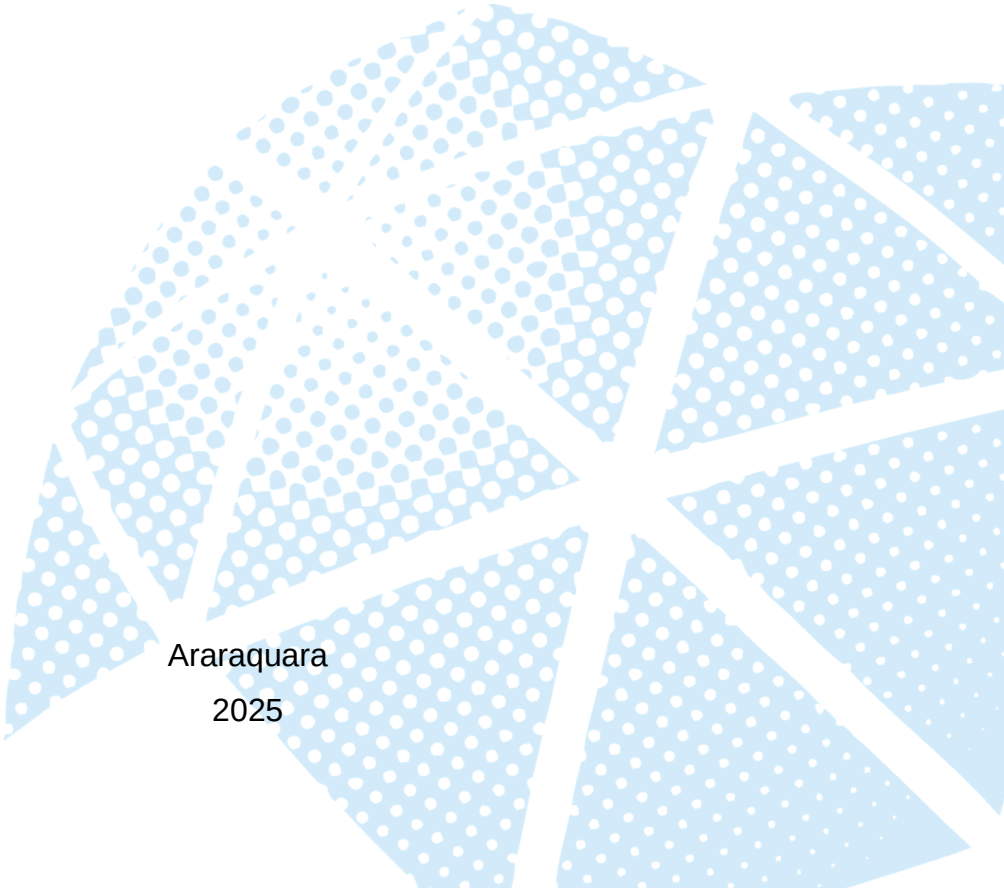


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

LARISSA WIELLI TERRABUIO

**OXIDAÇÃO DE CARBONOS NÃO ATIVADOS COM PEROXIGENASES NÃO
ESPECÍFICAS: UMA ABORDAGEM EFICIENTE E SUSTENTÁVEL**

Araraquara
2025



LARISSA WIELLI TERRABUIO

**OXIDAÇÃO DE CARBONOS NÃO ATIVADOS COM PEROXIGENASES NÃO
ESPECÍFICAS: UMA ABORDAGEM EFICIENTE E SUSTENTÁVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
(UNESP), Instituto de Química,
Araraquara, para obtenção do título de
Bacharel em Química.

Orientador(a): Prof. Dr. Humberto Márcio
Santos Milagre

Araraquara
2025

T323o Terrabuio, Larissa Wielli
Oxidação de carbonos não ativados com peroxigenases não específicas : uma abordagem eficiente e sustentável / Larissa Wielli Terrabuio. -- Araraquara, 2025
64 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Humberto Márcio Santos Milagre

1. Biocatálise. 2. Química verde. 3. Oxidorredutases. 4. Metaloenzimas. 5. Enzimas imobilizadas. I. Título.

LARISSA WIELLI TERRABUIO

**OXIDAÇÃO DE CARBONOS NÃO ATIVADOS COM PEROXIGENASES NÃO
ESPECÍFICAS: UMA ABORDAGEM EFICIENTE E SUSTENTÁVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” (UNESP) Instituto de Química,
Araraquara, para obtenção do título de Bacharel
em Química.

Data da defesa: 18 / 06 / 2025.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Humberto Marcio Santos Milagre
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre foram meu alicerce, e ao meu namorado, meu parceiro de todas as horas. Obrigada por serem meu suporte em cada etapa dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre, pela paciência, orientação e confiança ao longo de todo o processo. Seus conselhos e ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento, os levarei para sempre comigo.

À Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, que, com sua competência e paixão pelo que faz, tem sido uma verdadeira inspiração para mim e muitas outras mulheres no meio acadêmico.

Aos meus colegas de laboratório do Milagre Lab, que além de parceiros de pesquisa, tornaram essa jornada muito mais leve e divertida. Obrigada pela troca de experiência e pelas risadas diárias.

Ao Instituto de Química e à Universidade Estadual Paulista, pela formação acadêmica e pela infraestrutura oferecida ao longo da graduação, essenciais para meu desenvolvimento e para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa; ao CNPq, pela concessão da minha bolsa; e à CAPES, pela manutenção do Portal de Periódicos.

Aos meus pais, Katia e Rodolfo, meus maiores apoiadores, agradeço por acreditarem em mim mesmo nos momentos de dúvida. Nunca esquecerei meu primeiro kit de química, que foi o precursor de uma reação em cadeia que continua até hoje. Vocês me ensinaram o valor da dedicação, persistência e acima de tudo da curiosidade.

Aos meus avós, que sempre cuidaram de mim com tanto carinho e amor, agradeço por tudo o que fizeram por mim ao longo da vida. Embora desejasse que todos pudessem estar aqui para compartilhar essa conquista, sei que sempre levarei comigo os ensinamentos e força que meu vô Roberto me transmitiu.

Ao meu namorado, Guilherme, meu parceiro para toda a vida, agradeço pela paciência infinita, pelo incentivo nos dias mais difíceis e por sempre acreditar em mim. Mesmo quando a distância nos separava, sempre esteve presente, e agora, estando ao meu lado, seu apoio se tornou ainda mais essencial nos últimos passos dessa longa caminhada.

Ao Gomes, amigo que a pandemia trouxe para minha vida, muito obrigada por toda a ajuda e companhia. Esses anos foram muito mais leves e suportáveis por causa de você.

“During our brief stay on planet Earth, we owe ourselves and our descendants the opportunity to explore—in part because it’s fun to do. But there’s a far nobler reason. The day our knowledge of the cosmos ceases to expand, we risk regressing to the childish view that the universe figuratively and literally revolves around us.”

(Neil deGrasse Tyson, 2007)¹

¹ TYSON, Neil deGrasse. **Natural History Magazine**, April 2007

RESUMO

A obtenção de catalisadores para a oxidação de carbonos não ativados é uma das áreas mais estudadas na química orgânica sintética. Contudo, atualmente a maior parte dos catalisadores disponíveis são a base de metais de transição, os quais divergem bastante dos 12 Princípios da Química Verde por serem altamente tóxicos e vindos de fontes não renováveis. Por esse motivo, o estudo de sistemas usando biocatalisadores vêm se destacando, dentre eles a enzima peroxigenase não específica vinda do fungo *Agrocybe aegerita* (AaeUPO) vem sendo uma das mais estudadas por ser uma enzima relativamente estável, bem ativa e não necessitar de nenhum cofator: somente adição de peróxido de hidrogênio é necessária para que ocorram as reações. Tendo isso em mente, este trabalho procura desenvolver metodologias para a oxidação eficiente e sustentável de carbonos não ativados por meio da oxidação do substrato modelo etilbenzeno. Para tanto foram feitos estudos da atividade enzimática e parâmetros reacionais, como a concentração de biocatalisador e a forma e quantidade de adição de peróxido de hidrogênio. Além disso foi conduzido um protocolo de imobilização enzimática visando aumentar a estabilidade da AaeUPO e maior eficiência no processo de *downstream*. Por meio destes testes foi possível constatar a atividade da AaeUPO para a oxidação de carbonos não ativados, sendo atingidos valores de conversão de até 52,88% em 24h de reação. Foi constatado também a incompatibilidade da matriz de alginato de sódio como meio de imobilização para os sistemas estudados. Além disso, foi também possível obter mais informações sobre a seletividade da AaeUPO na oxidação do etilbenzeno em 1-feniletanol e acetofenona, sendo constatada um favorecimento à formação de acetofenona conforme o avanço da reação. Todos esses dados são de extrema importância para possíveis futuros estudos conduzidos com um maior escopo de substrato, diferentes condições reacionais e meios de imobilização.

