



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – BACHARELADO

Kelly Teotonio de Sousa

**Aplicação de células de *Geotrichum candidum* na Reação de Baeyer-Villiger
em Acetofenona**

João Pessoa-PB

2025

Kelly Teotonio de Sousa

**Aplicação de células de *Geotrichum candidum* na Reação de Baeyer-Villiger
em Acetofenona**

Trabalho de Conclusão de Curso, requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química, submetido ao Curso de Graduação em Química – Bacharelado, da Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Alves Vale

João Pessoa-PB

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S725a Sousa, Kelly Teotonio de.

Aplicação de células de *Geotrichum candidum* na
Reação de Baeyer-Villiger em Acetofenona / Kelly
Teotonio de Sousa. - João Pessoa, 2025.
31 p. : il.

Orientação: Juliana Alves Vale.

TCC (Curso de Bacharelado em Química) - UFPB/CCEN.

1. Biocatálise. 2. *Geotrichum candidum*. 3.
Acetofenona. I. Vale, Juliana Alves. II. Título.

UFPB/CCEN

CDU 57(043.2)

Kelly Teotonio de Sousa

**Aplicação de células de *Geotrichum candidum* na Reação de Baeyer-Villiger
em Acetofenona**

Trabalho de Conclusão de Curso, requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química, submetido ao Curso de Graduação em Química – Bacharelado, da Universidade Federal da Paraíba.

Data de aprovação: __/__/____

Documento assinado digitalmente
 JULIANA ALVES VALE
Data: 04/06/2025 20:26:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Juliana Alves Vale (Presidente/Orientador)

Documento assinado digitalmente
 DAYSE DAS NEVES MOREIRA
Data: 05/06/2025 09:52:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Dayse das Neves Moreira (UFPB)

Documento assinado digitalmente
 RENATA RODRIGUES MAGALHAES
Data: 04/06/2025 16:57:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Renata Rodrigues Magalhães (Pós-graduação - UFPB)

Documento assinado digitalmente
 PALOMA GOMES DE ABRANTES
Data: 04/06/2025 14:40:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Paloma Gomes de Abrantes (Pós-graduação - UFPB)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, por ter me permitido seguir esse longo caminho;

Gostaria de agradecer também à minha orientadora, professora Juliana, pela orientação e ensinamentos dados durante a escrita deste trabalho e pelas oportunidades que tive durante meu período de iniciação científica;

À banca, formada pela Profa. Dra. Dayse das Neves Moreira e alunas de pós-graduação Renata e a Paloma, por aceitarem fazer parte desse trabalho e pelos comentários que irão contribuir para ele;

Ao meu grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise, professores, alunos de pós-graduação e graduação que passaram durante todo meu período no laboratório do início do curso o momento;

Aos meus colegas de curso por terem andado comigo nessa jornada, sempre sendo companhia nas aulas de laboratório e nos desesperos dos trabalhos em grupo;

Aos docentes da UFPB, que contribuem compartilhando conhecimento e que tive privilégio de ser aluna em suas disciplinas;

À minha família: meu pai, minha mãe e meu irmão, por me darem muito suporte emocional (e acadêmico) durante toda minha caminhada durante esses 6 anos de curso. Também aos meus avós, tios e primos, que me apoiaram mesmo de longe;

Também agradeço às minhas amigas, que sempre me dão apoio.

RESUMO

Os processos biocatalíticos são extremamente importantes na obtenção de produtos químicos por baixo custo para processos de alto valor agregado. Além disso, a maioria dos processos de biotransformação são realizados utilizando materiais biodegradáveis sob condições normais de temperatura e pressão, mantendo um bom desempenho em reação em comparação com os métodos sintéticos tradicionais devido à sua alta especificidade e seletividade química. Este trabalho tem como objetivo estudar as características do fungo *Geotrichum candidum* CCT 1205 na reação de oxidação Baeyer-Villiger da acetofenona, controlando variáveis como quantidade de substrato e de biomassa. Na reação de oxidação de 20 µL de substrato de acetofenona, foi confirmada 95,8% de conversão de acetofenona em fenol por hidrólise em 2 g de material biológico úmido e 81,2% com 3 g após 36 horas de reação. O efeito da quantidade de substrato também é significativo, com 89% de fenol convertido em apenas 24 horas quando adicionado 20 µL de acetofenona em 2 g de biomassa, sendo assim a quantidade ideal de substrato a ser adicionada. As respostas à biomassa e concentração de substrato foram monitoradas por GC-FID. É através desses estudos que é possível compreender as propriedades do *Geotrichum candidum*, como suas condições ótimas em reação com acetofenonas para aplicação em trabalhos futuros com outros tipos de substratos.

Palavras-chave: Biocatálise. *Geotrichum candidum*. Acetofenona.

ABSTRACT

Biocatalytic processes are extremely important in obtaining low-cost chemical products for high value-added processes. In addition, most biotransformation processes are carried out using biodegradable materials under normal temperature and pressure conditions, maintaining good reaction performance compared to traditional synthetic methods due to their high specificity and chemical selectivity. This work aims to study the characteristics of the fungus *Geotrichum candidum* CCT 1205 in the Baeyer-Villiger oxidation reaction of acetophenone, controlling variables such as the volume of substrate and quantity of biomass. In the oxidation reaction of 20 μL of acetophenone substrate, 95.8% conversion of acetophenone to phenol was confirmed by hydrolysis in 2 g of wet biological material and 81.2% with 3 g after 36 hours of reaction. The effect of the volume of substrate was also significant, with 89% of phenol converted in just 24 hours when 20 μL of acetophenone was added to 2 g of biomass, making it the ideal amount of substrate to add. The quantity of biomass and substrate responses were monitored by GC-FID. It is through these studies that it is possible to understand the properties of *Geotrichum candidum*, such as its optimum conditions in reaction with acetophenones for application in future work with other types of substrates.

