5225–5227, 2002.
- [45] SILVA, et al. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, p. 987-994, 2014.
- [46] SÁNCHEZ, D. A., TONETTO, G. M., FERREIRA, M. L. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 115, p. 6-24, 2018.
- [47] SCHRAG, J. D. et al. **Structure**, v. 5, p. 187-202, 1997.
- [48] KOBAYASHI, S. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B**. v. 86, p. 338-365, 2010.
- [49] LI, K. et al. **Nature Scientific Reports**, v. 7, p. 1-17, 2017.
- [50] ZADEH, P. S. N., ÅKERMAN, B. **J. Phys. Chem. B**. v. 121, p. 2575–2583, 2017.
- [51] KATCHALSKI-KATZIR, E., KRAEMER, D. M. **J. Mol. Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 157–176, 2000.
- [52] JUAN, M., BOLIVAR, A., INGRID E., NIDETZKY, B. **Catalysis Today**. v. 259, p. 66-80, 2016.
- [53] REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science** v. 147, p. 237–250, 2009.
- [54] CHEN, B. et al. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 463–471, 2008.
- [55] YILDIRIM, D., TÜKEL, S. S., **Process Biochemistry**, v. 48, p. 819–830, 2013.
- [56] MARTINS, S. C. S. et al. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, p. 4412-4418, 2013.
- [57] MADHAVAN, A. et al. **Bioresource Technology**. v. 245, p. 1304-1313, 2017.
- [58] SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; BASRI, M. **New lipases and proteases**. Nova Science Publishers, 2006.
- [59] HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p. 453–468, 2009.

- [60] PELLIS, A., CANTONE, S., EBERT, C., GARDOSI, L. **New Biotechnology**. v. 40, p. 154-169, 2018.
- [61] NIU, Y., LIU, H., QU, R., LIANG, S., CHEN, H., SUN, C., CUI, Y. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 54, p. 1656–1664, 2015.
- [62] BERNAL, C., ILLANES, A., WILSON, L. **Langmuir**, v. 30, p. 3557 – 3566, 2014.
- [63] RIMOLA, A., COSTA, D., SODUPE, M., LAMBERT, J., UGLIENGO, P. **Chem. Rev.**, v. 113, p. 4216 – 4313, 2013.
- [64] BERGNA, H. E.; ROBERTS, W. O. **COLLOIDAL SILICA: Fundamentals and Applications**. By Taylor & Francis Group, LLC. 2006.
- [65] TIMIN, A. S. et al. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 464, p. 65-77, 2015.
- [66] ZHURAVLEV, L. T. A: **Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 173, p. 1–38, 2000.
- [67] GALLAS, J. et al.. **Langmuir**, v. 25, p. 5825–5834, 2009.
- [68] BUILES, S., VEJA, L. F. **Langmuir**. v. 29, p. 199 – 206, 2013.
- [69] BARBOSA, O. et al. **Biomacromolecules**. v. 14, p. 2433–62, 2013.
- [70] OZYILMAZ, GUL. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 56 p. 231–236, 2009.
- [71] LI, C. et al. **Langmuir**, v. 27, p. 12016 – 12024, 2011.
- [72] ARPANAEI, A. et al. **RSC Adv**. v. 5, p. 33313–33327, 2015.
- [73] ZHUANG, M., WANG, C., XU, M., LING, X., SHEN, J., ZHANG. Y. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 104, p. 63-69, 2017.
- [74] WANG, Y. et al. **Biochemical Engineering Journal**. v. 128, p. 54–62, 2017.
- [75] ZUCCA, P., SANJUST, E. **Molecules**. v. 19, p. 14139-14194, 2014.
- [76] QIU, H. et al. **Journal of Chromatography A**, v. 1163, p. 63–69, 2007.
- [77] AULER, L. M. L. A. et al. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, p. 147–153, 2005.
- [78] KHDARY, N. H. GHANEM, M. A. **J. Mater. Chem**. v. 22, p. 12032, 2012.
- [79] WALCARIUS, A., ETIENNE, M., BESSIERE, **J. Chem. Mater**. v. 14, p. 2757 – 2766, 2002.
- [80] CAPELETTI, L. B. et al. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 133, p. 619–625, 2014.

- [81] MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M.J.; WALDRON, K.C. **BioTechniques**. v. 37, p. 790–802, 2004.
- [82] BARBOSA, O. et al. **RSC Adv**. v. 4, p. 1583–1600, 2014.
- [83] SILVA, A. L. P. **Preparação de sílicas organofuncionalizadas para imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia***. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba. Paraíba, 2012.
- [84] FU, X. et al. **Chinese Journal of Catalysis**. v. 35, p. 553–559, 2014.
- [85] VERGER, R. **TIBTECH**. v. 15, p. 32-38, 1997.
- [86] AISSAOUI, N. et al. **Langmuir**. v. 30, p. 4066 – 4077, 2014.
- [87] ALAGÖZ, D., TÜKEL, S. S., YILDIRIM, D. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 87, p. 426–432, 2016.
- [88] MIHOVILOVIC, M. D., SNAJDROVA, R., GROTZL, B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 39, p. 135–140, 2006.
- [89] FUGII, M. et al. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 51, p. 77-45, 2007.
- [90] NAGAKI, M. et al. **Trans. Mat. Res. Soc. Japan**. v. 41, p. 247-250, 2016.
- [107] LAZGHAB, M., SALEH, K., GUIGON, P. **Chemical Engineering research and Design**, v. 88, p. 686-692, 2010.
- [91] SOARES, B. G., SOUZA, N. A. PIRES, D. X. **Química Orgânica: Teoria e Técnicas de Preparação, Purificação e Identificação de Compostos Orgânicos**, Ed. Guanabara S.A.: Rio de Janeiro, 1988.
- [92] BRUANUER, S., EMMETT, P. H. TELLER, E. **J. Am. Chem. Soc.** v. 60, p. 309–316, 1938.

# APÊNDICES

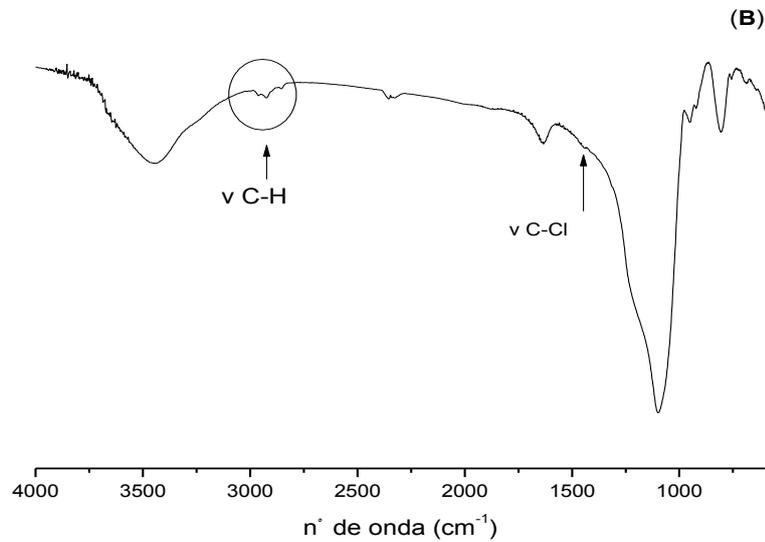
## APÊNDICES

Neste capítulo são apresentados os espectros e os cromatogramas obtidos da caracterização dos produtos da reação de funcionalização dos suportes e das reações de biocatálise.

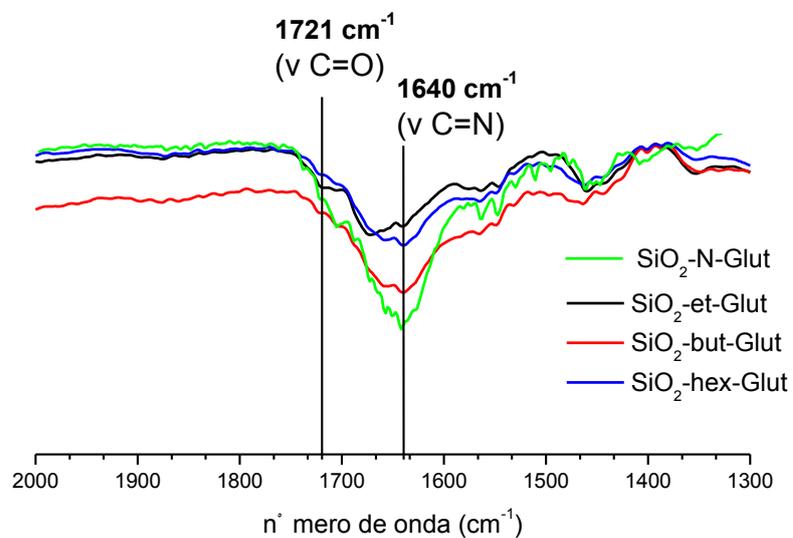
- Apêndice A: Espectros de absorção no infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN<sup>13</sup>C) das sílicas funcionalizadas.
- Apêndice B: Espectros de Massa (GC-EM) e cromatogramas dos produtos da biocatálise.
- Apêndice C: Espectros UV-Vis; curvas de calibração (UV-Vis e GC-FID).
- Apêndice D: Imagens dos suportes, da biomassa micelar do *G. candidum* e da amostra sólida comercial de lipase de *Burkholderia cepacia*

## Apêndice A

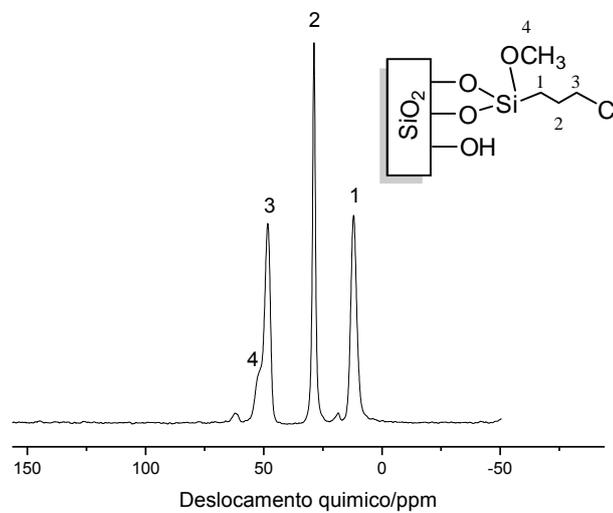
**Figura 40A** - Espectro de absorção no infravermelho utilizando a técnica da pastilha de KBr para o material  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$ .



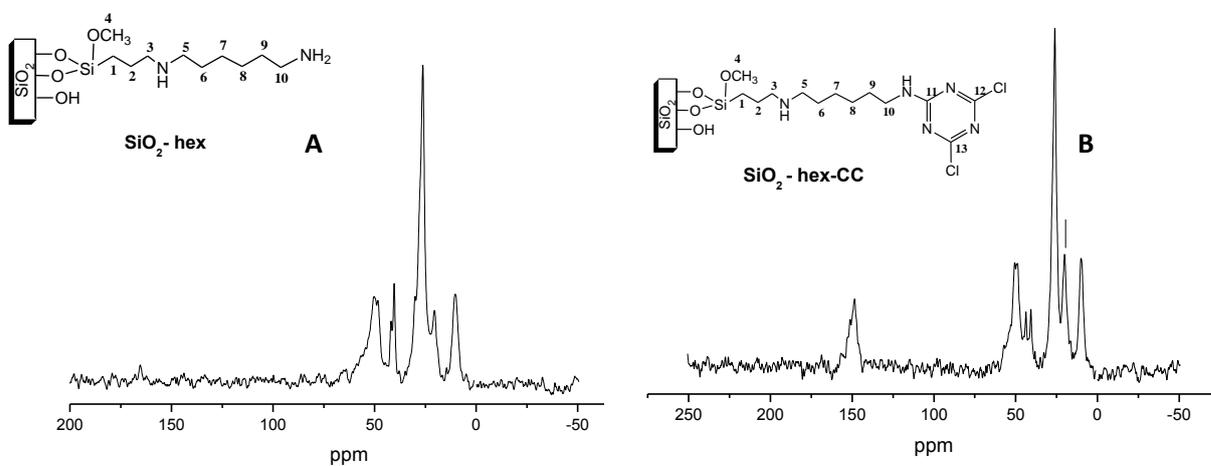
**Figura 41A** - Espectros de absorção no infravermelho obtidos através da técnica de ATR (reflectância atenuada) para os materiais:  $\text{SiO}_2\text{-N-Glut}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-et-Glut}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but-Glut}$  e  $\text{SiO}_2\text{-hex-Glut}$



**Figura 42A** - Espectro de RMN<sup>13</sup>C obtido para o sólido Sílica cloropropil (SiO<sub>2</sub>-Cl).

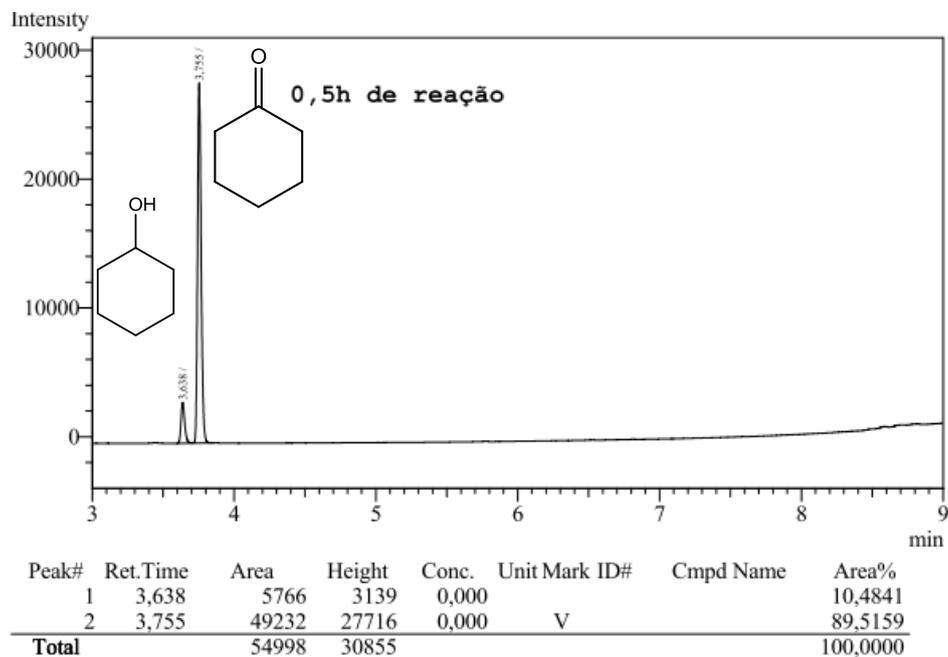


**Figura 43A** - Espectro de RMN<sup>13</sup>C obtido para o sólido SiO<sub>2</sub>-Hex (A) e SiO<sub>2</sub>-hex-CC (B).