Palavras-chave: biocatálise; química verde; peroxigenases não específicas; imobilização enzimática.

ABSTRACT

The production of catalysts for the oxidation of non-activated carbons is one of the most studied areas in synthetic chemistry. However, currently most of the available catalysts are transition metals based, which diverges greatly from the 12 Principles of Green Chemistry due to their highly toxic nature and non-renewable sources. For this reason, the study of biocatalysts-based systems has been gaining great prominence, amongst them the non-specific peroxygenase enzyme originated from the fungus *Agrocybe aegerita* (AaeUPO) has been one of the most studied due to its relatively stable nature, high activity and its self-sustainability, not requiring any cofactor, only the addition of hydrogen peroxide is necessary for the reactions to occur. With this in mind, this work seeks out the development of methodologies for the efficient and sustainable oxidation of non-activated carbons through the oxidation of the model substrate ethylbenzene. For this purpose, enzymatic activity and reaction parameters studies were conducted, altering conditions such as biocatalyst concentration and hydrogen peroxide method of addition. Furthermore, an enzymatic immobilization protocol was conducted aiming to increase the stability of AaeUPO and optimize the downstream process. Through these tests, it was possible to verify the activity of AaeUPO for the oxidation of non-activated carbons, reaching conversion values of up to 52.88% in 24h of reaction. The incompatibility of the sodium alginate matrix as an immobilization medium for the studied systems was also detected. In addition, further insights into the selectivity of AaeUPO for the oxidation of ethylbenzene into 1-phenylethanol and acetophenone was also uncovered, showing a preference for the formation of acetophenone as the reaction progresses. All the data collected is extremely important for future studies that may be conducted with a larger scope of substrate, different reaction conditions and immobilization media.

Keywords: biocatalysis; green chemistry; nonspecific peroxygenases; enzyme immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Os 12 Princípios da Química Verde	15
Figura 2- Diagrama de energia demonstrando uma reação com e sem catalisador	17
Figura 3- Tabela periódica destacando os elementos usados em catalisadores metálicos e suas respectivas toxicidades.....	18
Figura 4- Representação da enzima monooxigenase do citocromo P450 e o seu grupo heme	20
Figura 5- Reação de oxidação de carbonos não ativados catalisada por UPO.....	21
Figura 6- Ciclo catalítico da UPO	22
Figura 7- Representação da enzima AaeUPO e o seu grupo heme.....	23
Figura 8 - Tipos de imobilização enzimática.....	24
Figura 9- Estrutura do alginato de sódio.....	26
Figura 10- Esquema da reação do ABTS com a UPO para atividade enzimática	30
Figura 11- Esquema da reação do NBD com a UPO para atividade enzimática.....	31
Figura 12- Primeiro teste da reação de oxidação do Etilbenzeno com a UPO	32
Figura 13- Oxidação do Etilbenzeno com acetonitrila como cossolvente.....	32
Figura 14- Oxidação do Etilbenzeno com 0,34 g de enzima e adição de peróxido com micropipeta.....	33
Figura 15- Oxidação do Etilbenzeno com AaeUPO imobilizada em alginato	34
Figura 16- Oxidação do Etilbenzeno com H ₂ O ₂ diluído	35
Figura 17- Coloração das enzimas a) Soluções enzimáticas e suas diferentes colorações; b) Enzima AaeUPO em pó liofilizado do extrato enzimático	36
Figura 18- Reação do ABTS com a UPO para atividade enzimática.....	37
Figura 19- Reação do NBD com a UPO para atividade enzimática	37
Figura 20- Reação de oxidação do etilbenzeno com a AaeUPO e seus produtos esperados.....	38
Figura 21- Microextrações feitas em Eppendorf. a) Tubo antes da centrifugação; b) Tubo depois da centrifugação; c) Centrífuga de balança utilizada nas microextrações	39
Figura 22- Cromatograma primeiro teste da reação de oxidação do EB 60 min (Método A).....	40
Figura 23- Cromatograma 1-feniletanol padrão (Método A)	40
Figura 24- Cromatograma acetofenona padrão (Método A)	40

Figura 25- Cromatograma etilbenzeno padrão (Método A)	41
Figura 26- Sistema de adição de peróxido com bomba de seringa para a reação de oxidação com MeCN como cossolvente.....	42
Figura 27- Cromatograma da amostra de 2 h da reação de oxidação do EB com 6 mg de AaeUPO usando acetonitrila como cossolvente (Método A)	42
Figura 28- Cromatograma da amostra de 1 h da reação de oxidação do EB com 70 mg de AaeUPO usando acetonitrila como cossolvente (Método A)	43
Figura 29- Emulsão no funil de separação da reação de oxidação do EB usando 70 mg de AaeUPO e acetonitrila como cossolvente	43
Figura 30- Cromatograma da amostra de 2 h da reação de oxidação do EB com 70 mg de AaeUPO usando heptano como cossolvente (Método A)	44
Figura 31- Balão de reação da oxidação do EB usando 0,34 g de AaeUPO a) no início da reação b) no final da reação	45
Figura 32- Resultados das análises de 24 h por GC-MS usando 0,34 g de AaeUPO e adição de peróxido manual a) Cromatograma de 24h; b) espectro de massas destacando do etilbenzeno, 1-feniletanol e acetofenona e suas respectivas <i>m/z</i>	46
Figura 33- Funil de separação com a emulsão e camada de "gel" durante a extração da reação de oxidação do EB usando 0,34g de AaeUPO.....	47
Figura 34- Representação esquemática do sistema de imobilização enzimática em alginato de sódio	48
Figura 35- Partes do sistema de imobilização. a) peça metálica em T com a agulha presa; b) visão interna da peça metálica com agulha; c) sistema de imobilização completo com a solução de cloreto de cálcio sob agitação magnética	49
Figura 36- Esferas de alginato contendo a enzima AaeUPO.	50
Figura 37- Esferas de AaeUPO em alginato guardadas em tampão Tris-HCl pH 8,00 50 mmol L ⁻¹	50
Figura 38- Balão com as esferas de AaeUPO em alginato. a) Antes do início da adição do peróxido b) Durante a adição do peróxido; c) No final da reação.....	51
Figura 39- Seringa de vidro com bolhas vindas da degradação do peróxido de hidrogênio.....	52
Figura 40- Seringa de vidro com peróxido de hidrogênio diluído envolvida em papel alumínio.....	53
Figura 41- Gráfico da conversão total pelo tempo reacional da oxidação do EB com peróxido de hidrogênio diluído (Método B).....	53

Figura 42- Cromatograma do 1-Feniltanol padrão (Método B)	54
Figura 43- Cromatograma da oxidação do EB com peróxido de hidrogênio diluído 1h (Método B).....	54
Figura 44- Cromatograma da oxidação do EB com peróxido de hidrogênio diluído 24 h (Método B).....	54
Figura 45- Gráfico da conversão do 1-feniletanol e acetofenona pelo tempo reacional usando peróxido de hidrogênio diluído.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados das medidas da atividade enzimática com o NBD para soluções de concentração 30mg mL^{-1} , 3mg mL^{-1} , $0,3\text{ mg mL}^{-1}$ e $0,15\text{ mg mL}^{-1}$	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EC *Enzyme Comission Number*