Keywords: Biocatalysis. *Geotrichum candidum*. Acetophenone.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Conversão de acetofenona em fenol com 2 gramas de biomassa.....	22
Gráfico 2 – Conversão de acetofenona em fenol com 3 gramas de biomassa.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo biológico de acoplamento enzima-substrato.....14

Figura 2 – Reação global de uma oxidação de Baeyer-Villiger.....16

Figura 3 - Esquema geral da biotransformação de acetofenona.....18

Figura 4 : Atuação das enzimas Baeyer-Villiger monooxigenase (BVMO) e Álcool desidrogenase (ADH) presentes nas células íntegras úmidas de *Geotrichum candidum* CCT 1205 na biotransformação de acetofenona.....23

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

VOCs - Compostos Orgânicos Voláteis

BVMO – *Bayer-Villiger monooxygenase*

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

YMA – Yeast Malt Agar

YM – Yeast Malt

LASOB - Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise (LASOB)

LEQA - Laboratório de Estudos em Química Ambiental

UNICAL - Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB

CG-FID – Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama

CCT - Coleção de Culturas Tropical

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1 Reações de Biotransformação.....	13
2.2 Enzimas em biocatálise.....	14
2.3 Uso de células íntegras.....	15
2.4 <i>Baeyer-Villiger monooxygenase</i> (BVMO).....	16
2.5 Acetofenona em Biocatálise.....	17
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Reagentes e equipamentos.....	19
4.2 Método de preparação e crescimento de microrganismos.....	19
4.2.1 Preparação de placas para crescimento microbiano.....	20
4.2.1.1 Preparação do meio de cultura sólido Yeast Malt Agar (YMA).....	20
4.2.1.2 Preparação do meio de cultura sólido Sabouraud.....	20
4.2.2 Crescimento do microrganismo em meio caldo YM (Yeast Malt).....	21
4.3 Preparação das soluções.....	21
4.4 Preparação das reações de oxidação de cetonas cíclicas em células íntegras de <i>Geotrichum candidum</i> CCT-1205.....	21
4.5 Análise por cromatografia gasosa.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1 Efeitos da quantidade de biomassa.....	22
5.2 Efeitos da quantidade de substrato.....	24
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A princípio, compostos com metais de transição como ouro e paládio foram introduzidos como catalisadores em reações de alto valor energético. No entanto, a maioria dessas reações utiliza substâncias tóxicas e, quando realizadas em larga escala, produzem resíduos tóxicos. Além da formação de resíduos, muitas reações também requerem condições específicas de reação, como alta temperatura e pressão, levando a um alto gasto de energia e resultando em um grave impacto ambiental (Egorova, 2016).

Portanto, foram estudados novos métodos para controle de formação de resíduos e diminuição do gasto de energia presente nesses processos. Um meio de quantificar o impacto ambiental é o *E factor* (*Environmental fator*, do inglês, Fator Ambiental), ou cálculo de Economia de Átomos. O cálculo desse fator de impacto ambiental é dado pela razão entre as massas totais dos resíduos formados durante todo o procedimento e a massa dos produtos. Estudos como este ajudaram a moldar o conceito de Química Verde (Sheldon, 2017).

O termo “*Química Verde*” é definido pelo método científico pensado para a criação de processos e produtos químicos que reduzem ou eliminam a geração de produtos químicos contaminantes, diminuindo o risco para a saúde humana e ao meio ambiente (Ahmad, 2017). Em geral, processos químicos que seguem a base da química verde são separados por três categorias, como os que utilizam fontes renováveis ou aproveitam material reciclado como matéria-prima; processos que tem como princípio a eficiência energética e diminuição considerável do uso de energia;

e por último, a prevenção do uso de substâncias tóxicas e bioacumulativas (Lenardão, 2003).

Além disso, para auxiliar pesquisadores e cientistas da área da química na elaboração de tecnologias sustentáveis, as características acima foram transformadas em doze princípios, que servem como um guia mais detalhado para desenvolvimento dessas metodologias. Entre os princípios, na questão de economia de energia por exemplo, podem ser destacados a busca pelo uso de catalisadores mais eficientes e realização de reação em condição de pressão e temperatura normais na questão de economia de energia (Kharissova et.al, 2019).

Outra importante característica é a prevenção do uso de substâncias tóxicas, que entre os princípios pode ser relacionada com a abstenção da adição de solventes tóxicos - e que por muitas vezes não são aproveitados em reação - e podem resultar em resíduos tóxicos, que são liberados em grande escala caso sejam parte de uma produção industrial. Esse é o caso do uso dos compostos orgânicos voláteis ou VOCs, solventes usados em produção de fármacos que geram grande quantidade de poluentes quando despejados na natureza, causando prejuízos ambientais e à saúde humana. Esse problema pode ser solucionado com o uso da água como solvente, um solvente tradicional com grande potencial para grande parte das substâncias existentes (Kar et al., 2022).

Por último, mais uma importante característica a ser desfragmentada é o reaproveitamento de material. A reciclagem também é um fator de economia de material e da diminuição considerável e prevenção de liberação de resíduos. Pode ser citada a preocupação com a síntese de polímeros, que vem associada com os detritos de plástico que tem um período de biodegradabilidade muito alto. Como consequência, há alta porcentagem desse tipo de produto acumulado sendo encontrado em todo o ecossistema. Algumas alternativas para a síntese desses produtos são o uso de carbonatos orgânicos e a reciclagem química de polímeros derivados da lignina (Sternberg; Sequerth; Pilla, 2021).

Dessa forma, pode-se afirmar a importância na orientação de químicos no desenvolvimento de técnicas que reduzem o impacto ambiental. Além disso, as instruções não se isolam entre si, podendo existir mais de um princípio envolvido em um só procedimento. Um exemplo são as reações de biotransformação usando catalisadores. Eles se destacam pela eficiência nas transformações químicas, ao reduzir os custos, aumentar a eficiência potencial, diminuir a exposição ambiental e

contribuir para a sustentabilidade geral dos métodos envolvidos no desenvolvimento da química verde. Conforme os 12 princípios da Química Verde, a biocatálise enzimática representa uma ferramenta promissora para o desenvolvimento e processamento de produtos (Kate et al., 2022).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Reações de Biotransformação

Visando substituir o método químico convencional de realizar reações orgânicas, a biocatálise possibilita a produção de materiais a partir de métodos ambientalmente apropriados. A biocatálise (ou biotransformação) é definida pela inserção de fragmentos de organismos vivos, principalmente por fungos e bactérias, como enzimas que podem ser apresentadas em sua forma isolada ou em forma de célula íntegra, preparadas a partir de células nativas ou na forma de proteínas hospedeiras, as quais atuarão como biocatalisadores (Truppo, 2017).

Os biocatalisadores são capazes de promover reações com alta seletividade, aumentando assim a quimio, regio e enantiosseletividade, o que facilita o acoplamento enzima-substrato, além de eliminar a possibilidade de muitas reações levarem à criação de produtos indesejados. Outra vantagem é a produção de enzimas a partir de fontes renováveis e de baixo custo, o que mostra sua boa reputação para sua versátil aplicação em indústrias (Hollmann, F. et al, 2018). As vantagens da biocatálise não são apenas químicas como também ambientais. As enzimas utilizadas nesses processos são adquiridas feitas de recursos renováveis que são baratos e biodegradáveis, atendendo aos princípios da química verde e do desenvolvimento sustentável (Bell et al., 2021).