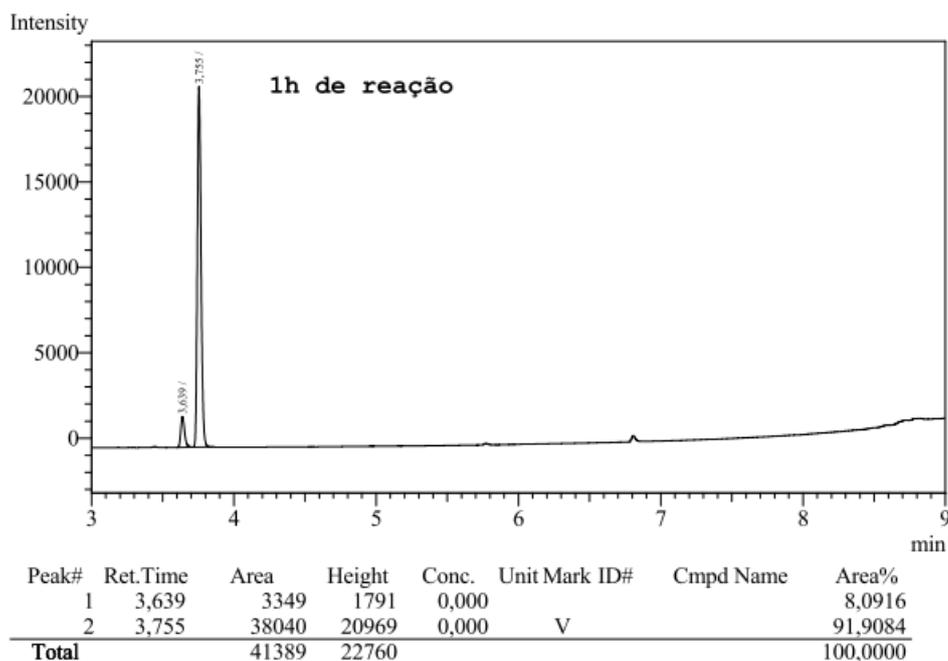


## Apêndice B

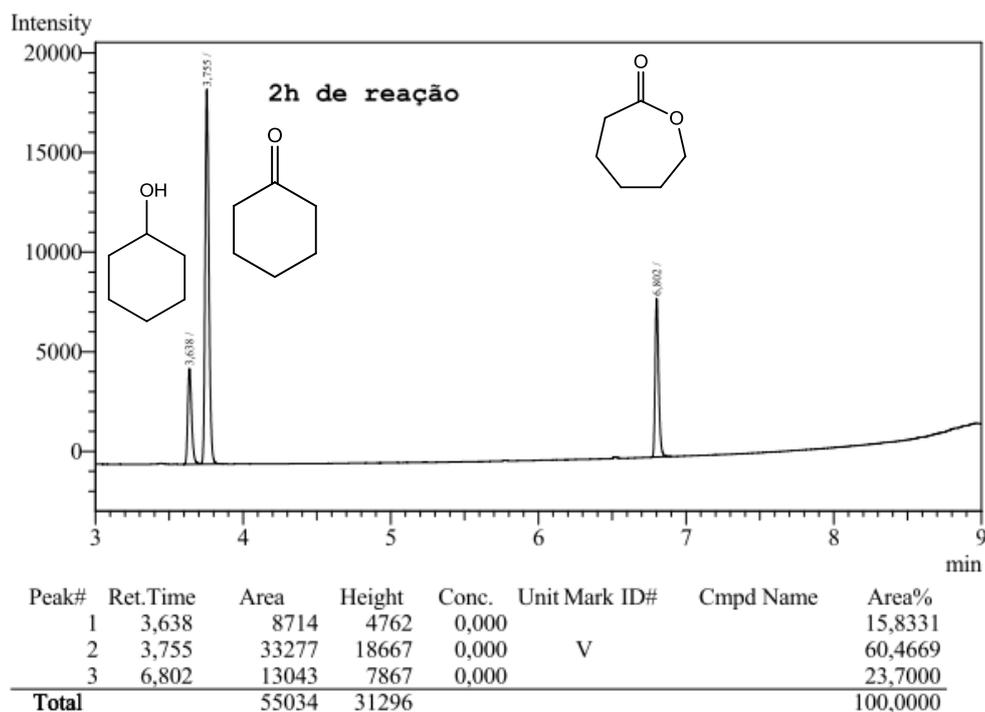
**Figura 44B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona com células livres de *G. candidum* após 0,5 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5).



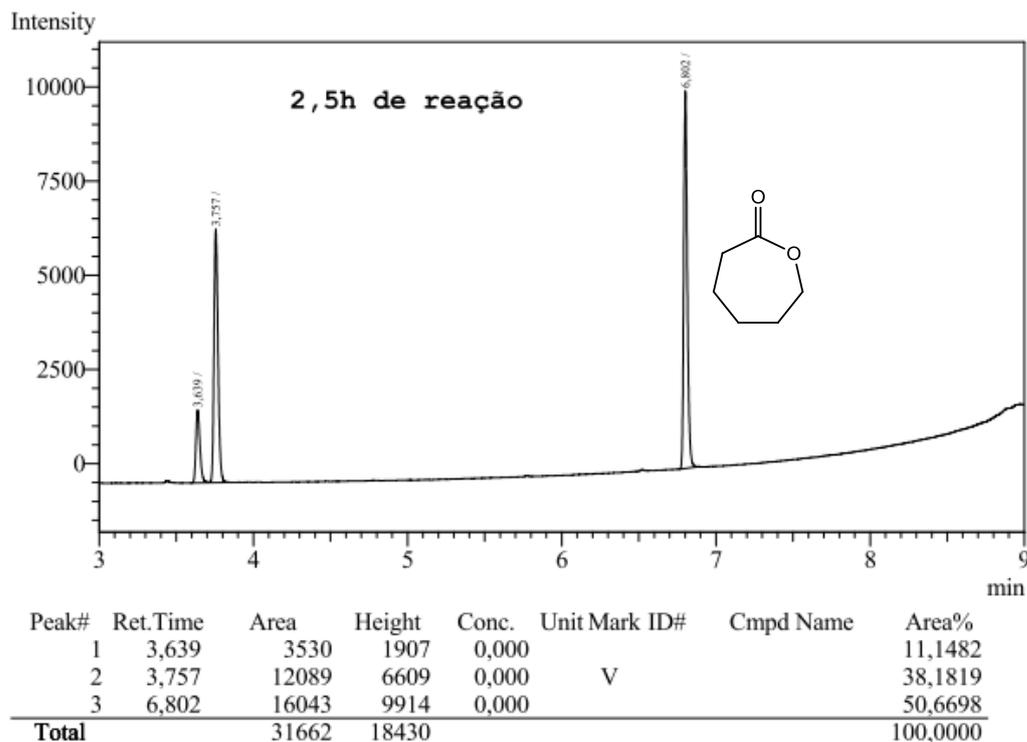
**Figura 45B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona com células livres de *G. candidum* após 1 hora de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5).



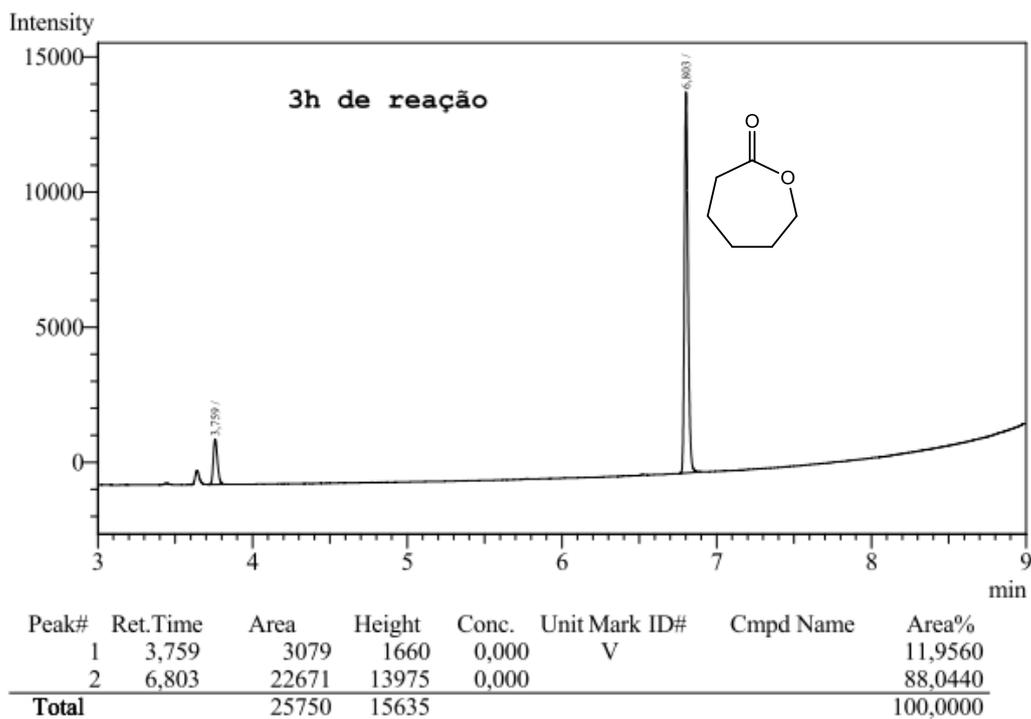
**Figura 46B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona com células livres de *G. candidum* após 2 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5).



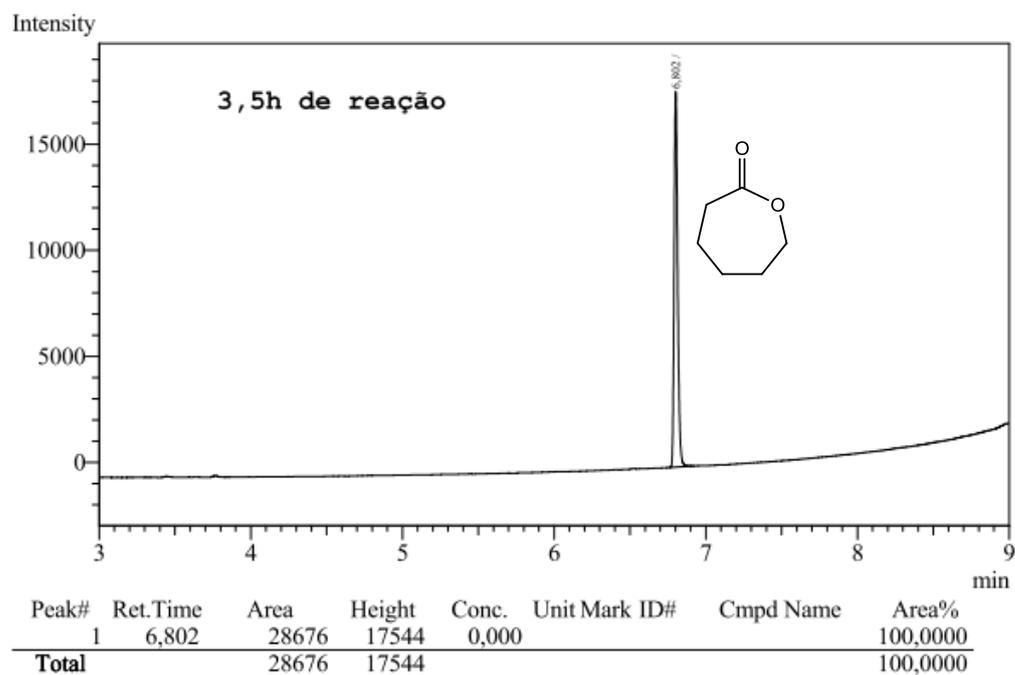
**Figura 47B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona com células livres de *G. candidum* após 2,5 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5).