P450s ou CYP Monooxigenases do citocromo P450

AaeUPO Perozigenase não específica de *Agrocybe aegerita*

Cpd1 Composto 1

Cpd2 Composto 2

NBD 1,2-(metilenodióxi)-4-nitrobenzeno

ABTS sal diamônico(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

P. A. Puro para Análise

GC-FID *Gas Chromatography – Flame Ionization Detector*

GC-MS *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*

MeCN acetonitrila

EB etilbenzeno

T_R tempo de retenção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Catálise.....	17
1.2 Biocatalisadores	18
1.2.1 Monooxigenases do citocromo P450.....	20
1.2.2 Peroxigenases.....	21
1.3 Imobilização enzimática.....	23
1.3.1 Alginato.....	25
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Reagentes	28
3.2 Análises cromatográficas.....	28
3.2.1 Gas Chromatography – Flame Ionization Detector – GC-FID	28
3.2.2 Gas Chromatography – Mass Spectrometry – GC-MS.....	29
3.3 Atividade enzimática.....	29
3.3.1 Atividade enzimática com sal diamônico(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfonato) (ABTS)	30
3.3.2 Atividade enzimática com 1,2-(metilenodióxi)-4-nitrobenzeno (NBD).....	31
3.4 Reações de Oxidação Biocatalíticas catalisadas por AaeUPO	31
3.4.1 Procedimentos gerais	31
3.4.2 Primeiro teste da reação de oxidação do etilbenzeno com AaeUPO	32
3.4.3 Teste da reação de oxidação do etilbenzeno com acetonitrila e heptano como cossolventes.....	32
3.4.4 Oxidação do Etilbenzeno com adição de peróxido manual	33
3.4.5 Imobilização enzimática com alginato de sódio	34
3.4.6 Oxidação do Etilbenzeno com AaeUPO imobilizada em alginato.....	34
3.4.7 Oxidação do Etilbenzeno com uma solução diluída de peróxido de hidrogênio	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Atividade enzimática.....	36
4.2 Primeiro teste da reação de oxidação do etilbenzeno com AaeUPO	38
4.3 Teste da reação de oxidação do etilbenzeno com acetonitrila e heptano como cossolventes.....	41
4.4 Oxidação do Etilbenzeno com adição de peróxido manual	44

4.5	Imobilização enzimática com alginato de sódio.....	47
4.6	Oxidação do Etilbenzeno com AaeUPO imobilizada em alginato.....	51
4.7	Oxidação do Etilbenzeno com uma solução diluída de peróxido de hidrogênio	52
5. CONCLUSÃO		56
5.1	Perspectivas futuras	56
REFERÊNCIAS.....		58

1 INTRODUÇÃO

O ano de 1962 foi um momento de transformação para a comunidade química global. Nele foi lançado o livro *Primavera Silenciosa* pela escritora e ambientalista Rachel Carson. Essa obra critica o uso indiscriminado de pesticidas e as consequências da má utilização de reagentes químicos (Carson, 1962). Essa reflexão foi um dos estopins para o começo do movimento ambientalista e criação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. No começo, essas mudanças ficaram mais centradas nos Estados Unidos, mas rapidamente se espalharam pelo resto do mundo (Celestino, 2023). Acompanhando essa nova visão, Paul Anastas e John Warner publicaram os 12 Princípios da Química Verde (Figura 1) em 1998 (Anastas; Warner, 1998; Tradução 2025). Esses princípios rapidamente ganharam destaque e reconhecimento na comunidade científica consolidando-se como referência no planejamento de reações visando processos industriais mais sustentáveis.

Figura 1- Os 12 Princípios da Química Verde



Fonte: Autor

Os 12 princípios podem ser resumidos da seguinte maneira:

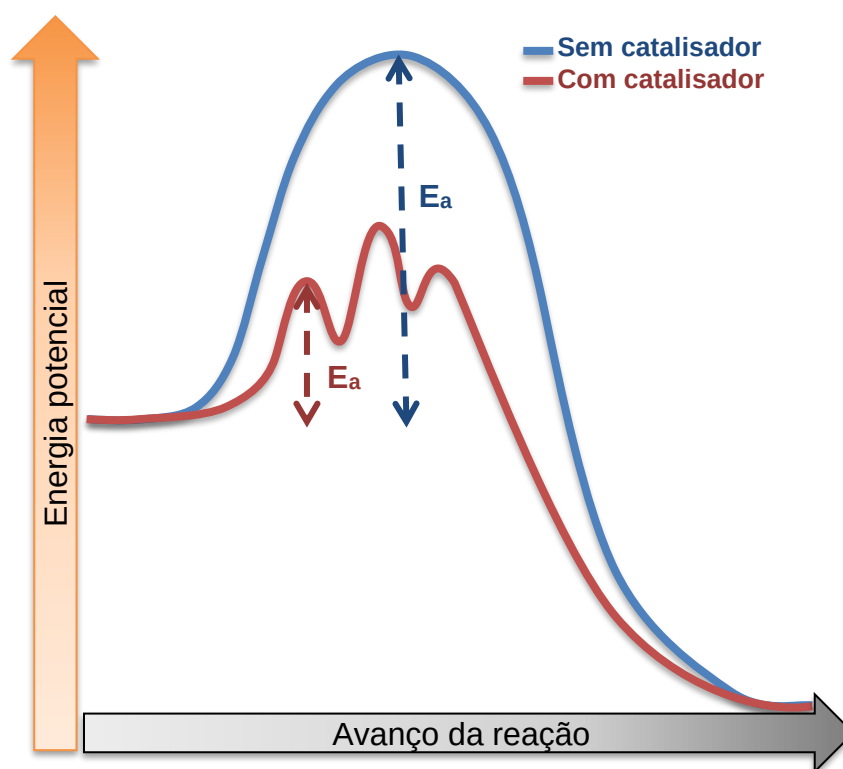
- 01-Prevenção de resíduos:** é melhor prevenir a formação de resíduos do que ter que remediá-los após sua formação.
- 02-Economia de átomos:** rotas sintéticas devem ser planejadas para maximizar a incorporação de todos os materiais no produto final.
- 03-Redução de materiais perigosos:** rotas sintéticas devem ser planejadas para usar e gerar substâncias com a menor toxicidade possível.
- 04-Produtos mais seguros:** produtos químicos devem ser planejados para manter a eficiência enquanto diminuem a toxicidade.
- 05-Solventes e auxiliares menos nocivos:** o uso de solventes e auxiliares deve ser evitado, mas quando necessário que sejam escolhidos os menos nocivos.
- 06-Eficiência energética:** os impactos ambientais e econômicos do alto consumo de energia devem ser reconhecidos e minimizados. Preferencialmente, reações devem ser conduzidas em temperatura e pressão ambientes.
- 07-Matéria prima renovável:** quando possível a matéria prima e combustíveis devem ser de fontes renováveis.
- 08-Evitar formação de derivados:** derivatizações desnecessárias (uso de grupos protetores por exemplo) devem ser minimizadas para evitar a formação de resíduo adicional.
- 09-Catálise:** Catalisadores altamente seletivos são preferíveis quando comparados com reagentes estequiométricos.
- 10-Produtos degradáveis:** produtos devem ser planejados para serem facilmente degradados depois de usados sem persistir no meio ambiente.
- 11-Análise em tempo real para prevenção:** métodos analíticos devem ser desenvolvidos para análise em tempo real, a fim de prevenir a formação de substâncias nocivas.
- 12-Química segura:** substâncias e condições reacionais devem ser escolhidas com o propósito de diminuir o risco de possíveis acidentes, incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

Como é possível perceber, vários princípios acabam se intercalando, sendo por exemplo impossível prevenir resíduos (1) usando grandes quantidades de solventes (ignorando o princípio 5). Por esse motivo, algumas descobertas conseguem se adaptar bem a alguns princípios, mas quando todos são levados em consideração, é possível ver que o processo como um todo não é tão verde quando aparentava ser.

1.1 Catálise

A catálise é uma das estratégias mais estudadas para otimização de reações em diversas áreas (Ganesh et al., 2021). Ela se baseia no uso de substâncias conhecidas como catalisadores que oferecem um caminho alternativo para a reação ocorrer com menor energia de ativação e mais cineticamente favorável (Figura 2). Esse catalisador é então reestabelecido no final do processo.

Figura 2- Diagrama de energia demonstrando uma reação com e sem catalisador

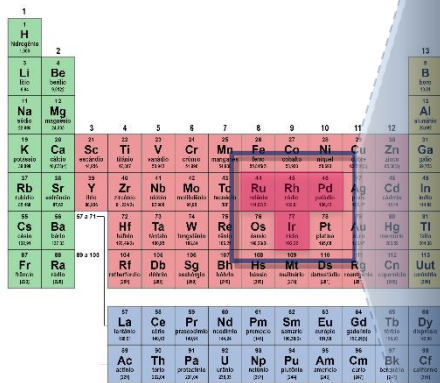


Fonte: Autor

Uma das áreas que faz bastante uso de catalisadores em suas reações é a química orgânica sintética, tendo como alguns exemplos complexos organometálicos, moléculas orgânicas, catalisadores metálicos inorgânicos, biocatalisadores, entre outros (Kosinov, 2024). Os metais do bloco d, comumente chamados de metais de transição, possuem uma habilidade única de transitar entre diferentes estados de oxidação, formando complexos e intermediários que não estariam acessíveis convencionalmente (Yorimitsu; Kotoru; Patil, 2021).