As enzimas participam de um número expressivo de procedimentos químicos na indústria, como na produção de laticínios, papel, fármacos, detergentes,

biocombustíveis e de tecidos (Monteiro, 2019 e Gonçalves, 2018). Na indústria farmacêutica, a biocatálise torna-se uma interessante abordagem para a produção de moléculas quirais como aminoácidos, aminas e álcoois, fundamentais para a produção de produtos farmacêuticos e agroindustriais (Hauer et al., 2014).

Embora a biocatálise tenha suas vantagens, seu domínio em larga escala enfrenta desafios significativos. Os maiores obstáculos para utilização abrangente desta tecnologia são a falta de investimento, a necessidade de desenvolvimento tecnológico a longo prazo e o surgimento de profissionais bem treinados e com experiência na área, além da resistência de pesquisadores tradicionais ao uso de novos métodos de realização de reações orgânicas (Fielding, 2023). A baixa demanda de biocatálise também impacta países de menor investimento em pesquisa, como o Brasil, que dependem da importação de enzimas (Andrion, 2024). Como consequência, os cientistas brasileiros tornam-se totalmente dependentes de países com índice maior de inovação como os Estados Unidos, China, Japão, Reino Unido, Alemanha e França (Monteiro, 2019; Insper, 2023). A falta de investimento em pesquisa afeta estratégias em pesquisa biotecnológica, dificultando diretamente os estudos em biocatálise, mesmo para um país com uma das maiores biodiversidades do planeta.

2.2 Enzimas em biocatálise

As enzimas em sua maioria são proteínas que participam de processos catalisadores essenciais para o metabolismo de organismos vivos. As reações metabólicas que ocorrem em meio intracelular são realizadas por dessas enzimas e são necessárias para a sobrevivência. O processo ocorre através do anexo das enzimas em moléculas chamadas de substrato. Após a aderência da enzima ao substrato, há formação de uma nova molécula. A natureza da atividade catalítica da enzima é determinada pela cadeia de aminoácidos presentes nessas estruturas (Byjus, 2019).

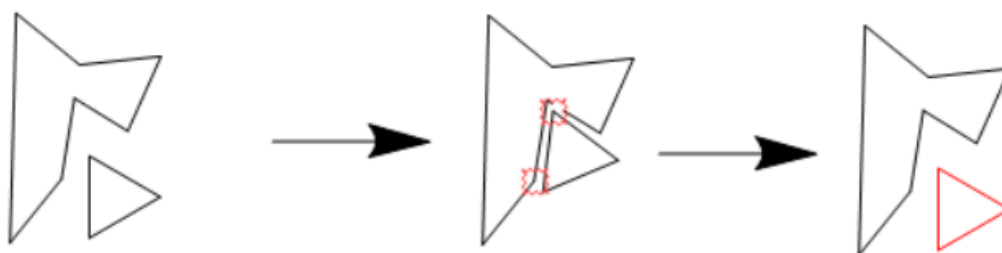


Figura 1 – Mecanismo biológico de acoplamento enzima-substrato

As enzimas são capazes de acelerar reações químicas através da diminuição da energia de ativação, agindo como um catalisador. Uma alta energia de ativação significa um alto valor energético necessário para que a reação aconteça. As enzimas provocam a formação de um intermediário instável que facilmente se degrada e forma os produtos. O local onde ocorre a interação enzima-substrato é chamado de sítio ativo, e depende do formato da proteína e das propriedades químicas do sítio ativo.

O uso de enzimas na química orgânica apresenta limitações como a baixa estabilidade em altas temperaturas e em solventes orgânicos. Além disso, a necessidade de operar em meio aquoso é um problema quando se utilizavam altas concentrações de reagentes com baixa solubilidade. Em alguns casos, apenas o aumento de temperatura pode ser o suficiente para a formação de produtos, mas em moléculas como as proteínas, o aumento de temperatura pode degradar a célula e impedir o funcionamento metabólico. Essa alta sensibilidade das enzimas nas reações orgânicas, criaram a necessidade de surgimento de massivos estudos feitos para expandir o uso de enzimas na síntese orgânica. A partir desses estudos, o banco de dados para a biocatálise foi ampliada, incluindo softwares que estudam retrosíntese para melhor entendimento do mecanismo realizado por essas substâncias (Henehan et al., 2023).

A nomenclatura das enzimas é dada pelo tipo de função que elas exercem no meio celular e divididas em seis classes, como as oxirredutases, responsáveis pelas

reações de oxirreduções; as transferases, que são capazes de catalisar reações de transferência de grupos de uma molécula à outra; além das hidrolases que participam das reações de hidrólise, como as liases que promovem quebras na estrutura; e as isomerases que transformam substratos em isômeros e as ligases catalisam ligações covalentes. Por consequência de suas versáteis funcionalidades, as enzimas participam de inúmeras aplicações (Porto de Souza Vandenberghe et al., 2020).

2.3 Uso de células íntegras

De um modo geral, a utilização de células inteiras facilita a realização de reações em cascata em comparação com aquelas que utilizam biocatalisadores isolados. No caso de aplicação comercial, o uso de células íntegras é muito mais econômico que o uso de células isoladas, além das enzimas possuírem maior estabilidade por estar protegida em sua célula hospedeira nesse procedimento. A facilidade de manipulação das células de microrganismos é um ponto positivo para seu uso em processo de produção industrial. As células fornecem o ambiente enzimático natural, há facilidade e economia de ter células disponíveis por cultivo sem qualquer processo adicional (de Gonzalo e Alcántara, 2021; Ishige e Shimizu, 2005).

2.4 Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO)

As oxidações de Baeyer-Villiger deram-se pela observação da transformação de cetonas cíclicas como a mentona em sua lactona correspondente a partir de monopersulfato de potássio (KHSO_5) como oxidante. A observação foi realizada por Adolf Von Baeyer e Victor Villiger em 1899, posteriormente dando nome a reação como oxidação de Baeyer-Villiger. Esta consiste na síntese de ésteres ou lactonas (ésteres cíclicos), por adição de um oxigênio de um peroxiácido entre o grupo carbonila e um carbono ligado ao grupo carbonila de uma cetona, cíclica ou não. O mecanismo de reação foi proposto por Criegee, onde há duas etapas como descrito nos esquemas abaixo (Hannes, 2011).