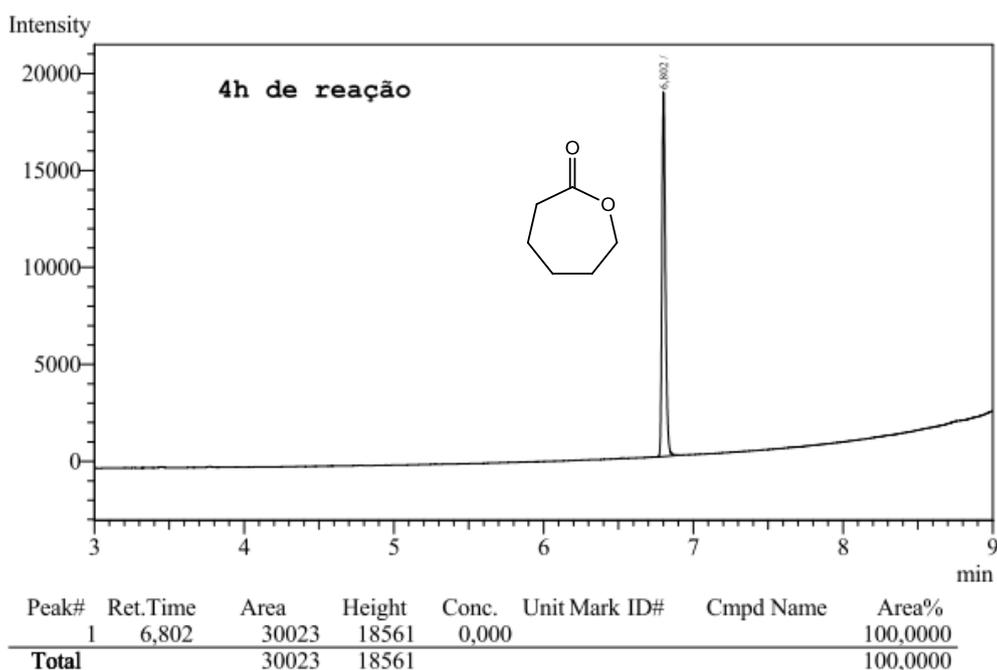
**Figura 48B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona com células livres de *G. candidum* após 3 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5).



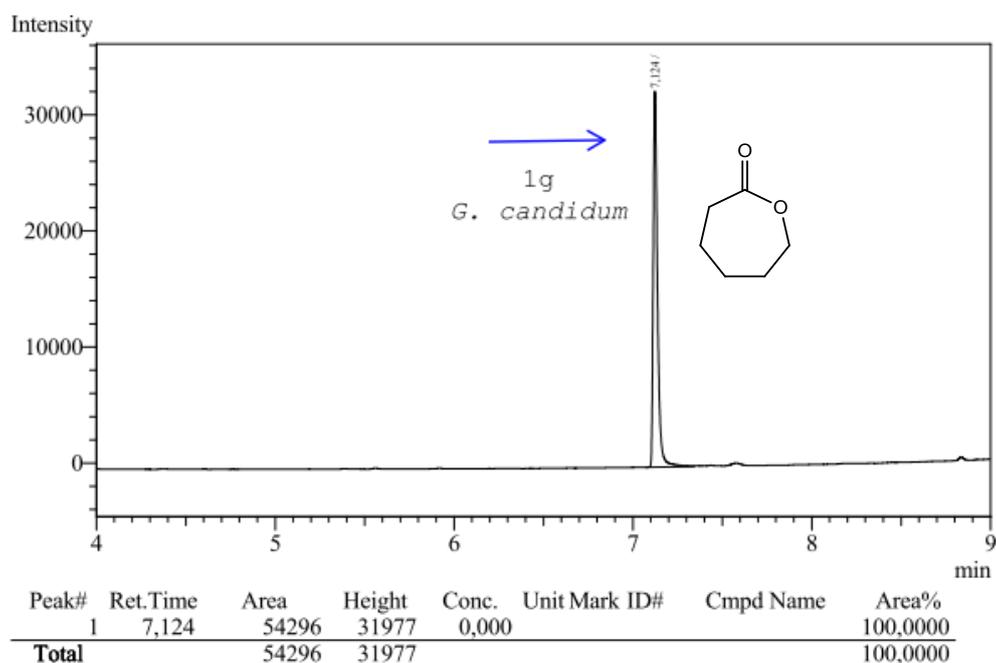
**Figura 49B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona com células livres de *G. candidum* após 3,5 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5).



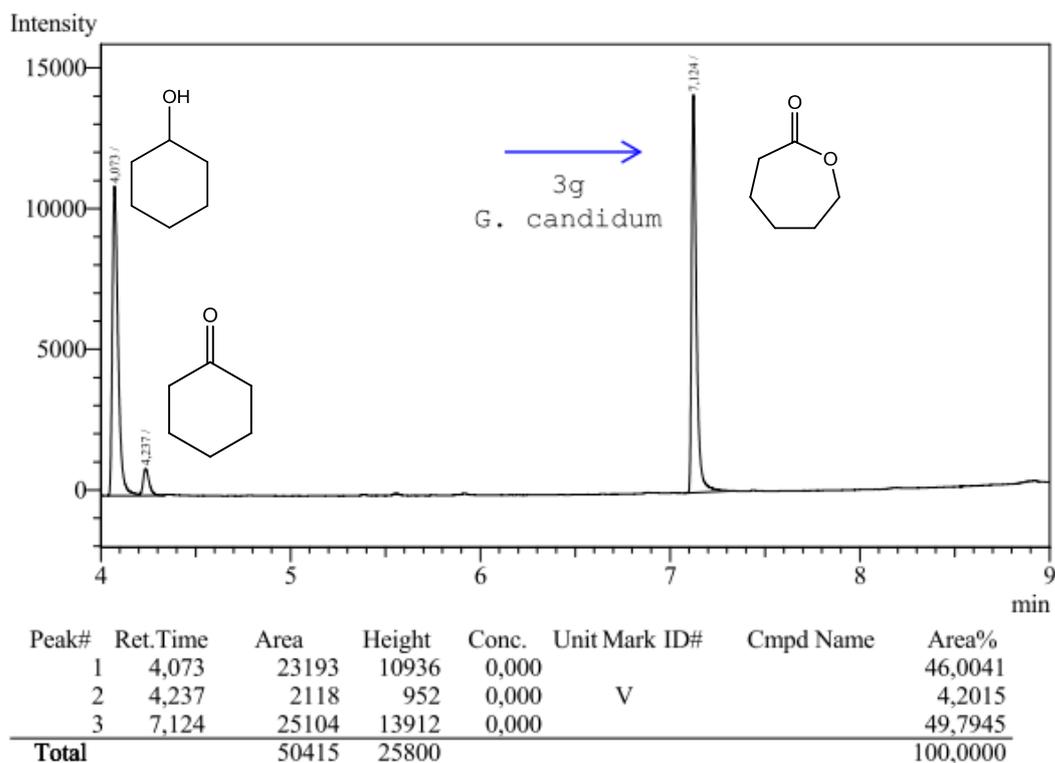
**Figura 50B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona com células livres de *G. candidum* após 4 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna RTX-5).



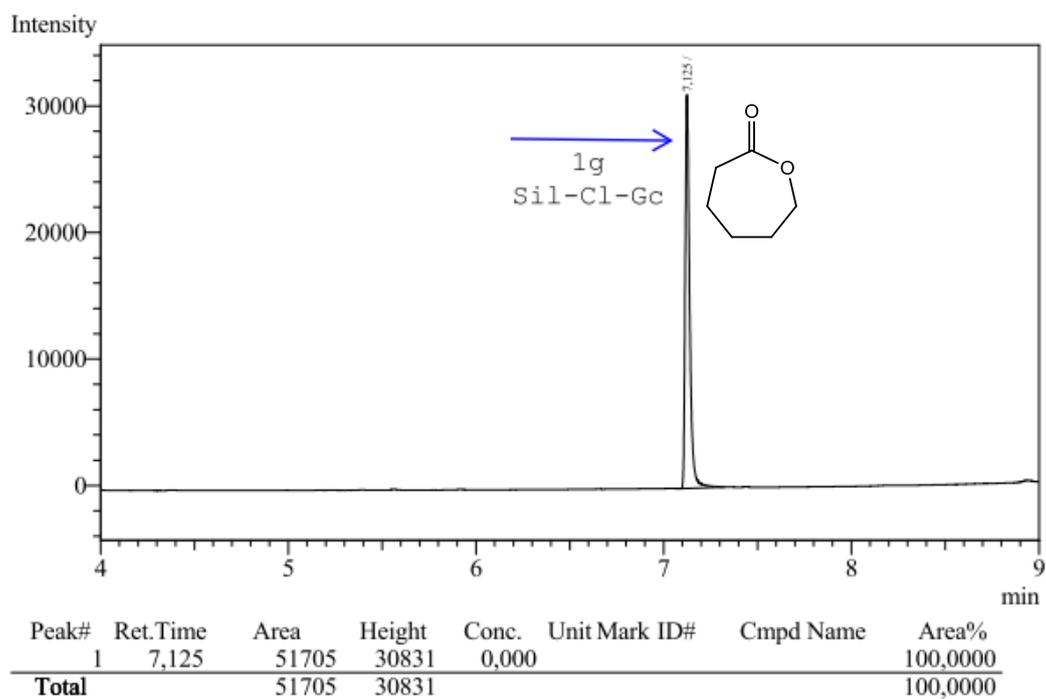
**Figura 51B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona a caprolactona com 1g de células livres de *G. candidum*. Obtido por cromatografia gasosa GC-FID (coluna DB-5MS).



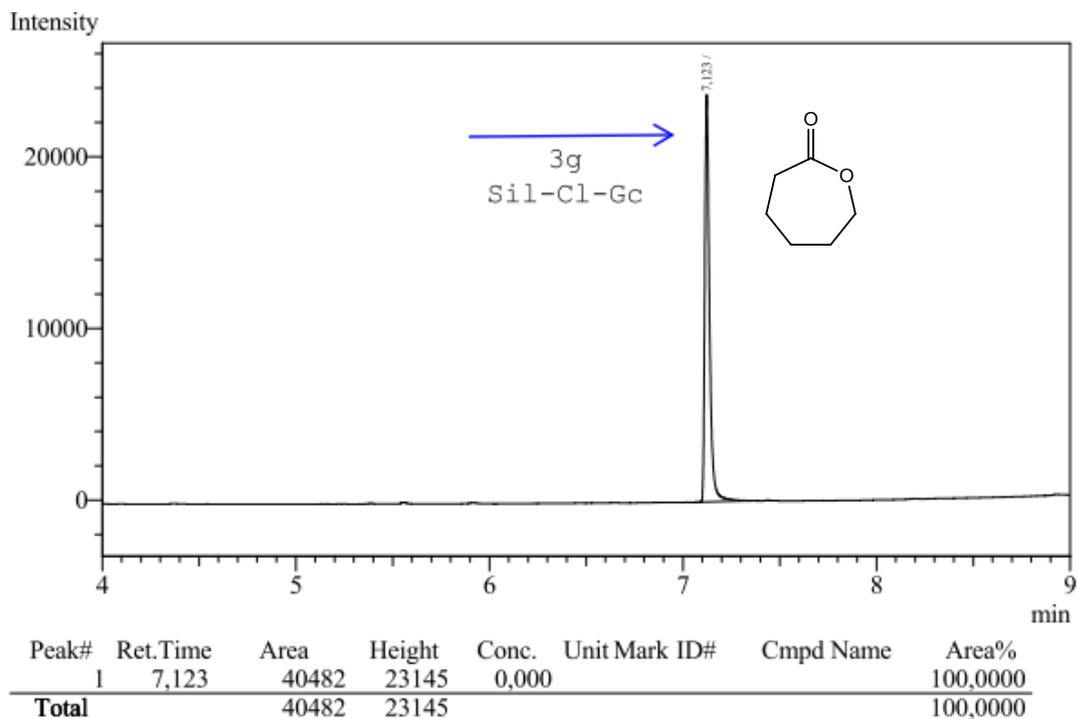
**Figura 52B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona a caprolactona com 3g de células livres de *G. candidum*. Obtido por cromatografia gasosa.