Uma das grandes áreas de aplicação desses catalisadores são nas reações de funcionalização de carbonos não ativados por meio de catalisadores metálicos de Pd(II), Rh(III), Ir(III) e Ru(II) (Doraghi et al., 2024; Joy et al., 2025; Moghadam Farid et al., 2022; Sherikar et al., 2021). Contudo, esses metais possuem alta toxicidade (Figura 3) e permanência no meio ambiente, comprometendo diversas gerações.

Figura 3- Tabela periódica destacando os elementos usados em catalisadores metálicos e suas respectivas toxicidades

	44 Ru rutênio 101,07(2)		Toxicidade renal, hepatotoxicidade, toxicidade cardíaca, estresse oxidativo, citotoxicidade (Savic et al., 2022).
	45 Rh ródio 102,91		Imunossupressor, toxicidade renal, estresse oxidativo e citotoxicidade (Oliveri Conti et al., 2024).
	46 Pd paládio 106,42		Imunotoxicidade, Toxicidade renal, Toxicidade cardiovascular, potencial procoagulante e inflamatório vascular reprodutivo (Oliveri Conti et al., 2024).
	77 Ir irídio 192,22		Estresse oxidativo, interferência com DNA, citotoxicidade (Kostova, 2025).

Fonte: Autor

Além disso, por serem elementos raros, sua extração e refino consomem enormes quantidades de energia e são extremamente poluentes. Dessa forma é possível perceber como, apesar de parecerem perfeitamente sustentáveis à primeira vista, a maior parte desses catalisadores propagam o exato oposto daquilo almejado pela Química Verde. Dessa maneira, fica clara a necessidade de catalisadores biodegradáveis, que operem em condições mais brandas e atóxicos, não somente para processos de funcionalização de ligações carbono não ativadas, mas também para toda a química orgânica sintética.

1.2 Biocatalisadores

Na busca por rotas sintéticas mais limpas e eficientes, a biocatálise tem se destacado como uma alternativa à catálise convencional. Esse método se baseia no

uso de biocatalisadores, como enzimas, microrganismos, e em alguns casos, até ácidos nucleicos e anticorpos (Winkler; Schrittwieser; Kroutil, 2021).

As enzimas são catalisadores naturais e biodegradáveis presentes em todas as áreas da vida. Elas são capazes de realizar reações mantendo alta seletividade em condições muito mais brandas do que as convencionais (France; Lewis; Martinez, 2023). Isso as torna candidatas perfeitas para o planejamento de rotas mais verdes, estando em concordância com 10 dos 12 princípios, sendo que os outros dois são mais voltados para os produtos do que para o planejamento reacional (Sheldon, 2024).

Para auxiliar a comunicação e tipagem de enzimas foi necessária a criação de um código de identificação simples e rápido capaz de diferenciar as diversas reações enzimáticas catalisadas de forma rápida. Para isso, foi criado *Enzyme Commission Number* ou EC, um código que possibilita informar qual a enzima está sendo discutida, sua reação geral e quaisquer detalhes pertinentes sobre seu mecanismo catalítico usando apenas quatro dígitos (Liu et al., 2025). Dessa forma, esse código é um grande facilitador na identificação de enzimas e pode auxiliar na busca por candidatas com potencial de catalisar a oxifuncionalização de carbonos não ativados, diminuindo drasticamente o escopo de enzimas que seriam necessárias analisar.

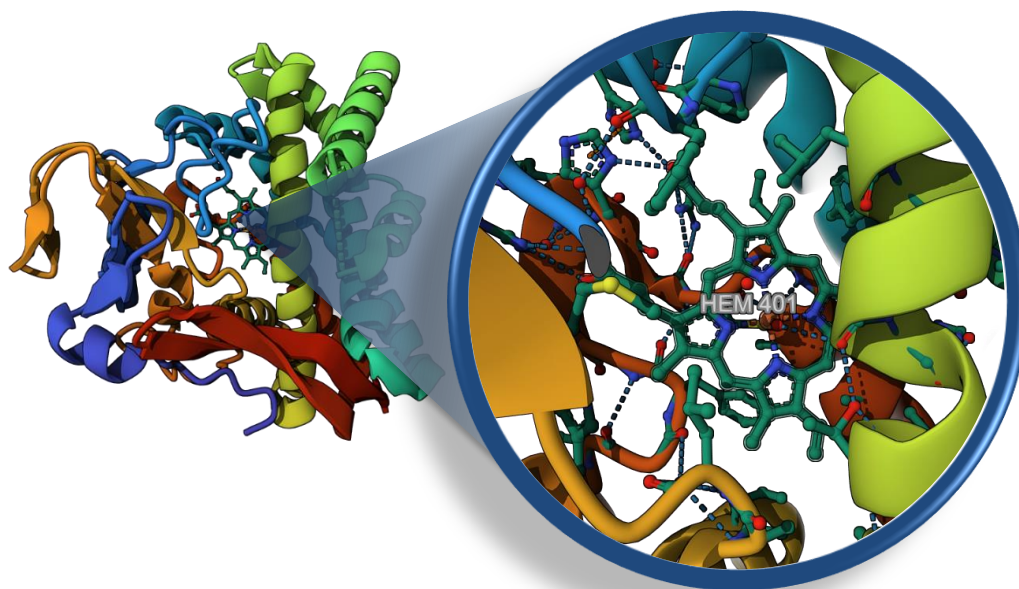
O primeiro dígito simboliza a principal classe à qual a enzima pertence, dando uma noção geral da sua reação, se ela é uma hidrólise ou oxirredução por exemplo. *O segundo*, descreve o composto ou grupo funcional envolvido, como álcoois, ésteres e outros. *O terceiro*, serve para especificar mais a fundo a reação com informações importantes, como por exemplo citando se há a necessidade de um cofator ou onde a reação irá ocorrer. *O quarto* e último informa qual substrato é naturalmente usado por elas, sendo útil para distinguir duas enzimas que catalisam reações de forma muito parecida.

As oxidoredutases são uma classe de enzimas responsáveis pela catálise de reações de transferência de elétrons entre um doador eceptor de elétrons (Cárdenas-Moreno et al., 2023). Dentre elas, as monooxigenases do citocromo P450 e as peroxigenases não específicas (UPO) vêm se destacando na funcionalização biocatalítica de carbonos não ativados por sua alta seletividade, estabilidade e promiscuidade. Contudo, suas diferenças ficam claras já ao analisar seus EC's, 1.14.13.X e 1.11.2.1 respectivamente. Essas diferenças serão abordadas mais profundamente a seguir.

1.2.1 Monooxigenases do citocromo P450

As monooxigenases do citocromo P450 (P450s ou CYP) são enzimas conhecidas e estudadas há décadas (Urlacher; Girhard, 2012). Elas são encontradas em diversos organismos e são pertencentes à superfamília do citocromo P450 (P450s ou CYP) com um grupo prostético heme característico (Dinis et al., 2019). Esse complexo com um Fe(III) (Figura 4) é essencial para o mecanismo de oxidação dessas enzimas, haja vista que é por meio dele que ocorre a formação do intermediário com um oxigênio molecular (O_2) (Zhang et al., 2020).

Figura 4- Representação da enzima monooxigenase do citocromo P450 e o seu grupo heme



Fonte: Figura adaptada de Robb et al., 2018

Contudo, para que esse intermediário Fe-O seja formado é necessária a ativação do centro metálico do grupo heme pela redução do Fe(III) com o NAD(P)H, passando para o estado ferroso (Fe(II)), só então pode haver a formação do complexo Fe-O (Mokhosoev et al., 2024; Xu; Hilberath; Hollmann, 2023). Isso torna o processo oxidativo das monooxigenases do citocromo P450 dependente do cofator NAD(P)H, o que é uma enorme desvantagem para processos enzimáticos em larga escala por conta do seu alto valor. Por esse motivo, apesar dessas enzimas terem dominado o campo da pesquisa para otimização de processos oxidativos de carbonos não ativados por muitos anos, fica clara a necessidade de um novo biocatalisador autossustentável, promíscuo e estável, aumentando significativamente sua aplicabilidade industrial.