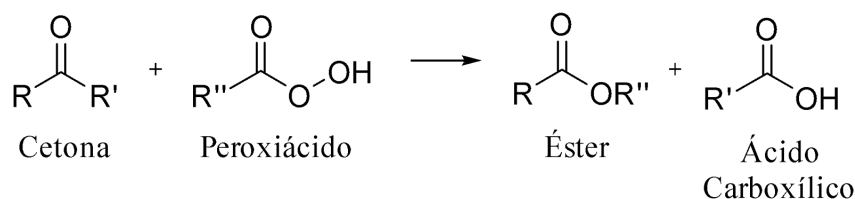


Figura 2 - Reação global de uma oxidação de Baeyer-Villiger

Fonte: do Autor

As oxigenases são enzimas utilizadas em reações de oxidação e podem ser classificadas em monooxygenases e dioxygenases, dependendo do número de átomos de oxigênio inseridos no substrato. As monooxygenases causam a entrada de um átomo de oxigênio do oxigênio molecular no substrato, enquanto o outro forma uma molécula de água, e as dioxygenases são responsáveis pela inserção de dois átomos de oxigênio. As monooxygenases podem se dividir em duas classes, dependendo da sua ação no substrato. Elas podem ser hidroxilases, quando causam a hidroxilação de compostos aromáticos, ou peróxidos quando causam oxigenação de substratos nucleofílicos ou eletrofílicos, sendo as monooxygenases de Baeyer-Villiger pertencentes ao último (Roberts e Wan, 1997). As maiores vantagens das Baeyer-Villiger monooxygenases são a alta seletividade em muitos substratos e a grande quantidade de compostos que são formados (Hannes, 2011).

A maioria dessas enzimas estão presentes em procariontes e em alguns organismos eucarióticos unicelulares, como fungos filamentosos. Hoje em dia, a ciclohexanona monooxygenase é o BVMO com maior aplicabilidade. Na maioria dessas reações, as lactonas são obtidas como produtos. As lactonas também podem ser empregadas na indústria cosmética e de perfumaria, na química de polímeros, como agroquímicos ou na indústria alimentícia como agentes aromatizantes. A utilização de biocatalisadores para a síntese de lactonas apresenta algumas vantagens em relação aos métodos clássicos, pois apenas o oxigênio molecular é necessário como oxidante (de Gonzalo e Alcántara, 2021).

Os BVMOs necessitam de nicotinamidas (NADPH e NADP⁺) para a redução da flavina, que reage com o oxigênio molecular para formar a peroxiflavina reativa responsável pela oxidação do substrato. São chamados BVMOs tipo I, das monooxygenases, o tipo dos dependentes de flavina, de acordo com seus motivos de sequência proteica. São doadores de elétrons e participam de um tipo de reação de

oxigenação. Uma catálise é iniciada pela ligação do NADPH e subsequente redução da flavina, após o cofator de nicotinamida adotar uma posição estável. Formada pela reação radical de dois FAD com redução de elétrons com oxigênio molecular, esse intermediário de flavina observável já era conhecido das hidroxilases aromáticas dependentes de flavina e luciferases. No entanto, embora com poucas exceções, a reação química seja catalisada por ácido, resultando assim em um peróxido protonado, a espécie catalítica de flavina requer um grupo peróxido desprotonado (Fürst et al., 2019).

2.5 Acetofenona em Biocatálise

O uso da acetofenona como substrato em biotransformações pode resultar em dois produtos resultantes de rotas de reações diferentes derivado de um mesmo substrato, conforme mostrado na Figura 7 :

- i) O produto da reação de redução da acetofenona, o 1-fenil-etanol (**C**), resultante da catálise pelas enzimas *diidrogenases* na presença de NAD(P)H
- ii) O produto da reação de oxidação da acetofenona, o acetato de fenila (**A**), resultante da catálise das enzimas *moxygenases* (*Baeyer-Villiger monooxygenase-BVMO*) na presença de oxigênio molecular (O_2).

Caso o microorganismo também apresente as enzimas *lipases*, dificilmente o produto acetato de fenila (**A**) será isolado. Neste caso, observa-se a hidrólise total do ester resultando na avaliação do produto fenol (**B**) (Andrade et al., 2004)

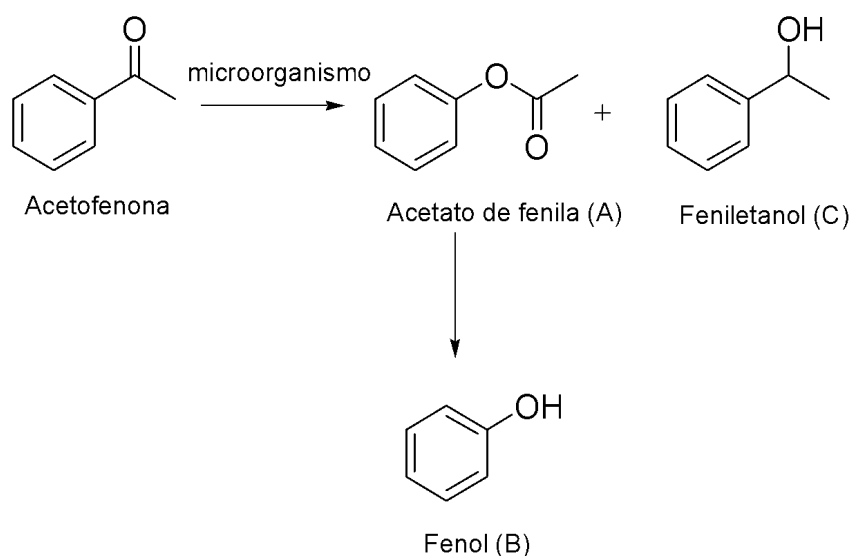


Figura 3 - Esquema geral da biotransformação de acetofenona

Fonte: do Autor

Essa reação de oxidação de acetofenona em acetato de fenila é a reação de Baeyer-Villiger, que transforma cetona cíclicas em lactonas e cetonas não cíclicas em ésteres (Nagaki et al., 2016; Ishige e Shimizu, 2005). Neste estudo, foi utilizado a acetofenona como cetona modelo e células íntegras de *Geotrichum candidum* CCT-1205. Com o intuito de minimizar a produção de feniletanol(**C**), se faz necessário a retirada completa de qualquer reagente que aumente a produção de NAD(P)H, pois é essa espécie química quem doará os hidrogênios para a carbonila da cetona.

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

Estudar o potencial biocatalítico das células íntegras de *Geotrichum candidum* CCT-1205 utilizando acetofenona como substrato em diferentes condições reação, tais como, concentração do substrato e quantidade de células de microorganismo. Os objetivos específicos estão listados abaixo.