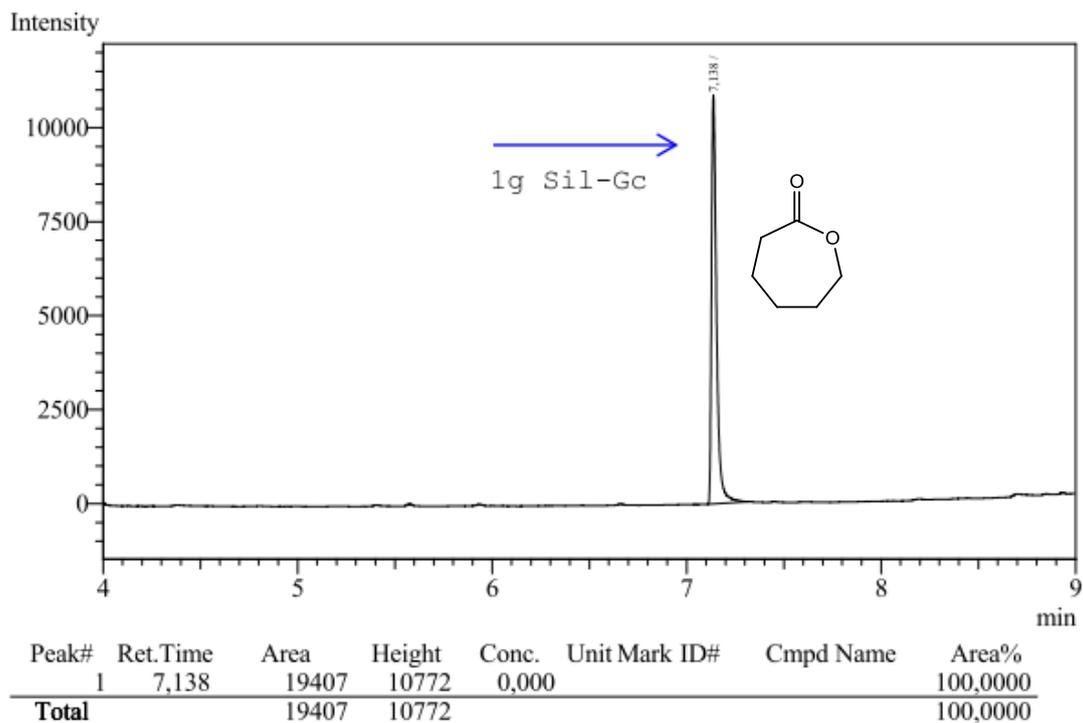
**Figura 53B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona a caprolactona com 1g de células de *G. candidum* imobilizada em  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$ . Obtido por cromatografia gasosa (coluna DB-5MS).



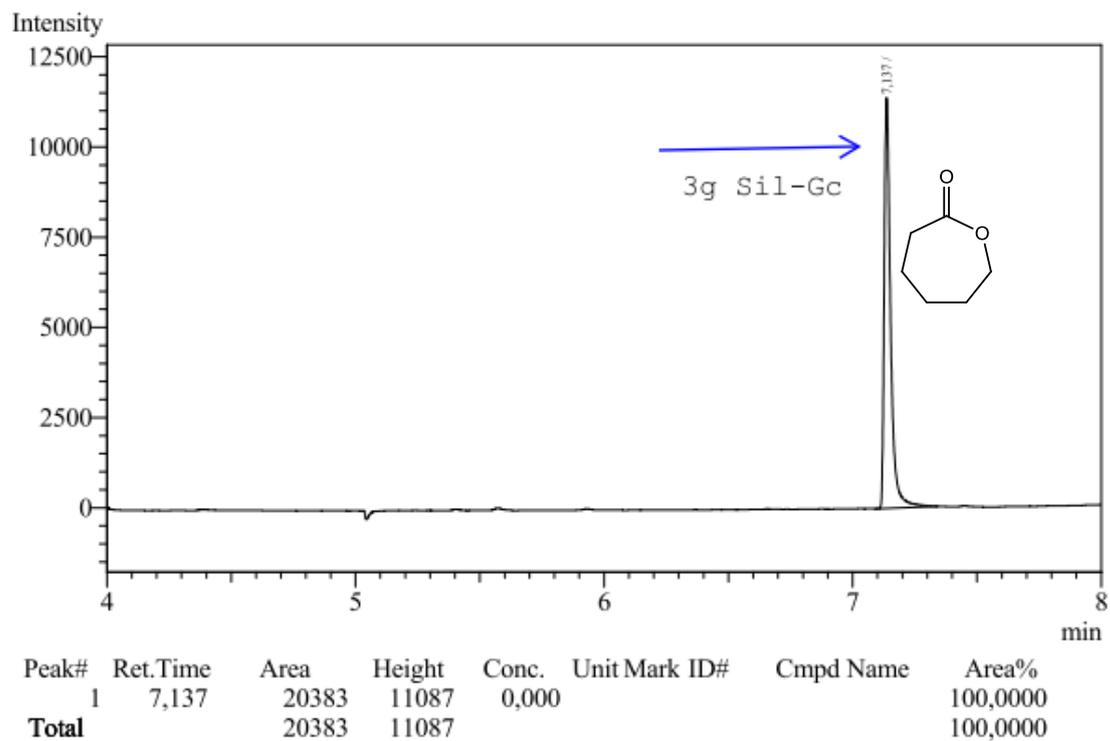
**Figura 55B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona a caprolactona com 3g de células de *G. candidum* imobilizada em  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$  ( $\text{SiO}_2\text{-Cl-Gc}$ ). Obtido por cromatografia gasosa (coluna DB-5MS)



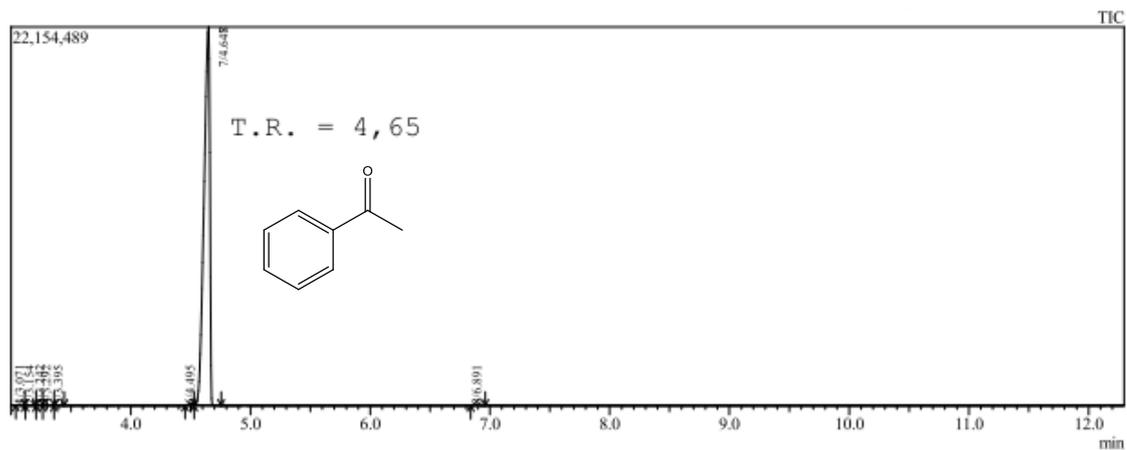
**Figura 54B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona a caprolactona com 1g de células de *G. candidum* imobilizada em Sílica pura ( $\text{SiO}_2\text{-Gc}$ ). Obtido por cromatografia gasosa (coluna DB-5MS).



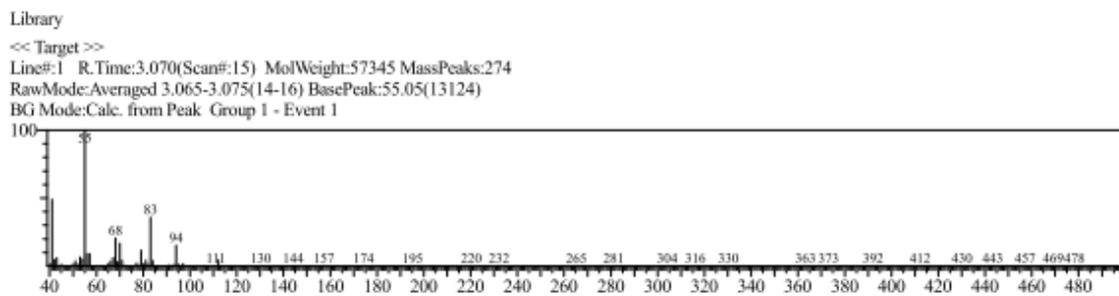
**Figura 56B** - Biotransformação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona a caprolactona com 3g de células de *G. candidum* imobilizada em Sílica pura (SiO<sub>2</sub>-Gc). Obtido por cromatografia gasosa (coluna DB-5MS).



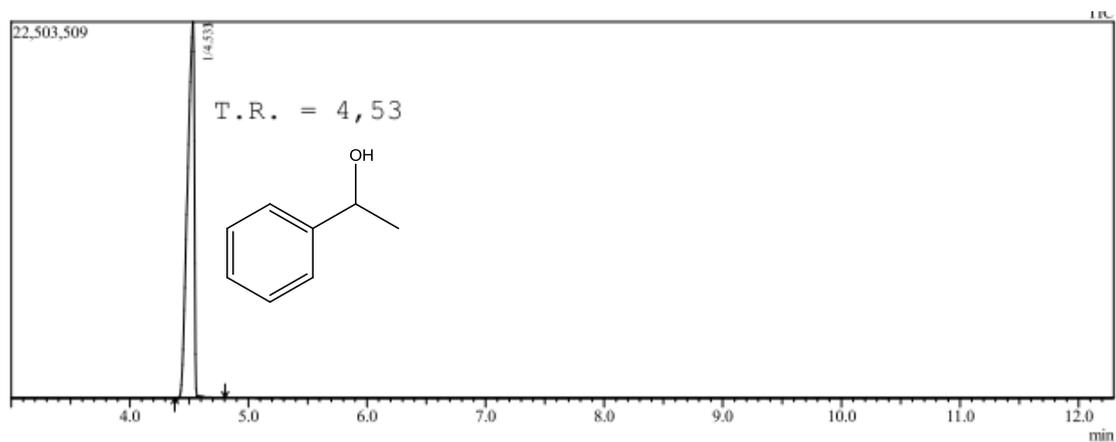
**Figura 57B** - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS) de uma amostra padrão de acetofenona.



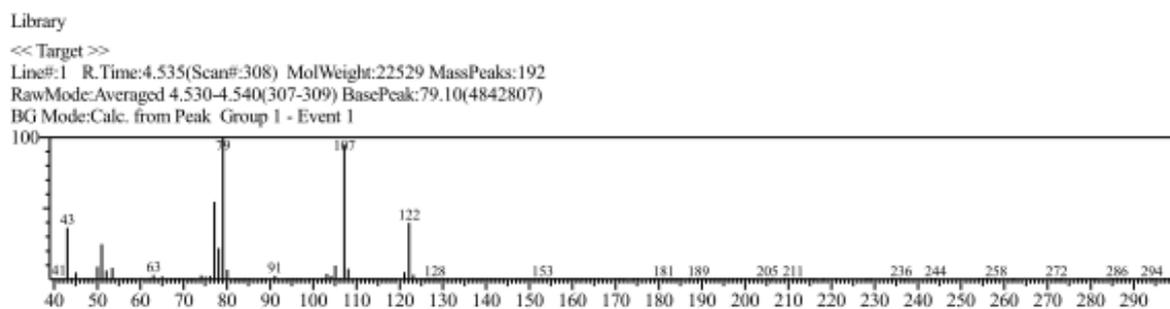
**Figura 58B** - Espectro de massa obtido de uma amostra padrão de acetofenona.



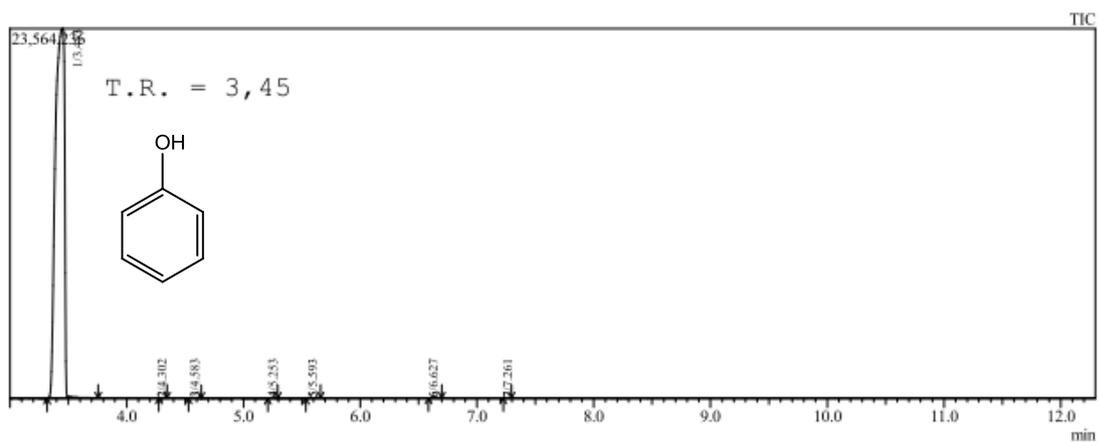
**Figura 59B** - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS) de uma amostra padrão de 1-feniletanol.