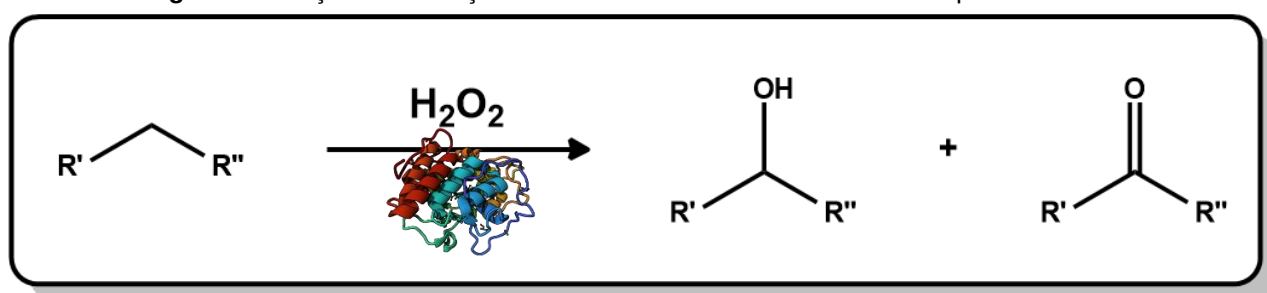
1.2.2 Peroxigenases

Uma nova enzima produzida pelo fungo *Agrocybe aegerita*, também conhecido como Pioppino foi descoberta em 2004 por Ullrich René e colaboradores. Esse fungo normalmente pode ser encontrado em regiões de clima temperado nos troncos e cascas de diversas árvores, sendo ele o responsável pela decomposição de madeira (René et al., 2004). Inicialmente, esse catalisador foi classificado como uma haloperoxidase, devido a sua descoberta capacidade de halogenar compostos orgânicos (René et al., 2004).

No entanto, estudos posteriores deixaram claro que sua principal característica e reação catalisada naturalmente era uma ampla gama de reações de oxidação utilizando exclusivamente peróxido de hidrogênio como agente oxidante (Hilberath et al., 2023). Dessa forma, a enzima passou a ser reconhecida como uma peroxigenase inespecífica com o EC 1.11.2.1 (Ebner et al., 2023).

Isso significa que ela catalisa reações de oxidorredução, incorporando diretamente um átomo de oxigênio ao substrato vindo de um peróxido aceitor de elétrons (Figura 5). O termo “inespecífica” de seu nome serve para representar a ampla gama de substratos aos quais a enzima pode oxidar, demonstrando sua alta promiscuidade catalítica, uma característica muito desejada industrialmente (Leveson-Gower; Mayer; Roelfes, 2019).

Figura 5- Reação de oxidação de carbonos não ativados catalisada por UPO

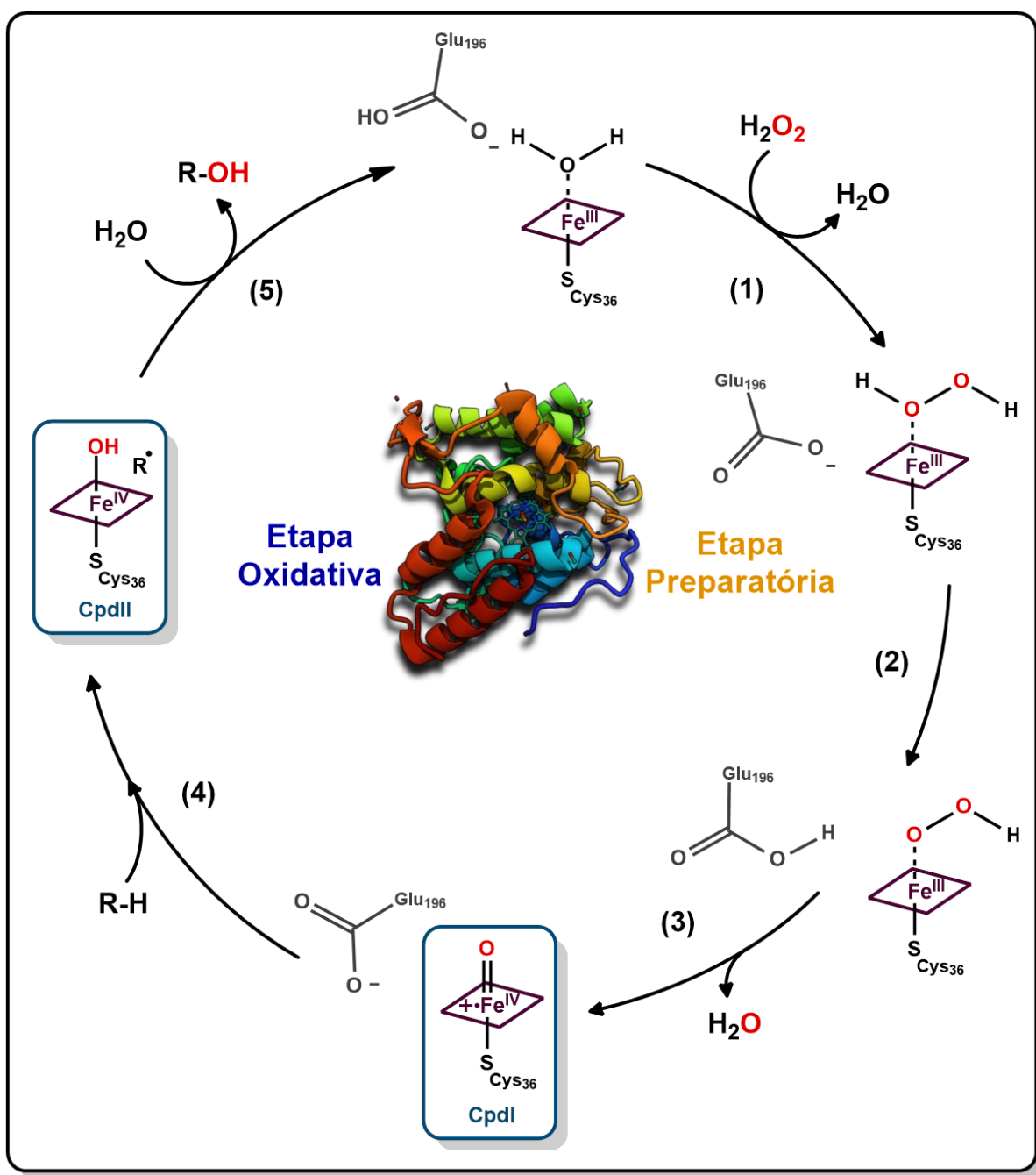


Fonte: Autor

Ainda não há total consenso sobre o mecanismo dessa reação entre os pesquisadores da área. Contudo, é possível dizer que a reação provavelmente ocorre basicamente em duas etapas: a *Etapa Preparatória* e a *Etapa Oxidativa* (Figura 6). Na primeira metade do ciclo o Fe(III) do grupo heme estabilizado pelo resíduo de Cys36 se liga ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que então rompe a ligação entre os dois

oxigênios, com o auxílio do resíduo de Glu196, formando o *Composto 1* (Cpd1), essencial para o processo de oxidação. Então se dá início a *Metade Oxidativa* do processo, na qual o Cpd1 abstrai um próton do substrato, acarretando na formação do *Composto 2* (Cpd2) protonado. Por fim, o produto final oxidado é obtido através de um mecanismo de rebote de oxigênio (Costa; Liang, 2023).