- Otimizar a reação de oxidação de Baeyer-Villiger da acetofenona alterando os fatores influenciadores como concentração de substrato, quantidade de células úmidas;
- Por meio de cromatografia gasosa, analisar os resultados das melhores condições de reação a partir da porcentagem de conversão da acetofenona em fenol.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e equipamentos

Os instrumentos utilizados na realização dos procedimentos para este trabalho foram uma Câmara Autoclave Vertical em inox da marca PHOENIX, pertencente ao Laboratório de Estudos em Química Ambiental (LEQA) e uma Incubadora digital do Laboratório de Microbiologia. Nos procedimentos de crescimento fúngico e lavagem foram usados uma incubadora tipo shaker da MARCONI modelo MA-420 e uma Centrífuga CELM LS-3 PLUS. Os componentes necessários para produção dos meios de cultura são a glicose da marca SIGMA-ALDRICH; peptona bacteriológica, levedura e extrato de malte da marca LASVI 500g e ágar da ALPHATEC. Os métodos seguidos neste estudo são de conhecimento de Silva (2018).

4.2 Método de preparação e crescimento de microrganismos

4.2.1 Preparação de placas para crescimento microbiano

4.2.2 Preparação do meio de cultura sólido Yeast Malt Agar (YMA)

Para preparar o meio de cultura sólido Yeast Malt Agar (YMA), são necessários um Erlenmeyer de capacidade 100 mL para adicionar 0,5 g de glicose; 0,25 g de peptona; 0,15 g de extrato de malte; 0,15 g de extrato de levedura e 0,75 g de ágar em 50 mL de água destilada. Em conjunto com a solução, as placas de Petri também são autoclavadas a 120°C por 20 minutos para uso posterior. Em seguida, a solução ainda quente é aplicada nas placas até sua solidificação e guardada em incubadora por 24 horas para detectar possíveis contaminações. Após a confirmação da ausência de contaminantes, as placas foram preparadas sob capela de fluxo laminar. Nesse processo, os microrganismos são transferidos para uma placa em um processo de risca, com auxílio da alça de platina. A placa riscada é novamente colocada na incubadora para multiplicação e verificação de

contaminantes por 24 horas. As placas contendo meios de cultura contaminados foram descartadas durante o procedimento descrito acima.

4.2.2.1 Preparação do meio de cultura sólido Sabouraud

Em um Erlenmeyer de capacidade 100 mL para adicionar 2,0 g de glicose; 0,5 g de peptona e 1,0 g de ágar em 50 mL de água destilada. O processo de autoclavagem junto com as placas de petri, de risca e verificação de contaminantes ocorrem assim como citado anteriormente.

4.2.2 Crescimento do microrganismo em meio caldo YM (Yeast Malt)

Em água destilada, são necessários 2,0 gramas (g) de glicose; 1,0 g de peptona; 0,6 g de extrato de malte e 0,6 g de levedura. O Erlenmeyer contendo a solução também foi autoclavado em 120 °C por 20 minutos e levado para resfriamento à temperatura ambiente. Em uma cabine de fluxo laminar, o fungo armazenado no meio sólido foi inserido com auxílio de uma alça de platina para o meio líquido. O recipiente é tampado e levado para agitação em uma mesa agitadora por aproximadamente 72 horas. Em seguida, a solução é centrifugada e lavada 5 vezes para eliminação de excesso de glicose. A lavagem é uma forma de obter o produto de oxidação.

4.3 Preparação das soluções tamponadas

As quantidades de fosfato de sódio (Na_2HPO_4) e fosfato monossódico (NaH_2PO_4) em gramas foram calculadas a partir de 50 mM de cada substância em 500 mL, sendo medidas 3,549 g da primeira e 2,9975 g da segunda. Após a dissolução e diluição do ácido e da base, o controle do pH foi possível a partir de um peagâmetro para verificação das medidas.

4.4 Preparação das reações de oxidação de cetonas cíclicas em células íntegras de *Geotrichum candidum* CCT-1205

Por fim, para realizar a reação de biotransformação, adiciona-se, além de 2 g de biomassa, 20 mL de solução tampão fosfato pH 6,5 e variando a quantidade de microlitros de substrato. A mistura foi colocada em um agitador e as alíquotas foram

retiradas no tempo designado para cada mistura. A amostra é extraída com solvente acetato de etila e foi levado para análise por GC-FID para avaliar a conversão ao longo do tempo.

4.5 Análise por cromatografia gasosa

Todas as reações de oxidações de Baeyer-Villiger deste trabalho foram acompanhadas por cromatografia gasosa com detector de chama (GC-FID) do Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise (LASOB), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS), pertencente a Unidade de Caracterização Análise (UNICAL) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando o fungo *Geotrichum Candidum*, que nunca foi explorado na literatura para essa reação, alguns parâmetros foram estudados a fim de avaliar as melhores condições de produção de acetato de fenila.

5.1 Efeitos da quantidade de biomassa

As reações de efeito biomassa foram realizadas utilizando 20 µL de acetofenona, 20 mL de tampão fosfato e variando a quantidade de células úmidas de *Geotrichum candidum*. Para monitorar a conversão de acetofenona em fenol, foram retiradas alíquotas para análise no CG-FID a cada 12 horas, totalizando 72 horas.

Os resultados de menor quantidade da biotransformação da acetofenona estão mostrados no **Gráfico 1** com 2g de células úmidas e no **Gráfico 2** com 3g de células úmidas:

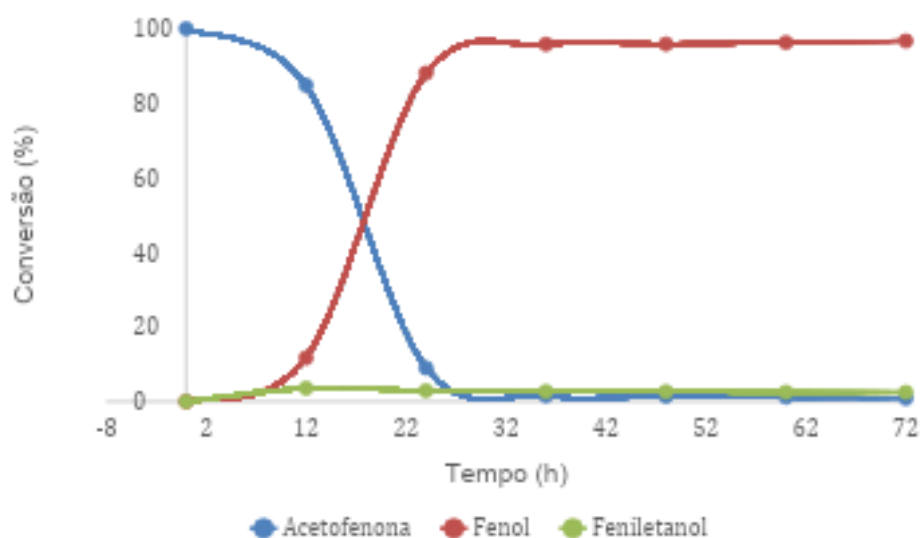


Gráfico 1 – Conversão de acetofenona em fenol com 2 gramas de biomassa

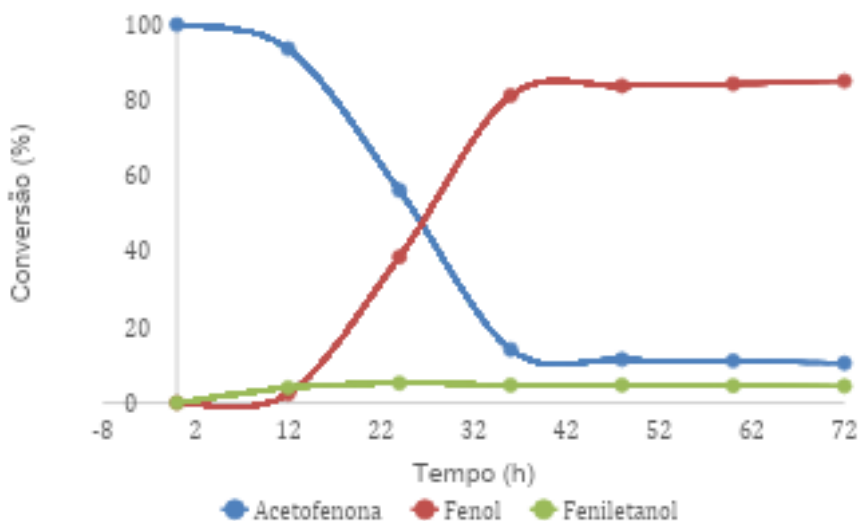


Gráfico 2 – Conversão de acetofenona em fenol com 3 gramas de biomassa

Conforme Gráfico 1, utilizando 2 gramas de células úmidas para 20 μ L de substrato, podemos observar que a acetofenona é quase totalmente consumida e biotransformadas em fenol (**B**) pelas enzimas responsáveis pela reação de oxidação Bayer-Villiger (BVMO- Esquema 2) entre 24 e 36 horas de reação, resultando na produção de fenol(**B**) (96% em 36h de reação). Já na utilização 3 gramas de células úmidas com a mesma quantidade de substrato (Grafico 2) a reação foi mais lenta, resultando também na produção majoritária de fenol (**B**) (81%) em 48h. No comparativo, observamos que o meio mais concentrado de células (3g, Grafico 2), tornou a reação mais lenta, além de proporcionar uma maior quantidade de 1-feniletanol (**C**) (11%) em comparação ao uso de 2g de células que foi de apenas

2% (Esquema 2). Os resultados podem ser comparados à outro trabalho com o mesmo microrganismo (Silva et al., 2020).

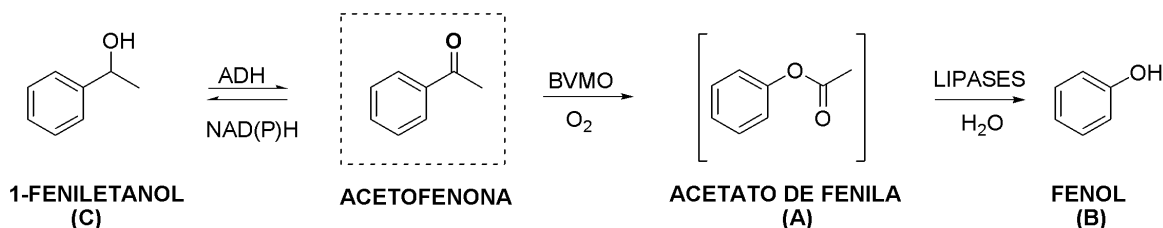


Figura 4 : Atuação das enzimas Baeyer-Villiger monoxigenase (BVMO) e Álcool desidrogenase (ADH) presentes nas células íntegras úmidas de *Geotrichum candidum* CCT 1205 na biotransformação de acetofenona.

Fonte: do Autor

Este fato pode ser avaliado pelo excesso de desidrogenases no meio reacional, o que leva a uma inibição (ainda que pequena) da ação das monooxigenases, evitando assim a oxidação da acetofenona para formar fenol na reação em cascata, e facilitando a reação de redução (Wen et al., 2019).

Pode-se observar que apesar de, em ambos os casos, o produto fenol (B) ser majoritário, não observamos a presença de acetato de fenila-(A), o que nos leva a crer que essa reação de hidrólise pelas lipases presentes é muito rápida e independe da quantidade de célula.

5.2 Efeitos da quantidade de substrato

Para a avaliação da quantidade de substrato na reação de bio-oxidação de Baeyer-Villiger foram testadas a quantidades de 10 µL, 20 µL, 50 µL e 80 µL, de acetofenona, com 20 mL de tampão fosfato pH 6,5 e 2 gramas células úmidas de *Geotrichum candidum* CCT 1205 . Neste estudo foram extraídas amostras a cada 24 horas até 72 horas e analisadas no CG-FID. Os resultados desse estudo encontram-se na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Avaliação da concentração de substrato na reação de Baeyer-Villiger.

Quantidade de substrato [µL]	Tempo [h]	Acetofenona [%]	Éster (A) [%]	Álcool (C) [%]	Fenol (B) [%]
10	24	0	4,2	17,9	78
	48	0	0	15,2	84,8
	72	0	0	12,3	87,7

20	24	0	0	10,3	89,7
	48	0	0	10,2	89,8
	72	0	0	9,7	90,3
50	24	0	92,3	7,7	0
	48	0	33,7	31,0	35,3
	72	0	0	30,3	69,7
80	24	99,3	0	0,7	0
	48	99,3	0	0,7	0
	72	99,3	0	0,7	0
100	24	99,7	0	0,3	0
	48	99,7	0	0,3	0
	72	99,6	0	0,4	0

As concentrações que proporcionaram maior percentual de conversão ao produto alvo foram as reações mais diluídas, contendo 10 e 20 μL de substrato, conforme mostrado na Tabela 1. No entanto, a concentração de 20 μL de acetofenona foi ideal, pois permitiu um tempo de reação de conversão mais curto, com um rendimento de 89% de fenol (**B**) em apenas 24 horas e apenas 10% de produto de redução (**C**). É notável que quando foram utilizados apenas 10 μL de acetofenona, o produto esperado da oxidação de Baeyer-Villiger, acetato de fenila (**A**) também não foi observado, assim como no estudo relatado no estudo com 20 μL de acetofenona.