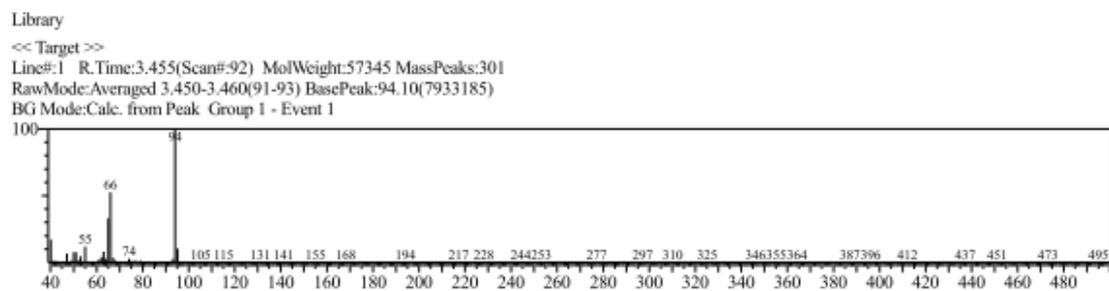
**Figura 60B** - Espectro de massa obtido de uma amostra padrão de 1-feniletanol.



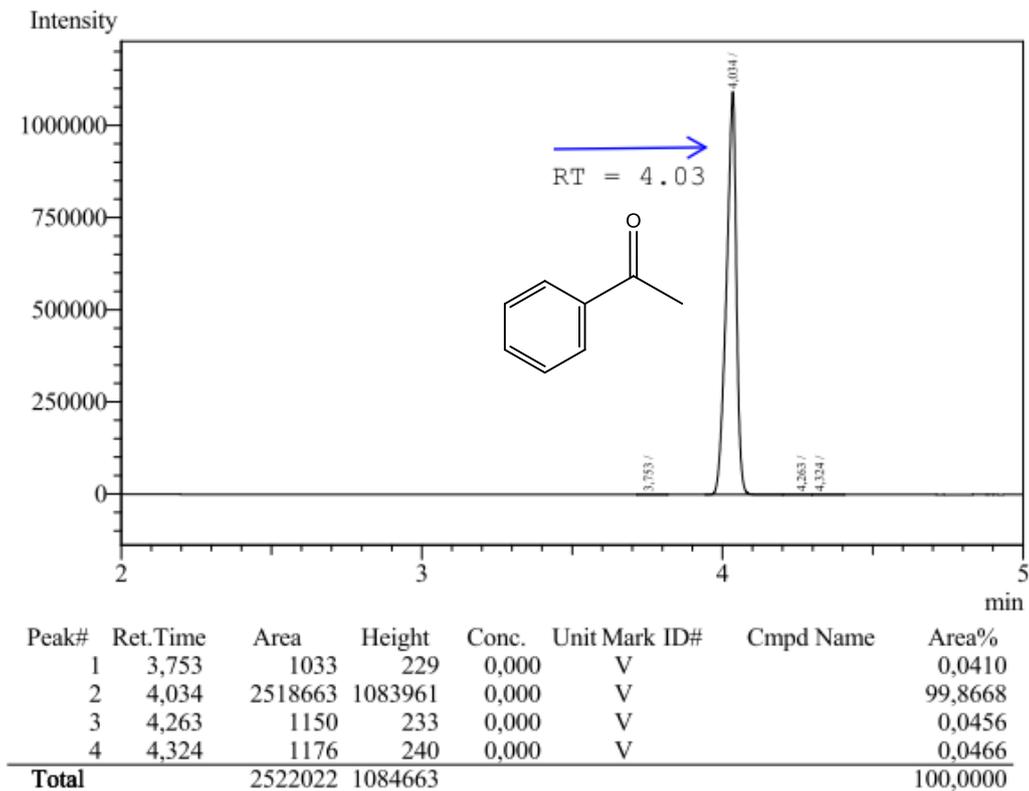
**Figura 61B** - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS) de uma amostra padrão de 1-fenol.



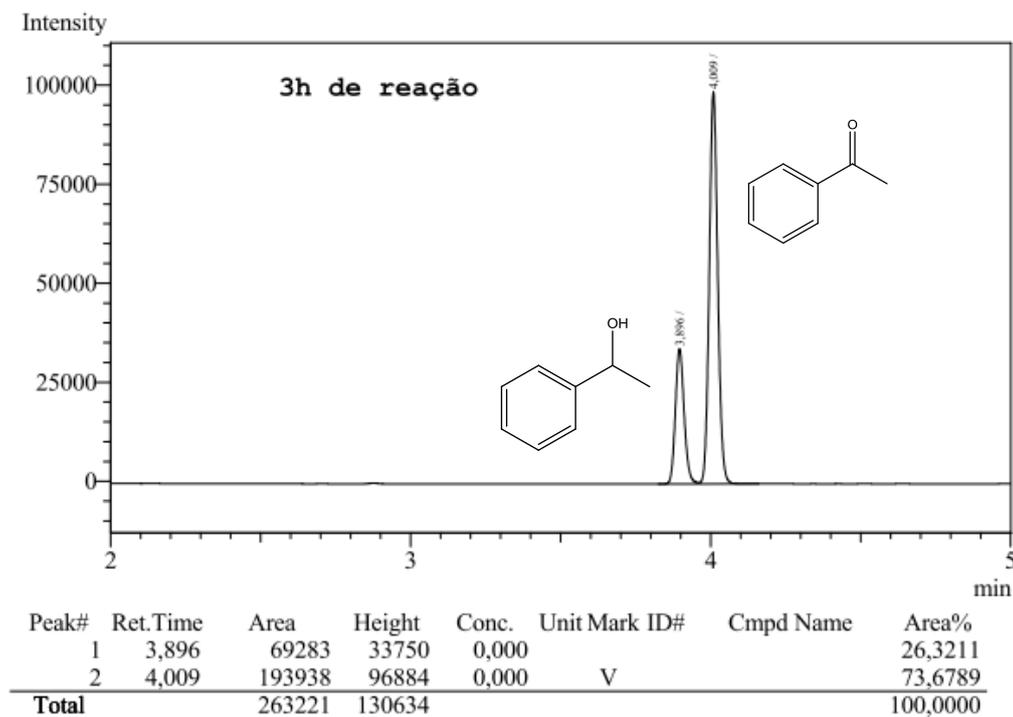
**Figura 62B** - Espectro de massa obtido de uma amostra padrão de fenol.



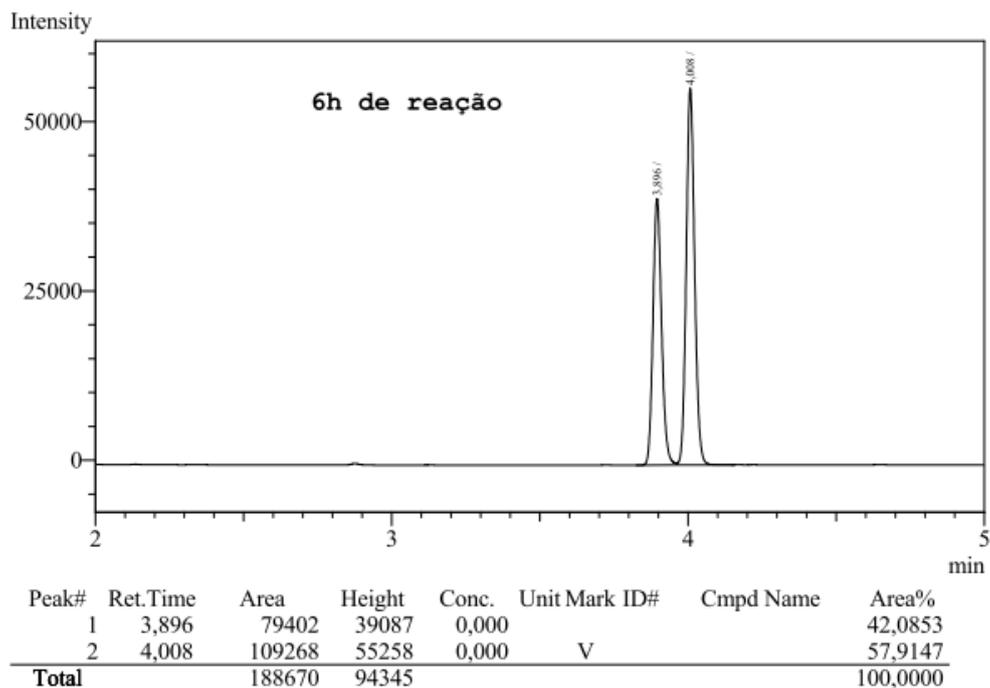
**Figura 64B** - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG-FID) de uma amostra padrão de acetofenona.



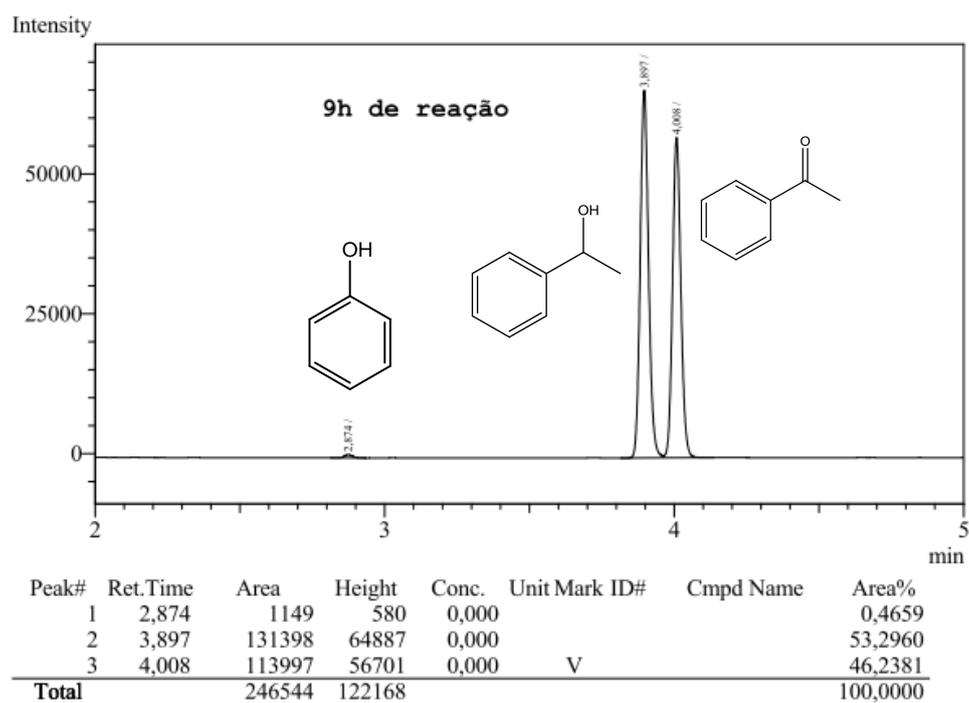
**Figura 63B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 3 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa.



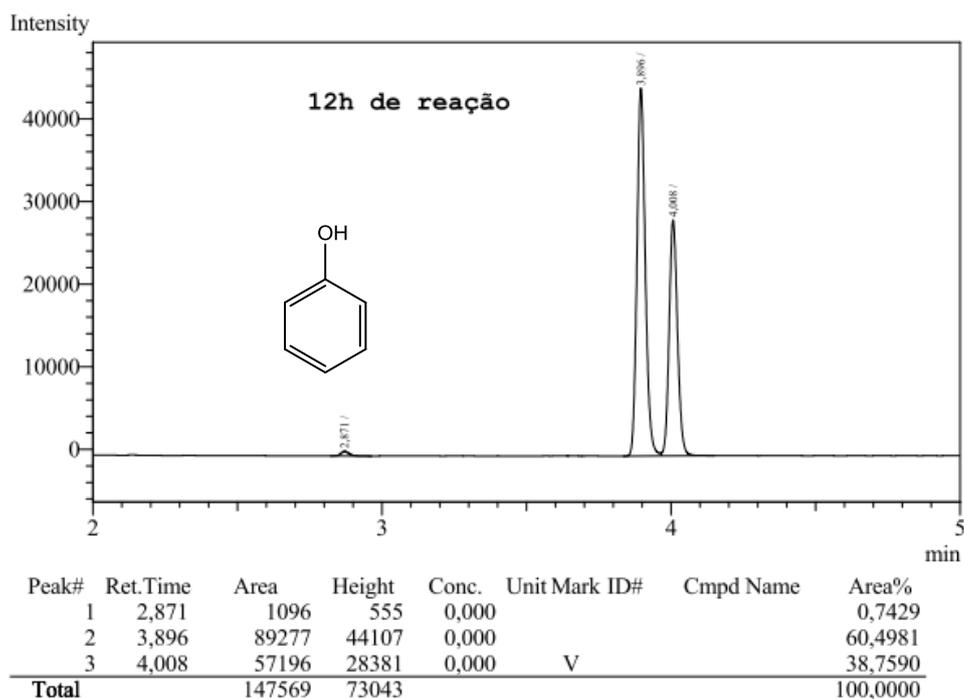
**Figura 65B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 6 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa.