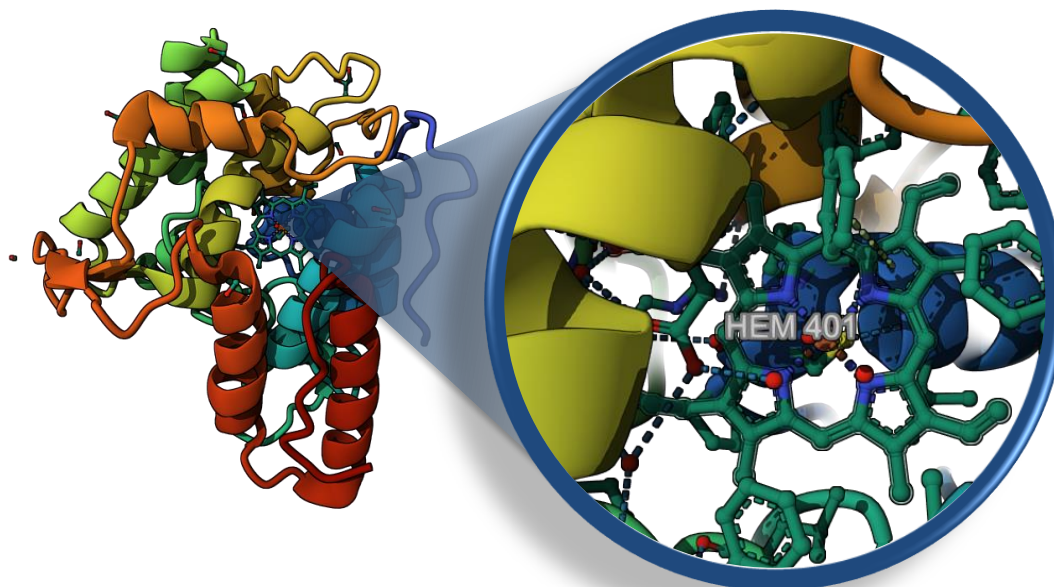
Figura 6- Ciclo catalítico da UPO



Fonte: Figura adaptada de Costa; Liang, 2023.

Assim, é possível perceber que apesar de possuírem o mesmo grupo prostético heme (Figura 7) que as P450s, as UPOs não necessitam de cofatores para catalisar as reações de oxidação, fazendo uso somente do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na qual o oxigênio já está pré-reduzido em seu mecanismo catalítico (Münch et al., 2023).

Figura 7- Representação da enzima AaeUPO e o seu grupo heme



Fonte: Figura adaptada de Ramirez-Escudero et al., 2018

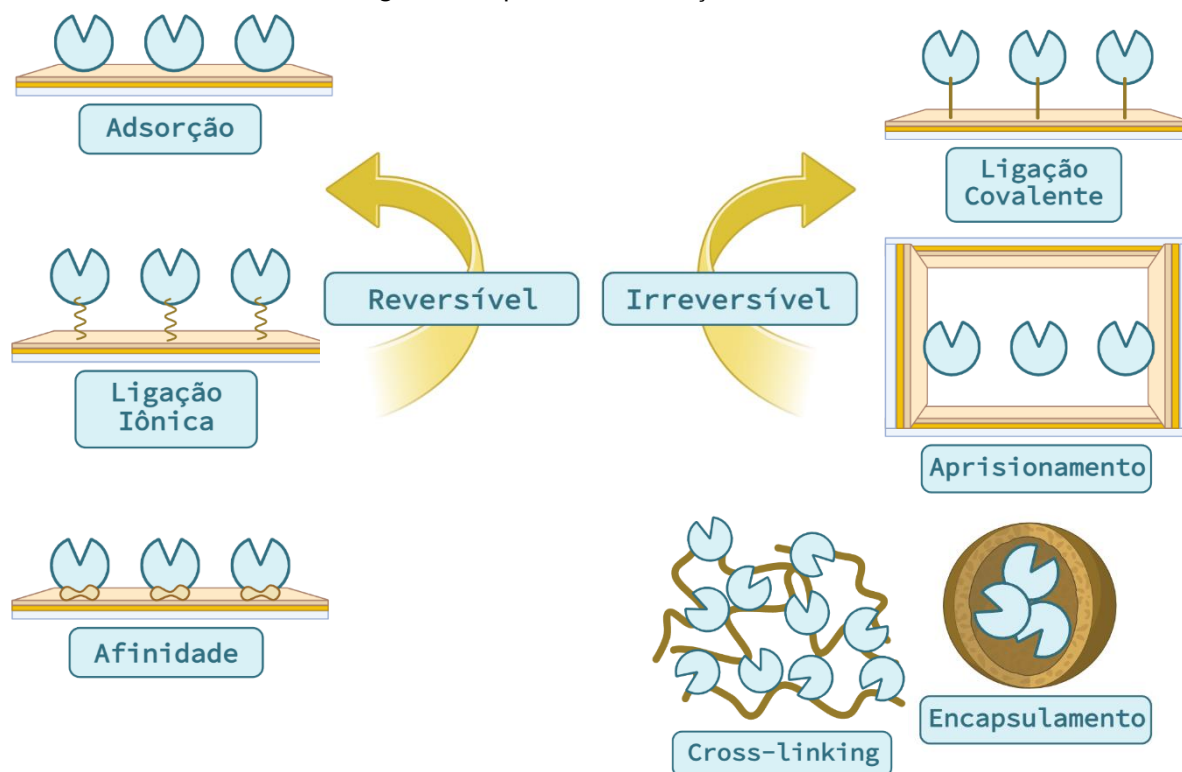
Contudo, a utilização de enzimas livres apresenta problemas intrínsecos de remediação, reutilização e estabilidade dos catalisadores. Para resolver essas dificuldades a principal estratégia empregada atualmente é a imobilização enzimática (Maghraby et al., 2023).

1.3 Imobilização enzimática

A imobilização enzimática é uma estratégia muito utilizada industrialmente como uma solução sustentável, econômica e facilmente escalonável para problemas clássicos da catálise homogênea (Mirsalami; Mirsalami; Ghodousian, 2024). Nela as enzimas são fixadas a um suporte sólido ou confinadas em uma matriz, de modo que continuem funcionais, mas possuam maior estabilidade térmica e a solventes orgânicos e maior facilidade de recuperação do biocatalisador. Tornando-se um catalisador heterogêneo e facilitando a sua recuperação do meio reacional e até mesmo de reuso em vários ciclos (Robescu; Bavaro, 2025).

Atualmente, várias técnicas de imobilização enzimática são conhecidas (Maghraby et al., 2023) (Figura 8). No entanto, dentre elas os métodos físicos, que envolvem interações não covalentes para fixar as enzimas, e os métodos químicos, como a ligação covalente e a reticulação, estão entre os mais utilizados (Patti et al., 2025).

Figura 8 - Tipos de imobilização enzimática



Fonte: Figura adaptada de Maghraby et al., 2023

A seguir algumas definições das principais técnicas de imobilização atuais, segundo Maghraby et al., serão discutidas mais a fundo.

- 1. Adsorção:** um processo reversível, simples e de baixo custo no qual uma enzima é fisicamente adsorvida a um suporte sólido, como por exemplo resinas de troca iônica, carvão ativado e alumina, por meio de interações intermoleculares, como forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio. No entanto, essa fraca interação gera uma chance de perda de atividade da enzima pela sua separação do suporte, dificultando a reutilização do biocatalisador.
- 2. Ligação iônica:** também é um método reversível e econômico baseado na atração entre cargas opostas na superfície da enzima e no suporte. Essa ligação pode ser

desfeita por meio de mudanças de temperatura ou força iônica da solução, como nos fenômenos de *salting out*. Porém, essa técnica pode induzir mudanças estruturais na enzima, afetando negativamente sua atividade ou até levando à desnaturação devido à carga necessária do suporte.

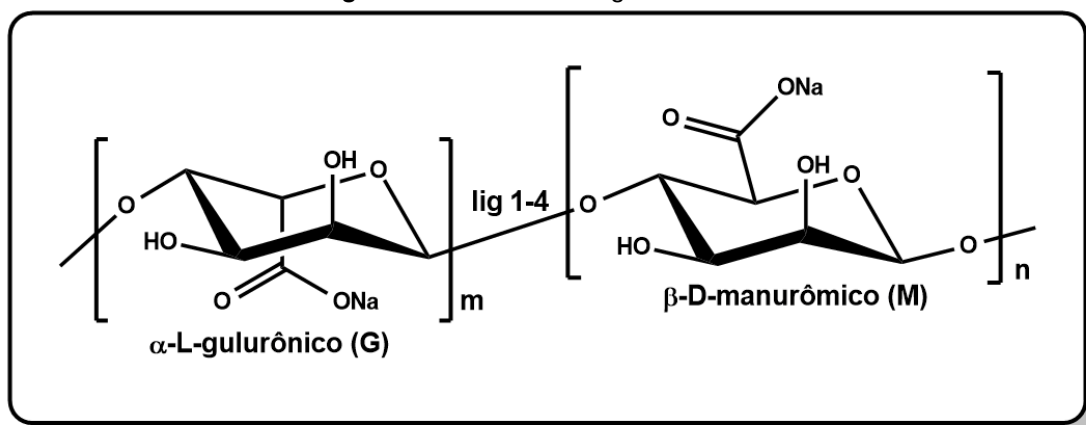
3. **Aprisionamento:** consiste em prender uma enzima dentro de uma matriz polimérica ou estrutura porosa, sem ligação direta entre o biocatalisador e o suporte. Ela é considerada irreversível, suporta alta carga enzimática, possui boa estabilidade mecânica e pouca separação da enzima. Um fator muito importante é o controle do tamanho dos poros da matriz, que deve permitir a passagem do substrato e produtos sem que a enzima escape. Entre as suas limitações estão aquelas relacionadas aos poros da matriz, sendo elas a possível dificuldade de difusão dos reagentes e perda da enzima.
4. **Encapsulamento:** é uma técnica bem semelhante ao aprisionamento, com a diferença de que, neste caso, a enzima é confinada por membranas ou paredes semipermeáveis, não permitindo a difusão da enzima dentro da encapsulação. Essa restrição de mobilidade dentro das cápsulas aumenta a interface superficial entre a enzima e substrato, favorecendo a cinética da reação.