Entretanto, quando há um aumento brusco de 20 para 50 μL de acetofenona (**Tabela 1**), observamos agora a formação majoritária de acetato de fenila (**A**) o que levanta a hipótese a lipase funcione melhor em meios mais diluídos. Observamos que a reação promoveu 92% de formação de éster em 24 horas, seguida de hidrólise lenta em 72 horas de reação.

Nas quantidades de 80 e 100 μL não houve conversão de reagentes em produtos. Esse fator se deve que quando a concentração é muito elevada, a ação das enzimas fúngicas é inibida, impossibilitando a ocorrência de reações de oxidação ou redução. Um estudo realizado por Van Bloois et al., (2012), na

avaliação do uso de células integras de *Escherichia coli* com acetofenona, também foi observado um comportamento parecido em que a ação das enzimas BVMO foi afetada pelo aumento da concentração do substrato de 5 mM para 15 mM na produção de fenol.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A partir do estudo de biotransformação em acetofenona com *Geotrichum candidum* CCT 1205 , foi possível obter condições ótimas para a formação de fenol. No estudo de quantidade de biomassa, o melhor resultado foi de 88% de fenol convertido com 2 gramas de massa úmida de microrganismo em aproximadamente 36 horas de reação. Para o estudo do efeito da quantidade de substrato, o melhor resultado foi de 90,3% para a produção de fenol utilizando em 20 µL de acetofenona. Portanto, os resultados apresentados demonstram que células íntegras de *Geotrichum candidum* CCT 1205 possuem grande potencial nos processos de oxidação da acetofenona e, conseqüentemente a hidrólise do intermediário, acetato de fenila, produzindo o fenol com conversão em menor tempo.

Nesse contexto, que o presente estudo serve como base para futuras investigações para emprego microrganismo em processos biocatalíticos, apresentando-se como perspectivas investigação do efeito de pH em biotransformação da acetofenona, observações do efeito de diferentes concentrações sobre a hidrólise do acetato de fenila com *G. candidum* e a aplicação do meio otimizado com *Geotrichum candidum* CCT 1205 em acetofenonas substituídas.

REFERÊNCIAS

EGOROVA, K. S.; ANANIKOV, V. P. Welche Katalysatormetalle sind harmlos, welche giftig? Vergleich der Toxizitäten von Ni-, Cu-, Fe-, Pd-, Pt-, Rh- und Au-Salzen. **Angewandte Chemie**, v. 128, n. 40, p. 12334–12347, 26 set. 2016.

ADMIN. **Enzymes - Structure, Classification, and Function**. 2 maio 2019. Disponível em: <https://byjus.com/biology/enzymes>. Acesso em: 24 abr. 2024.

ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. **Whole organism biocatalysis**. **Current Opinion in Chemical Biology**. Elsevier Ltd , 2005.

HAUER, B. et al. New generation of biocatalysts for organic synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 12, p. 3070–3095, 2014.

GONÇALVES, C. C. S.; FONSECA, F. S. A. Enzyme-catalyzed redox reactions. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 4, p. 778–797, 2018.

BELL, E. L. et al. **Biocatalysis**. **Nature Reviews Methods Primers** Springer Nature, , 1 dez. 2021.

FIELDING, H. **Chemical industry hasn't yet developed an appetite for biocatalysis, survey finds**. Disponível em: <<https://www.chemistryworld.com/news/chemical-industry-hasnt-yet-developed-an-appetite-for-biocatalysis-survey-finds/4018056.article>>. Acesso em: 24 abr. 2024.

ANDRION, R. **Fapesp | Tecnologia pode possibilitar produção de enzimas no Brasil**. Disponível em: <<https://parque.inova.unicamp.br/fapesp-tecnologia-pode-possibilitar-producao-de-enzimas-no-brasil/>>. Acesso em: 24 abr. 2024.

Brasil ocupa o 49º lugar em ranking global de inovação. Disponível em: <<https://www.insper.edu.br/noticias/brasil-sobe-em-ranking-global-de-inovacao-e-fica-em-49o-lugar/>>. Acesso em: 24 abr. 2024.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**, v. 1, n. 7, p. 372, 2012.

TRUPPO, M. D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 5, p. 476–480, 2017.

CAREY, F. A. **Química Orgânica**, v.2, n. 7, p. 762, 2011.

HOLLMANN, F. et al. Biocatalytic synthesis of lactones and lactams. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 13, n. 23, p. 3601–3610, 2018.

TEN BRINK, G. J.; ARENDS, I. W. C. E.; SHELDON, R. A. The Baeyer-Villiger reaction: New developments toward greener procedures. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 4105–4123, 2004.

KAMILARI, E. et al. **Uncovering the Biotechnological Importance of *Geotrichum candidum***. **FoodsMDPI**, , 1 mar. 2023.

RYE, C. et al. **General Biology**, n. 9, p. 871–872, 2015.

SHEN, L.-Q., CANG, R., YANG, G., ZENG, A.-Q., HUANG, H., & ZHANG, Z.-G. (2020). *Aureobasidium subglaciale* F134 is a Bifunctional whole-cell biocatalyst for Baeyer-Villiger oxidation or selective carbonyl reduction controllable by temperature. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. doi:10.1016/j.cjche.2020.06.041.

SILVA, André Leonardo Patrício. Condições de cultivo das células de *Geotrichum candidum*. *In*: SILVA, André Leonardo Patrício. **Estudos em biocatálise com células íntegras de *Geotrichum candidum* e lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizadas em sílicas funcionalizadas**. 2018. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, [S. l.], 2018. p. 91, 92.

JÚNIOR, Sérgio Dantas de Oliveira. Valores de atividades enzimáticas. *In*: JÚNIOR, Sérgio Dantas de Oliveira. **Produção por fungos em fase semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos**. 2014. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014. p. 58.

SHELDON, Roger. **The E factor: Green Chemistry and Catalysis**. [S. l.], 6 ago. 2007. Disponível em: <https://www.sheldon.nl/bi/EFactor.aspx>. Acesso em: 22 ago. 2021.

LENARDÃO, E. J. et al. “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

SUN, H. et al. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1275–1284, 2018.

MONTEIRO, Valdirene; SILVA, Roberto do Nascimento. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática**. Revista Processos Químicos, [s. l.], p. 9-23, 11 jun. 2019.