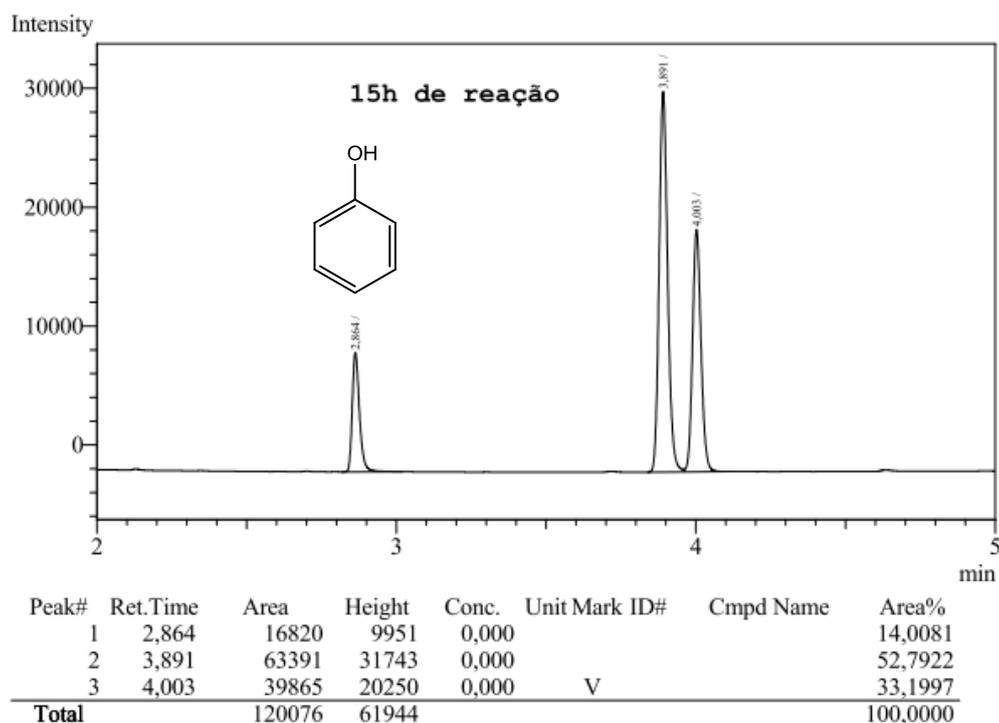
**Figura 66B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 9 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa.



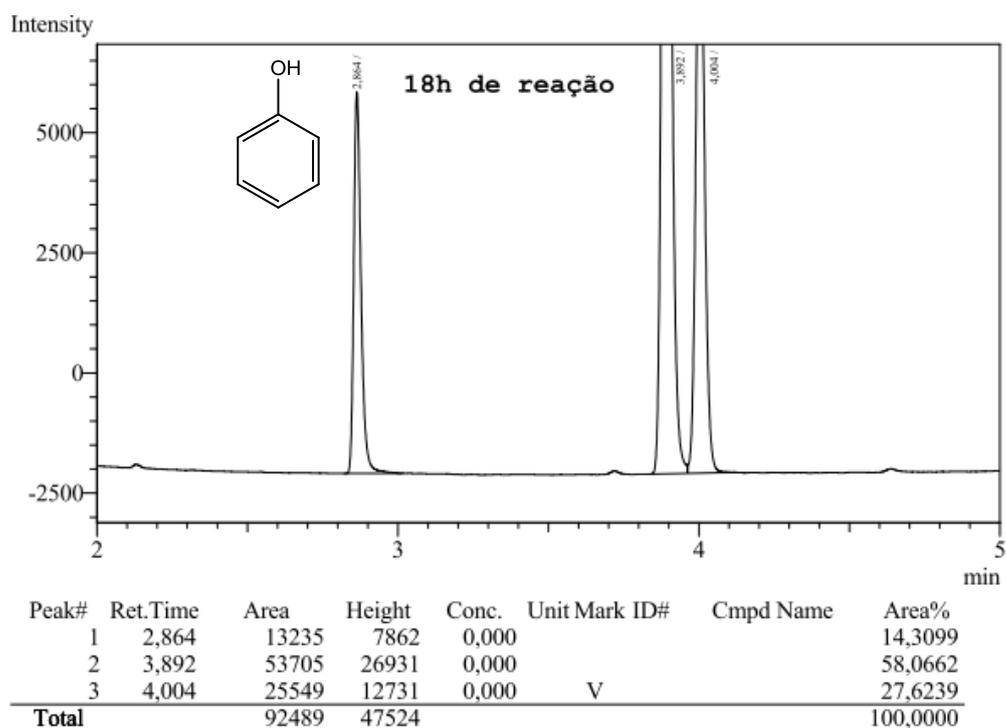
**Figura 67B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 12 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa.



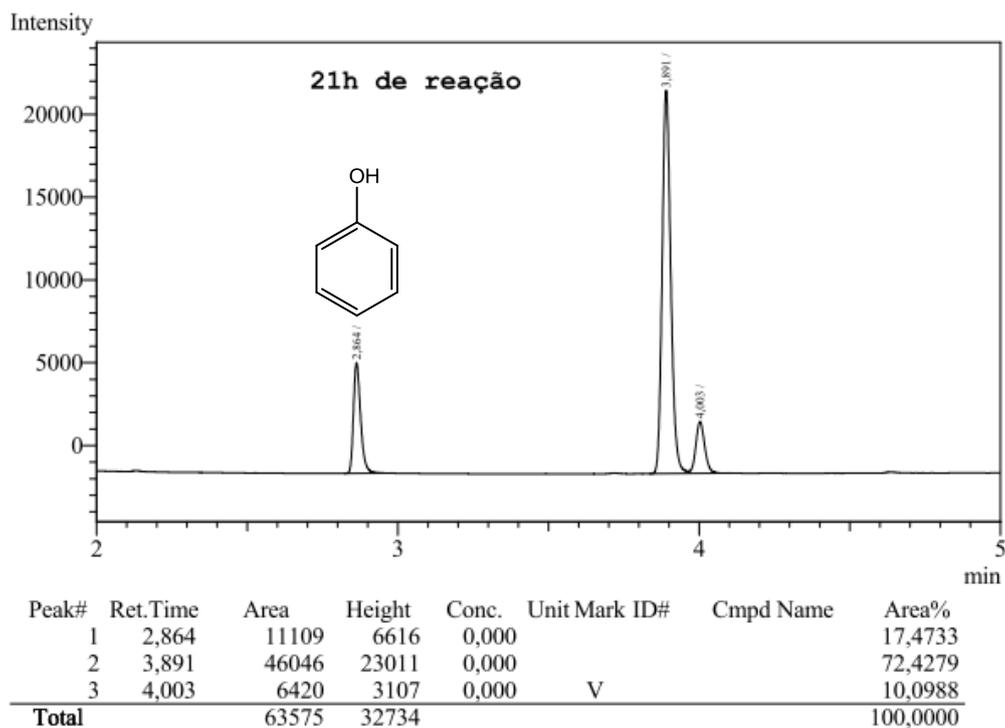
**Figura 68B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 15 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa.



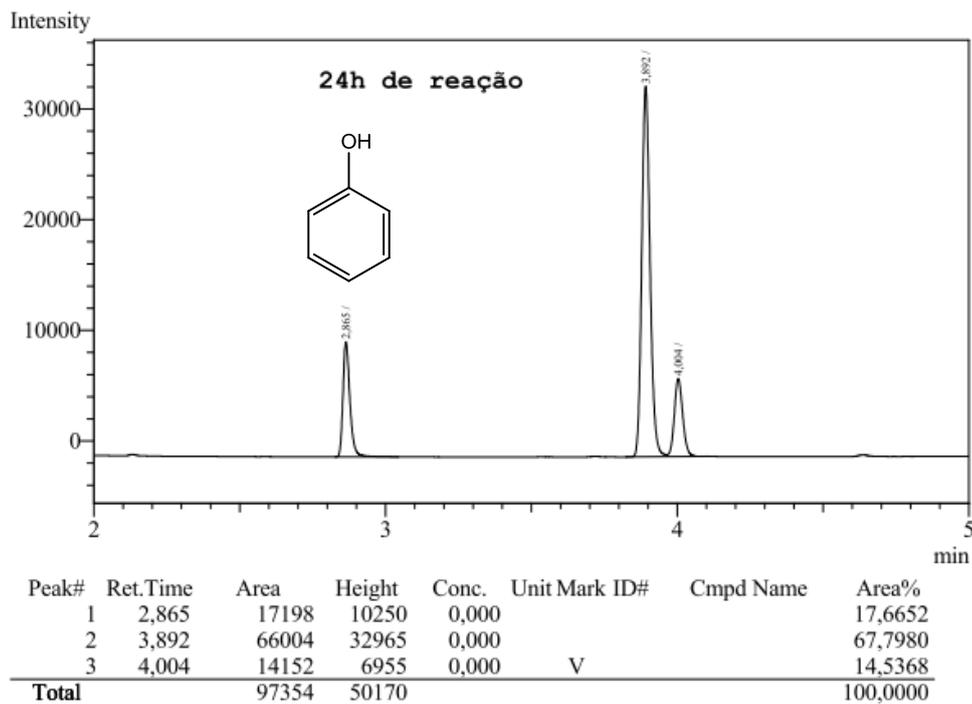
**Figura 69B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 18 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa.



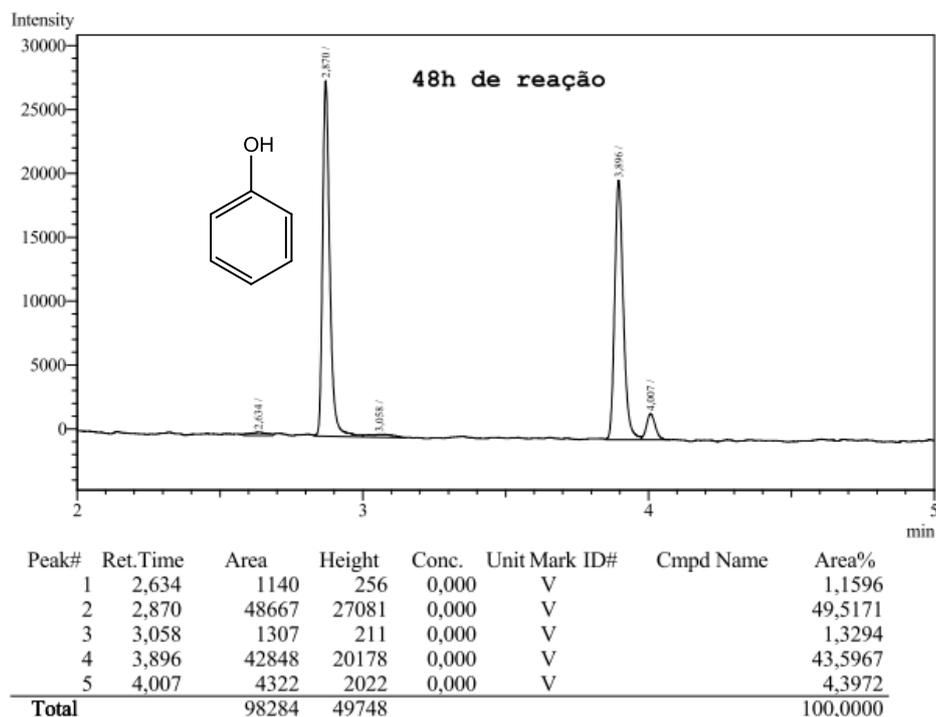
**Figura 70B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 21 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa.



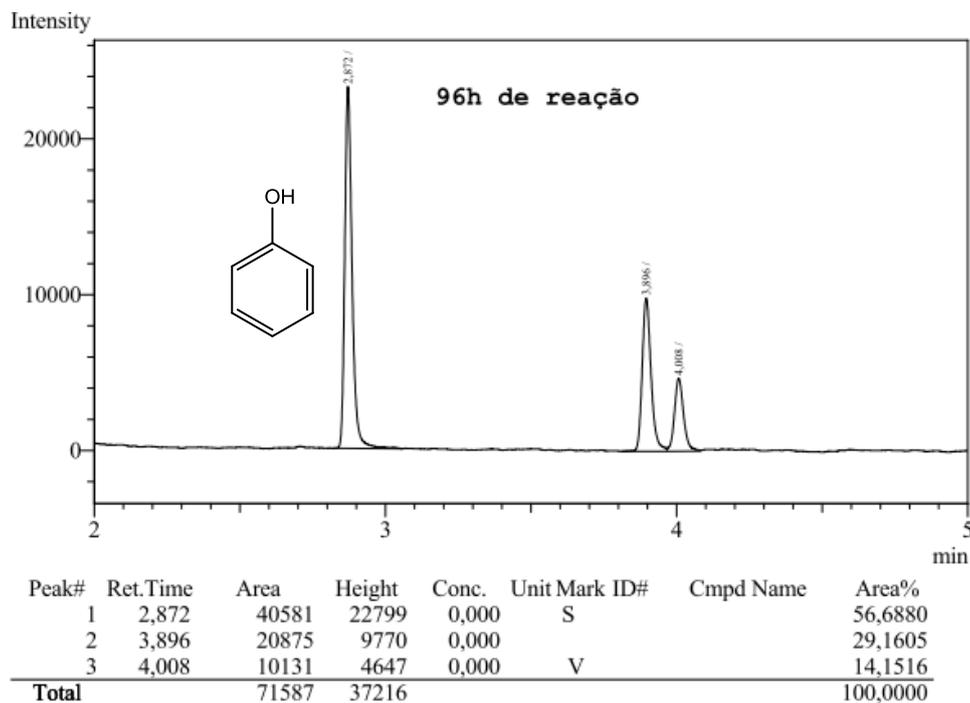
**Figura 71B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 24 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa.