Seguindo os princípios da Química Verde, o planejamento de rotas sintéticas menos nocivas para o meio ambiente e a vida humana não deve se concentrar somente nos catalisadores usados, mas também na matriz de imobilização, principalmente para processos voltados para as indústrias farmacêuticas e alimentícias, nas quais meios de imobilização tóxicos podem ter efeitos devastadores.

1.3.1 Alginato

O alginato é um biopolímero natural que se destaca na imobilização enzimática devido a sua alta biocompatibilidade, baixo custo, facilidade de manipulação e acima de tudo por não ser tóxico aos seres humanos e facilmente biodegradado (Teng et al., 2021). Ele pode ser extraído de algas marrons capazes de produzir polissacarídeos lineares feitos de ligações 1-4 entre os ácidos manurônico e L-gulurônico (Figura 9) (Vatanpour et al., 2022).

Figura 9- Estrutura do alginato de sódio



Fonte: Figura adaptada de Vatanpour et al., 2022

Porém, o alginato por si só não é capaz de formar matrizes tridimensionais para imobilização, para isso é feito um processo de encapsulamento por gelificação ianotrópica. Esse processo é feito pingando uma solução de alginato e enzima através de uma seringa numa solução de um cátion bivalente, normalmente íons Ca^{2+} . Nesse momento ocorre a troca dos íons Na^+ presentes em sua estrutura pelos cátions Ca^{2+} da solução, promovendo a formação de várias ligações cruzadas, ou *crosslinking* como é normalmente chamado (Weng et al., 2023). Dessa forma, a antiga estrutura linear é transformada em uma matriz tridimensional e altamente porosa com caráter hidrofílico, tornando-se uma facilitadora para difusão de substratos em meio aquoso.

Dado a inativação intrínseca das enzimas UPO perante o uso de maiores concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a imobilização em alginato vem ganhando alta relevância como uma alternativa eficiente e sustentável para contornar essa baixa estabilidade (Hobisch et al., 2021). A estrutura criada pela matriz de alginato forma uma barreira protetora, além de auxiliar na recuperação e reutilização do biocatalisador (Hobisch et al., 2020).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar e desenvolver protocolos de estabilização enzimática, tendo como principal estratégia a imobilização de enzimas classe das peroxigenases não específicas (EC 1.11.2.1), com destaque para a enzima originária do fungo *Agrocybe aegerita* (AaeUPO). A proposta visou à otimização da oxidação catalítica do etilbenzeno, com foco na obtenção sustentável de compostos benzílicos oxidados. Todas as etapas do estudo foram planejadas de forma a manter plena consonância com os 12 Princípios da Química Verde, contribuindo para o desenvolvimento de rotas sintéticas mais seguras, eficientes e ambientalmente responsáveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A enzima peroxigenase não específica de *Agrocybe aegerita* (AaeUPO) na forma de pó liofilizado de líquido de fermentação usada durante todo esse projeto foi gentilmente fornecida pelo Professor Dr Aitao Li da Escola de Ciências da Vida da Universidade de Hubei em Wuhan, China.

Os reagentes NBD (1,2-(metilenodióxi)-4-nitrobenzeno) (98,0%), ABTS (sal diamônico(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) ($\geq 98,0\%$), água ultra pura, 1-feniletanol (98,0%), etilbenzeno (99,8%) e alginato de sódio foram adquiridos junto à empresa Sigma-Aldrich®. O Tris (Hidroximetil) Aminometano (grau P.A.), acetonitrila (grau P.A.), fosfato de sódio bibásico anidro (grau P.A.), cloreto de cálcio anidro dessecante (grau P.A.) e acetato de etila (grau P.A.) foram adquiridos junto à empresa Neon®. O peróxido de hidrogênio (50% 200V) e sulfato de sódio anidro (grau P.A.) foram adquiridos junto à empresa Êxodo Científica®. O fosfato de sódio monobásico monohidratado (grau P.A.) e ácido cítrico anidro (grau P.A.) foram adquiridos junto à empresa Synth®.

3.2 Análises cromatográficas

3.2.1 Gas Chromatography – Flame Ionization Detector – GC-FID

As análises foram feitas por meio de cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID – *Gas Chromatography - Flame Ionization Detector*) em um cromatógrafo gasoso de modelo GC-2010 Plus da marca Shimadzu® com injetor automático modelo AOC-20i acoplado a um detector por ionização em chama junto ao Milagre Lab (Instituto de Química, UNESP Araraquara). A coluna usada foi a HP-5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , 5%-difenil, 95%-dimetilpolisiloxano) da marca Agilent®. O cromatógrafo operou com um fluxo de gás H_2 constante de 1,22 mL min^{-1} . As temperaturas do injetor e detector foram 260°C e 280°C respectivamente. O volume de injeção da amostra foi de 1,0 μL com uma concentração aproximada de 0,5 a 1,0 mg mL^{-1} , em modo *split* (100:1). A temperatura programada foi de 3 minutos a 80°C, seguida de uma rampa de aquecimento de 80°C a 280°C a 30°C min^{-1} e mantido em 280°C durante 5 minutos (Método A)

As conversões foram calculadas usando as áreas relativas de cada composto no espectro segundo a equação 1:

$$C(\%) = \left[\frac{\text{Área do produto}}{(\text{Área do substrato} + \text{Área do produto})} \right] * 100 \quad (1)$$

3.2.2 Gas Chromatography – Mass Spectrometry – GC-MS

As análises foram feitas por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) junto ao Laboratório Multiusuário I de Análises Químicas do Instituto de Química, UNESP Araraquara. Foi utilizado um equipamento da marca Agilent® modelo 7890B acoplado a espectrômetro de massas modelo 5977A, com fonte de ionização por elétrons a 70 eV e operando na faixa de m/z 40-500. A coluna utilizada foi a HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 m, 5% fenil-metilsiloxano) da marca Agilent®. O cromatógrafo operou com um fluxo de gás He constante de 1,00 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e da interface foram 260°C e 280°C respectivamente. O volume de injeção da amostra foi de 1,0 µL com uma concentração aproximada de 0,5 a 1,0 mg mL⁻¹, em modo *split* (100:1). A temperatura programada para o primeiro método foi de 3 minutos a 80°C, seguida de uma rampa de aquecimento de 80°C a 280°C a 30°C min⁻¹ e mantido em 280°C durante 5 minutos (Método B). A temperatura programada para o segundo método foi de 3 minutos a 50°C, seguida de uma rampa de aquecimento de 50°C a 280°C a 30°C min⁻¹ e mantido 280°C durante 5 minutos (Método C).

3.3 Atividade enzimática

Todas as medidas da atividade enzimática da enzima AaeUPO foi determinada usando um espectrofotômetro da marca Bel Engineering® modelo SP 1105 equipado com uma lâmpada de tungstênio e cubeta de vidro (45 mm x 12,5 mm x 12,5 mm) com 10 mm de caminho óptico e 3,5 mL de volume.

Para todas as medidas o branco foi feito sem a presença dos agentes redutores, sendo usado somente a solução de enzima e tampão devido a sua coloração forte e alta absorbância nas regiões de monitoramento.