BELL, E. L. et al. **Biocatalysis**. **Nature Reviews Methods Primers**. Springer Nature. 1 dez. 2021.

BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1–6, p. 41–55, maio 2014.

BLANK, L. M. et al. **COMPREHENSIVE INVITED REVIEW Redox Biocatalysis and Metabolism: Molecular Mechanisms and Metabolic Network Analysis**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.liebertpub.com>.

CHAKRABORTY, A. A. et al. Optimization of redox reactions employing whole cell biocatalysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 221–227, abr. 2005.

ÇOLAK, N. S. et al. Response surface methodology as optimization strategy for asymmetric bioreduction of acetophenone using whole cell of *Lactobacillus senmaizukei*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 9, p. 884–890, 2019.

DE GONZALO, G.; ALCÁNTARA, A. R. **Multienzymatic processes involving baeyer–villiger monooxygenases**. **Catalysts**. MDPI, 1 maio 2021.

DE MORAIS, W. G. et al. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, v. 123, p. 26–34, 1 jul. 2016.

DE OLIVEIRA SILVA, M. B. P. et al. Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, 2021.

FERRONI, F. M. et al. Structural and catalytic characterization of a fungal baeyer-villiger monooxygenase. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2016.

FÜRST, M. J. L. J. et al. **Baeyer-Villiger Monooxygenases: Tunable Oxidative Biocatalysts**. **ACS Catalysis**American Chemical Society, , 6 dez. 2019.

GRISON, C.; LOCK TOY KI, Y. **Ecocatalysis, a new vision of Green and Sustainable Chemistry**. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**Elsevier B.V., , 1 jun. 2021.

NAGAKI, M., SATO, R., TANABE, S., SATO, T., HASUI, Y., CHOUNAN, Y. & HARADA, Y. (2016). Biotransformation of acetophenone to 1-phenylethanol by fungi. **Transactions of the Materials Research Society of Japan**, 41(3), 247–250. doi:10.14723/tmrsj.41.247.

JAHANGEER, M. et al. Biotransformation of Lignocellulosic Biomass to Value-Added Bioproducts: Insights into Bio-Saccharification Strategies and Potential Concerns. **Topics in Catalysis**, 2024.

KHARISSOVA, O. V. et al. **Greener synthesis of chemical compounds and materials**. **Royal Society Open Science** Royal Society Publishing, , 1 nov. 2019.

KUTYŁA, M. et al. Biomass of a Psychrophilic Fungus as a Biocatalyst for Efficient Direct Esterification of Citronellol. **Bioenergy Research**, v. 15, n. 1, p. 399–411, 1 mar. 2022.

LIU, H. et al. Immobilized and free cells of *Geotrichum candidum* for asymmetric reduction of ketones: Stability and recyclability. **Molecules**, v. 23, n. 9, 27 ago. 2018.

ŞAHİN, E.; DERTLİ, E. Highly Enantioselective Production of Chiral Secondary Alcohols with *Candida zeylanoides* as a New Whole Cell Biocatalyst. **Chemistry and Biodiversity**, v. 14, n. 9, 1 set. 2017.

SEO, E. J. et al. Enzyme Access Tunnel Engineering in Baeyer-Villiger Monooxygenases to Improve Oxidative Stability and Biocatalyst Performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 364, n. 3, p. 555–564, 1 fev. 2022.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. **Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry**. **Chemical Reviews** American Chemical Society, , 24 jan. 2018.

ENZYME - Temperature, pH, Substrates. 18 jul. 2024. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/enzyme/Factors-affecting-enzyme-activity>. Acesso em: 25 abr. 2024.

CHAPTER 7: Catalytic Mechanisms of Enzymes - Chemistry. Disponível em: <https://wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch450-and-ch451-biochemistry-defining-life-at-the-molecular-level/chapter-7-catalytic-mechanisms-of-enzymes/#7.3examples>. Acesso em: 25 abr. 2024.

VAN BLOOIS, E. et al. A stepwise approach for the reproducible optimization of PAMO expression in *Escherichia coli* for whole-cell biocatalysis. **BMC Biotechnology**, v. 12, 21 jun. 2012.

VIEIRA, G. A. B. et al. *Candida tropicalis* CE017: A new Brazilian enzymatic source for the bioreduction of aromatic prochiral ketones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1509–1516, 2010.

WEN, P. et al. Highly Efficient Biosynthesis of Heliotropin by Engineered *Escherichia coli* Coexpressing Trans-Anethole Oxygenase and Formate Dehydrogenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 51, p. 14121–14128, 26 dez. 2019.

ZHUK, T. S.; BABKINA, V. V.; ZORN, H. Aerobic C–C Bond Cleavage Catalyzed by Whole-Cell Cultures of the White-Rot Fungus *Dichomitus albidofuscus*. **ChemCatChem**, v. 14, n. 3, 8 fev. 2022.

ZUIN, V. G. et al. Education in green chemistry and in sustainable chemistry: perspectives towards sustainability. **Green Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 1594–1608, 21 fev. 2021.

SILVA, A. L. P. et al. Rapid conversion of cyclohexenone, cyclohexanone and cyclohexanol to ϵ -caprolactone by whole cells of *Geotrichum candidum* CCT 1205. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 3, p. 185–190, 4 maio 2017.

SILVA, A. L. P. Estudos em biocatálise com células íntegras de *Geotrichum candidum* e lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizadas em sílicas funcionalizadas. 2018. 125 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

SILVA, A. L. P. et al. Biocatalytic production of ϵ -caprolactone using *Geotrichum candidum* cells immobilized on functionalized silica. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 20, p. 8887–8895, 2020.

KAR, S. et al. **Green Chemistry in the Synthesis of Pharmaceuticals**. **Chemical Reviews**. American Chemical Society, , 9 fev. 2022.

STERNBERG, J.; SEQUERTH, O.; PILLA, S. **Green chemistry design in polymers derived from lignin: review and perspective**. **Progress in Polymer. Science** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2021.

KATE, A. et al. **Green catalysis for chemical transformation: The need for the sustainable development**. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry** Elsevier B.V., , 1 jan. 2022.

HENEHAN, G. T. M. et al. **Editorial: Green chemistry biocatalysis**. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. Frontiers Media S.A., , 2023.

PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L. et al. Classification of enzymes and catalytic properties. **Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Catalysis and Technologies**, p. 11–30, 1 jan. 2020.

SILVA, A. L. P. et al. Biocatalytic production of ϵ -caprolactone using *Geotrichum candidum* cells immobilized on functionalized silica. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 20, p. 8887–8895, 2020.