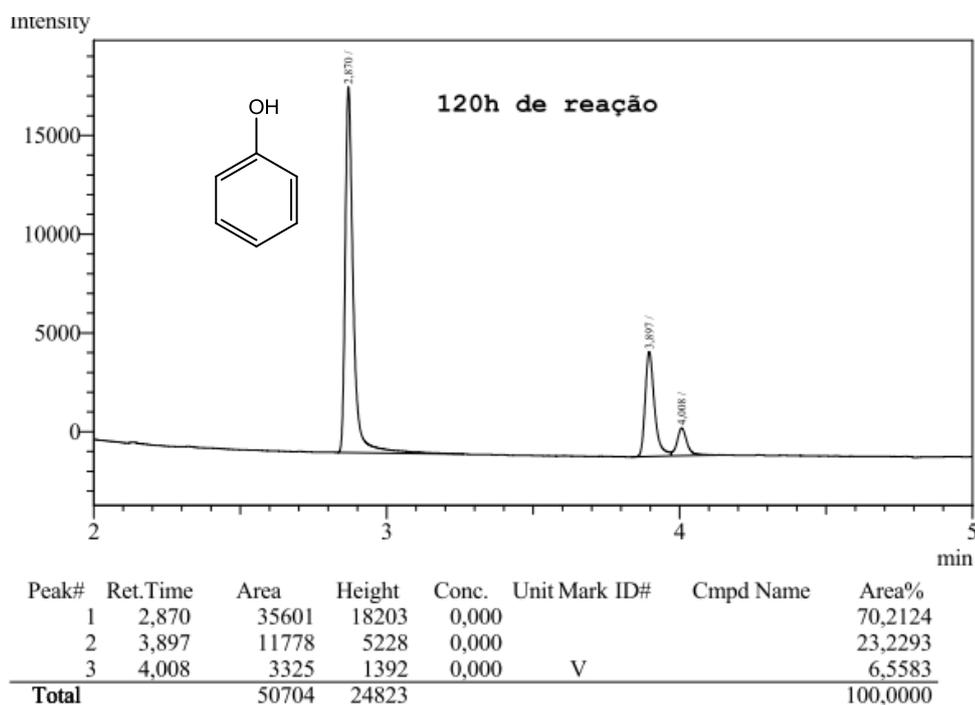
**Figura 72B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 48 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa (CG-FID).



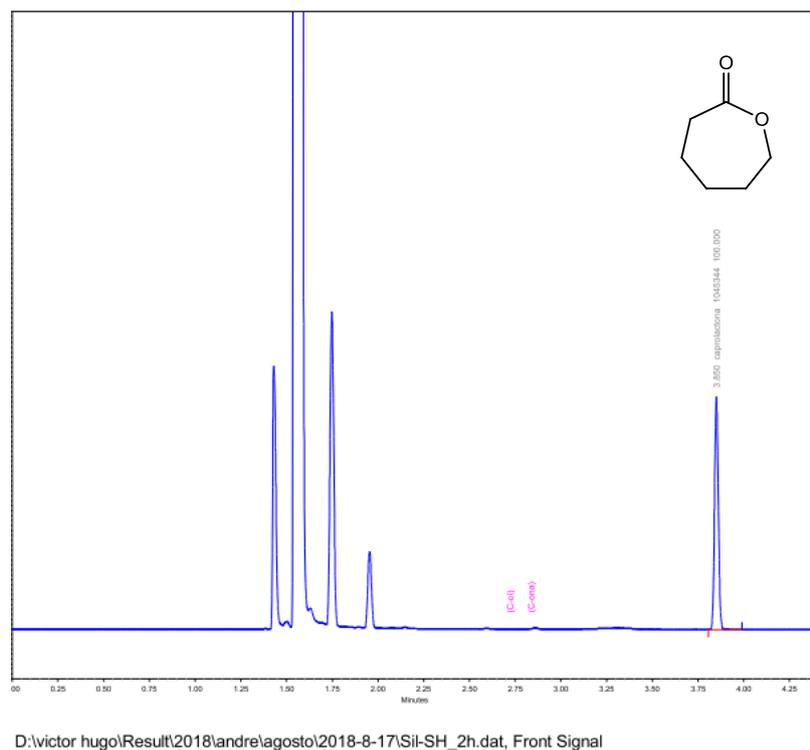
**Figura 73B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 96 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa.



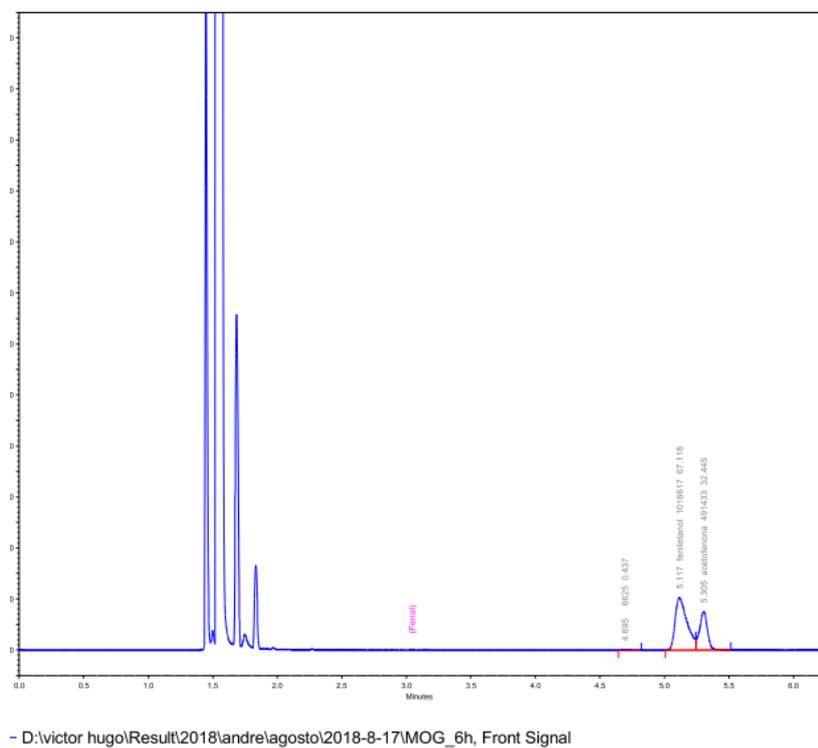
**Figura 74B** - Biotransformação da acetofenona via 1 g de *G. candidum* livre (sem adição de glicose) após 120 horas de reação. Obtido por cromatografia gasosa.



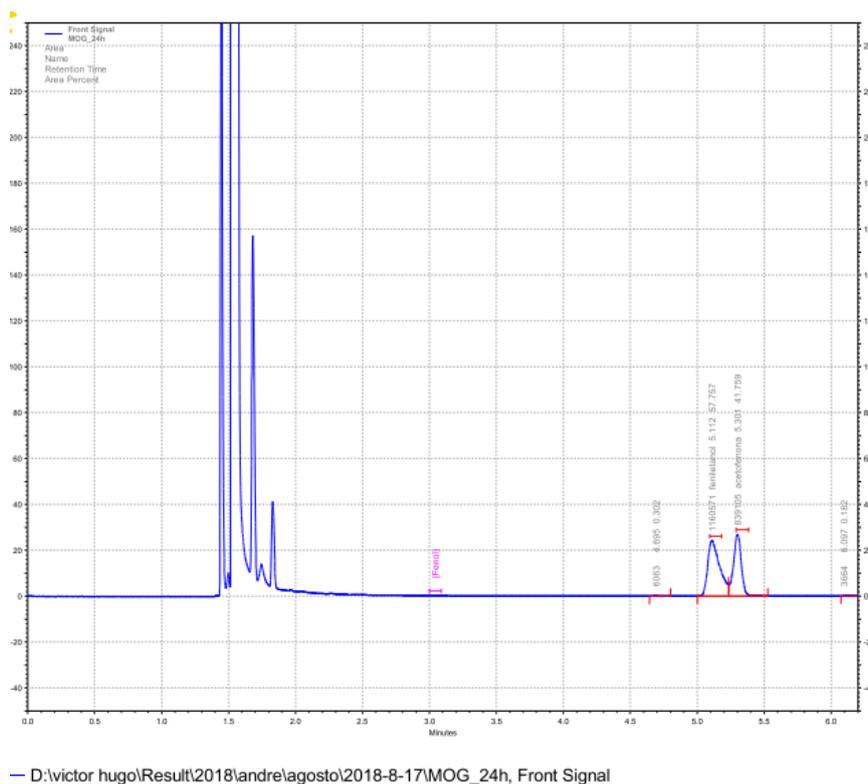
**Figura 75B** - Biotransformação da ciclohexanona via 1 g de *G. candidum* imobilizada no suporte  $\text{SiO}_2\text{-SH}$  após duas horas de reação obtido por CG-FID.



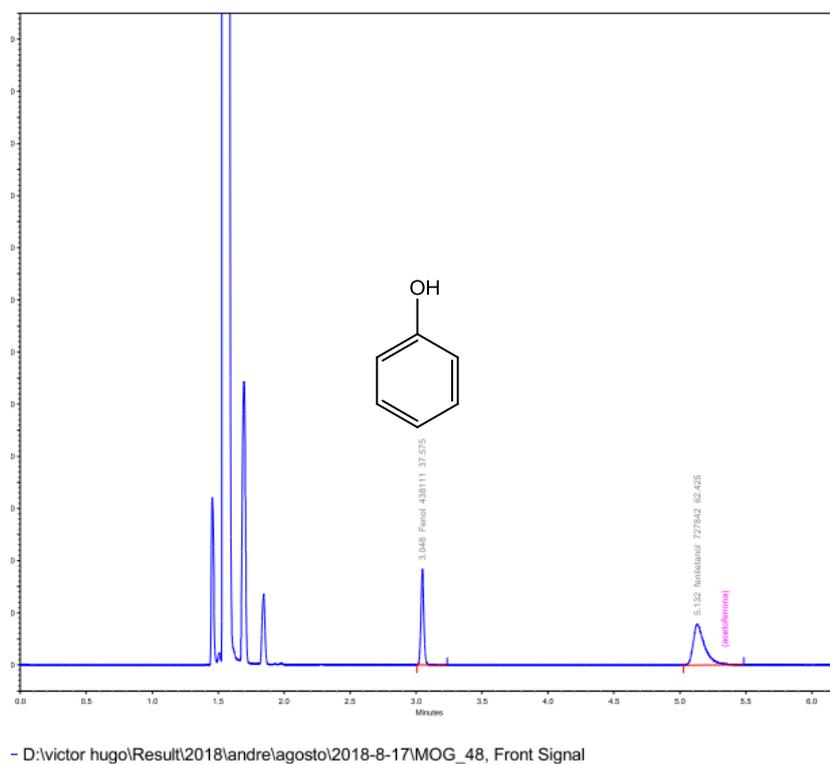
**Figura 76B** – Biotransformação da acetofenona com células de *G. candidum* livres com adição de glicose (6 horas de reação).



**Figura 77B** - Biotransformação da acetofenona com células de *G. candidum* livres com adição de glicose (24 horas de reação).

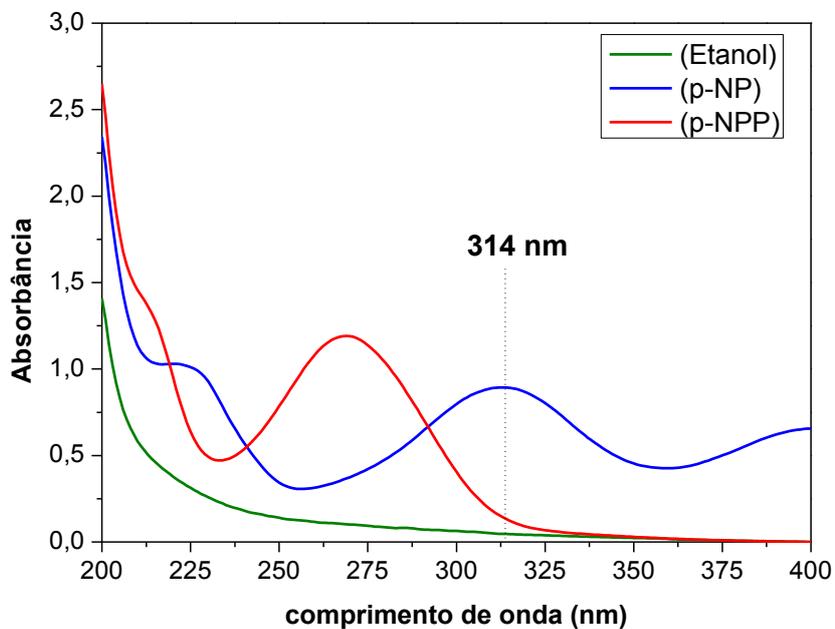


**Figura 78B** - Biotransformação da acetofenona com células de *G. candidum* livres com adição de glicose (48 horas de reação).

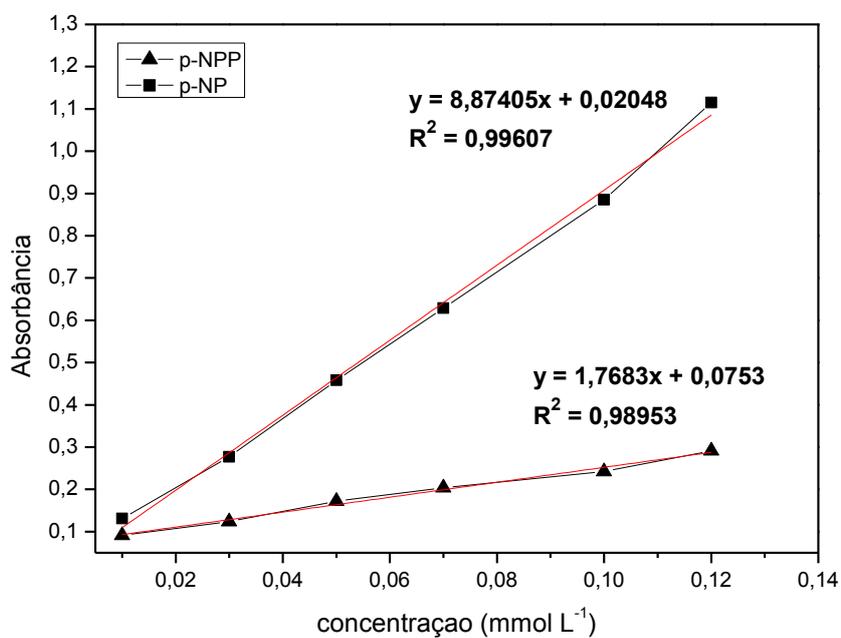


### Apêndice C

**Figura 79C** - Espectros UV obtidos para amostras de p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) e p-nitrofenol (p-NP) em meio etanólico e etanol (95%) na faixa de 400-200 nm.

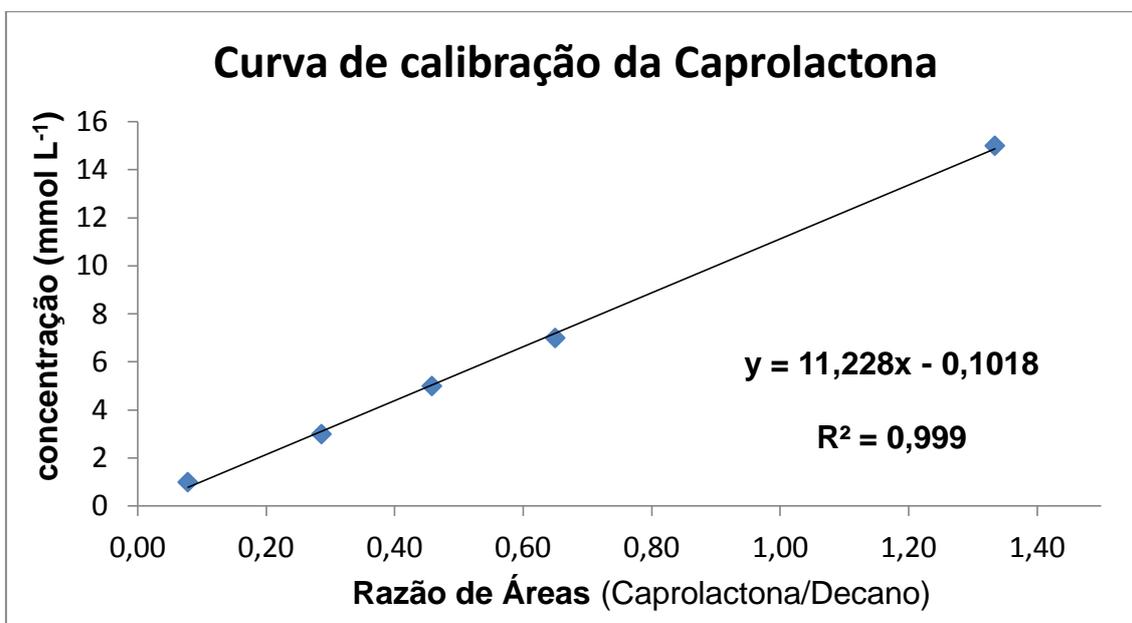


**Figura 80C** - Curvas de calibração obtidas para o p-NPP e p-NP em meio etanólico.



### Apêndice C

**Figura 81C** - Curva de calibração interna obtida para Caprolactona. Decano foi usado como padrão interno.

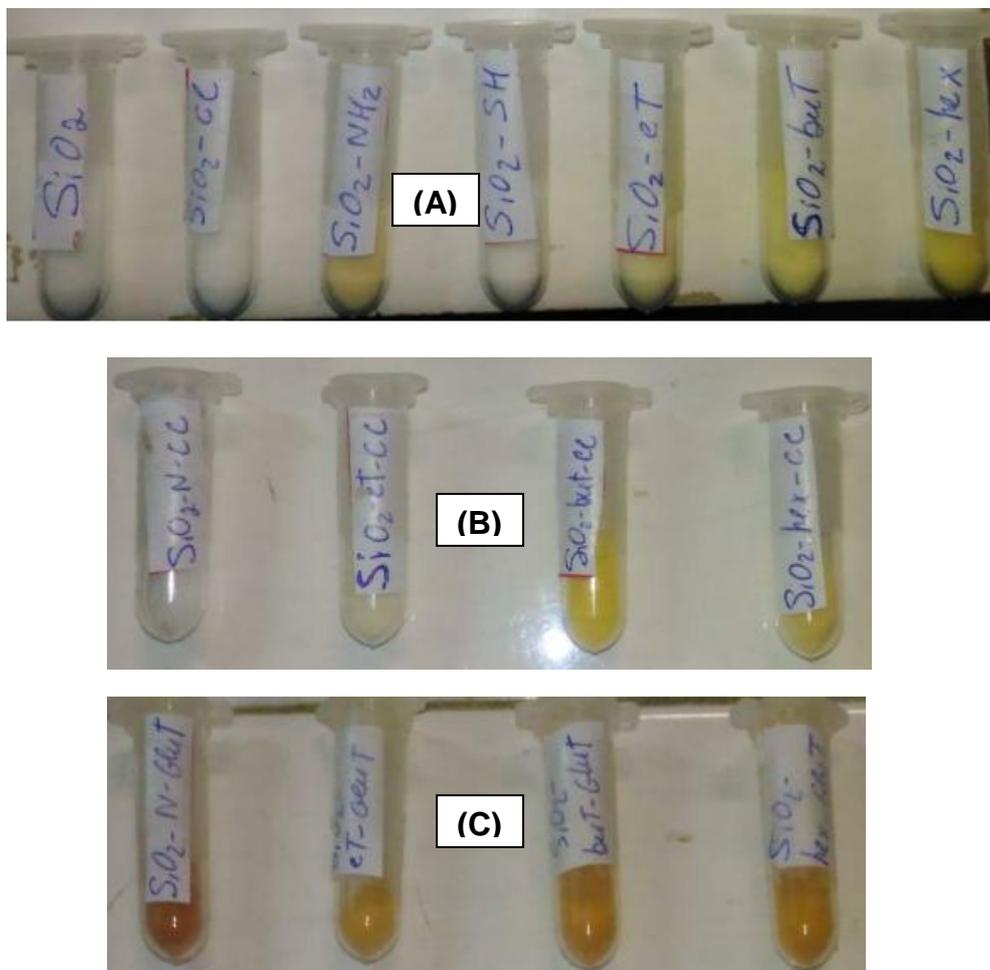


**Tabela 6** - Resultado das injeções dos padrões no GC-FID. Condições cromatográficas: coluna capilar DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), N<sub>2</sub> como gás de arraste (1mL/min); gradiente 60°C (1min), 100°C (35°C/min), 150°C (25°C/min) e 240°C (45°C/min).

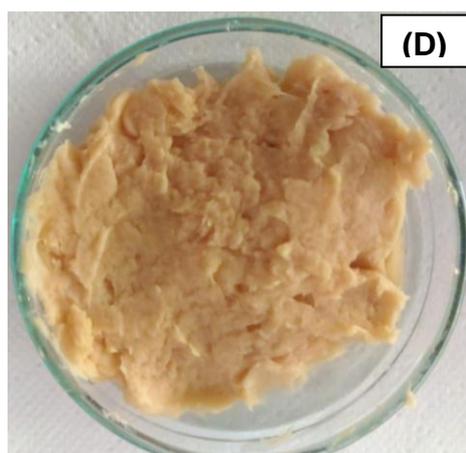
Padrão (mmol L <sup>-1</sup> )	Área padrão	Área padrão interno	Razão entre Áreas
1,0	13699	175787	0,08
3,0	45445	158850	0,29
5,0	82318	179742	0,46
7,0	112050	172414	0,65
15,0	247990	185851	1,33

## Apêndice D

**Figura 82D** - Imagens dos sólidos obtidos na preparação dos suportes (da esquerda para a direita): (A)  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Cl}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ,  $\text{SiO}_2\text{-SH}$ ; (B)  $\text{SiO}_2\text{-N-CC}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-et-CC}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but-CC}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-hex-CC}$ ; (C)  $\text{SiO}_2\text{-N-Glut}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-et-Glut}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-but-Glut}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-hex-Glut}$ .



**Figura 83D** - Imagens dos biocatalisadores utilizados na imobilização e biocatálise: biomassa celular de *G. candidum* CCT 1205 (D), lipase BCL (E).



# ANEXOS

## RESEARCH ARTICLE



## Rapid conversion of cyclohexenone, cyclohexanone and cyclohexanol to $\epsilon$ -caprolactone by whole cells of *Geotrichum candidum* CCT 1205

André L. Patrício Silva, Poliane K. Batista, Augusto D. Filho, Claudionor S. do Nascimento Junior, Julio S. Rebouças and Juliana A. Vale

Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

**ABSTRACT**

$\epsilon$ -Caprolactone ( $\epsilon$ -CL) was obtained with excellent conversion and short reaction times from the substrates cyclohexenone, cyclohexanone and cyclohexanol using whole cells of Brazilian *Geotrichum candidum* (CCT 1205). The reactions were monitored over time by gas chromatography, and the intermediates of the one-pot cascade biotransformation involving reductions of C=C and C=O bonds as well as the Baeyer–Villiger oxidation were identified and quantified. The Baeyer–Villiger monooxygenase (BVMO) enzyme was predominant, and all three substrates were completely converted into  $\epsilon$ -CL. Furthermore, the whole cells of *Geotrichum candidum* were recycled and reutilized in the biotransformation of cyclohexanone, producing  $\epsilon$ -CL at least six consecutive times without a significant loss of activity, reaction yields or product purity.

**ARTICLE HISTORY**

Received 16 August 2016  
 Revised 26 December 2016  
 Accepted 16 February 2017

**KEYWORDS**

Biotransformation;  
 Baeyer–Villiger monooxygenase;  $\epsilon$ -caprolactone;  
*Geotrichum candidum* and  
 cascade reaction

**Introduction**

The oxidation of ketones through the Baeyer–Villiger reaction is of extreme importance in chemical synthesis (Punniyamurthy et al. 2005) and industrial processes (Leisch et al. 2011). For example, the industrial oxidation of cyclohexanone produces the  $\epsilon$ -caprolactone ( $\epsilon$ -CL) monomer, which is used in the manufacture of poly-caprolactone, a polymer that is used in the manufacture of adhesives, dyes and compounds used for environmental protection and medical purposes due to its biocompatibility, non-toxicity and biodegradability (Weissermel and Arpe 2003).

The high interest in this reaction is due to its high chemo-, stereo- and enantioselectivity control (Brink et al. 2004). The most studied chemical method for the oxidation of ketones uses peracids, particularly *m*-chloroperbenzoic acid (Hussain et al. 2014; Yachnin et al. 2014); however, a search for safer, more selective and environmentally friendly methods is underway. Biotransformation has emerged as an alternative and efficient method for the synthesis of lactones and esters by transformation from different substrates by the Baeyer–Villiger monooxygenases (BVMOs), which are found mainly in several microorganisms (Ratuš et al. 2009). BVMOs are known as flavoenzymes and require NADPH for their activity (Mihovilovic et al. 2006; Cuetos et al. 2012).

Carballeira et al. (2002) achieved good results in a 72-hour reaction by applying growing and immobilized cells of *Geotrichum candidum* NCYC49 for the production of  $\epsilon$ -CL from cyclohexanone. In a similar experiment, Mandal et al. (2002) applied whole cells of *Fusarium* sp. and obtained quantitative yields of  $\epsilon$ -CL (30% wet weight) after 48 hours of reaction.

Starting from cyclohexanol as a substrate,  $\epsilon$ -CL is obtained by two combined biocatalytic oxidation steps. The first step involves the catalytic alcohol dehydrogenase (ADH) enzyme and provides an intermediary cyclohexanone, while the NADP<sup>+</sup> cofactor (oxidized form) is converted to NADPH (reduced form). In a second oxidation reaction, cyclohexanone is then transformed *in situ* to yield  $\epsilon$ -CL by nucleophilic oxygenation in the presence of BVMO and NADPH (Mallin et al. 2013).

Staudt et al. (2013), using an ADH from *Lactobacillus kefir* and BVMO from *Acinetobacter calcoaceticus*, with both enzymes recombinantly overexpressed in *E. coli*, showed that the desired product,  $\epsilon$ -CL, was obtained with greater than 94% conversion when operating at a cyclohexanol concentration in the range of 20–60 mM.

With enone substrates, reduction of the C=C double bond catalysed by enoate reductase in the presence of reduced nicotinamide cofactor NADPH was