As atividades foram calculadas segundo a fórmula 2:

$$U = \frac{N.V_{total}.\Delta A.10^3}{V_{enzima}.\epsilon.T.L} \quad (2)$$

N: Fator de diluição da solução de enzima;

V_{total} : Volume total da reação (mL);

ΔA : Diferença de absorbância da solução no comprimento de onda determinado;

V_{enzima} : Volume da solução de enzima adicionada (mL);

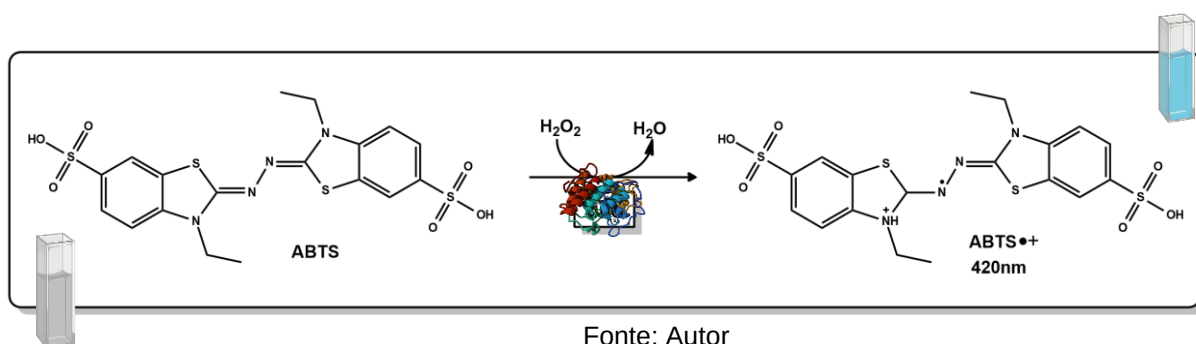
ϵ : Coeficiente de absorvância molar no respectivo comprimento de onda ($M^{-1}cm^{-1}$);

T: tempo da reação (min);

L: diâmetro da cubeta (cm).

3.3.1 Atividade enzimática com sal diamônico(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS)

Figura 10- Esquema da reação do ABTS com a UPO para atividade enzimática



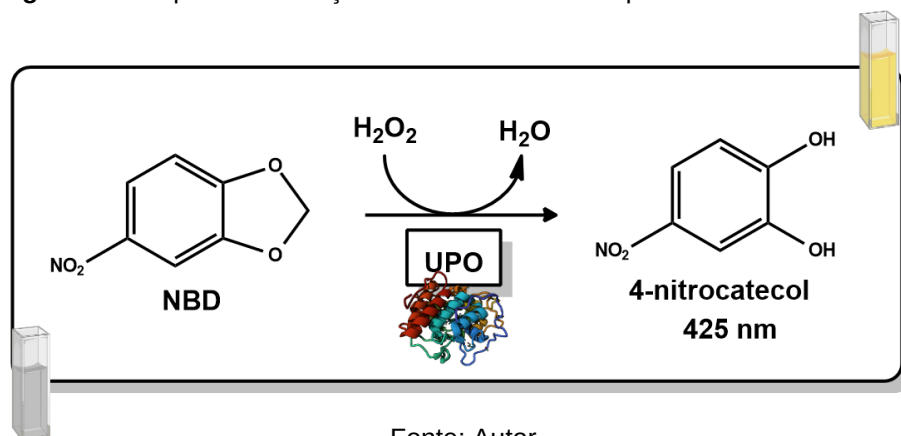
A uma cubeta foram adicionados 2,55 mL de tampão citrato pH 4,4 100 mmol L^{-1} , 150 μL de uma solução de enzima (0,03g) em água ultra e 150 μL de solução de ABTS em acetonitrila (10 mmol L^{-1}), e foi medida a absorvância inicial (A_0). Então, a reação foi iniciada com a adição de 150 μL de uma solução de H_2O_2 (40 mmol L^{-1}). A formação do produto (Figura 10) foi determinada monitorando o aumento da absorvância em 420 nm durante 1 min com o coeficiente de absorvância molar 36.000 $M^{-1}cm^{-1}$.

3.3.2 Atividade enzimática com 1,2-(metilenodióxio)-4-nitrobenzeno (NBD)

Para determinar a concentração enzimática ideal para a atividade foram preparadas cinco soluções enzima em água ultra pura com diferentes concentrações: 30 mg mL⁻¹, 3 mg mL⁻¹, 0,3 mg mL⁻¹, 0,15 mg mL⁻¹ e 0,03 mg mL⁻¹.

A fim de assegurar a homogeneidade da solução no espectrofotômetro, todas as reações foram realizadas em um balão de fundo redondo de 5 mL sob agitação magnética por um minuto. Ao final do tempo a solução foi transferida para uma cubeta de vidro para serem feitas as medidas.

Figura 11- Esquema da reação do NBD com a UPO para atividade enzimática



Fonte: Autor

Ao balão foram adicionados 300 µL de enzima em água ultra pura, 1,5 mL de tampão fosfato (pH 7, 50 mmol L⁻¹), 870 µL de água deionizada e 300 µL de solução de NBD em acetonitrila (0,5 mmol L⁻¹). Então, a reação foi iniciada com a adição de 30 µL de uma solução de H₂O₂ (0,1 mol L⁻¹) e foi medida a absorbância inicial. A formação do produto (Figura 11) foi determinada monitorando o aumento da absorbância em 425 nm durante 1 min com o coeficiente de absorbância molar 9.700 M⁻¹cm⁻¹.

3.4 Reações de Oxidação Biocatalíticas catalisadas por AaeUPO

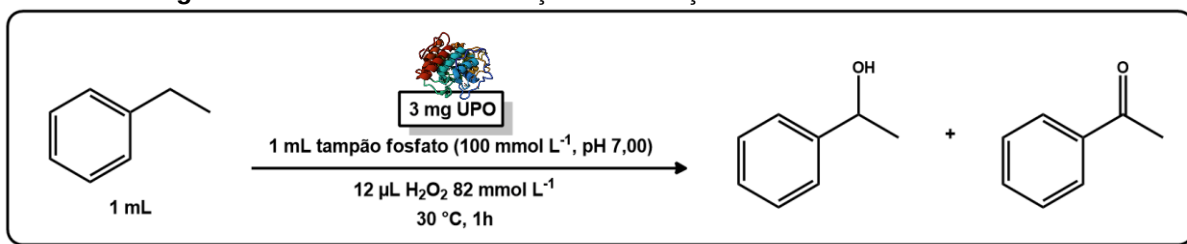
3.4.1 Procedimentos gerais

O monitoramento das reações foi feito em tempo real por GC-FID (Método A) ou GC-MS (Método B e C) e o preparo das amostras foi realizado por meio de microextrações com auxílio de uma centrífuga de bancada. Alíquotas de 100 µL da reação foram transferidas para tubos Eppendorf® contendo 500 µL de acetato de etila

e 500 μL de água deionizada, do qual a fase orgânica foi retirada, seca com sulfato de sódio anidro e levada para análise.

3.4.2 Primeiro teste da reação de oxidação do etilbenzeno com AaeUPO

Figura 12- Primeiro teste da reação de oxidação do Etilbenzeno com a UPO



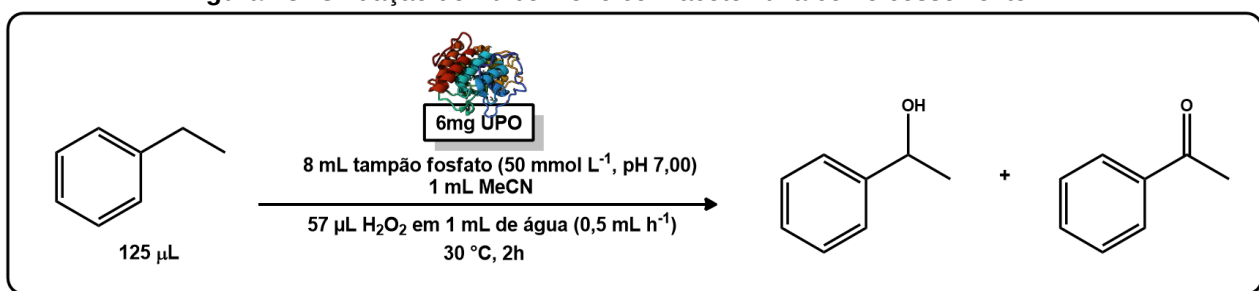
Fonte: Autor

A um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 1 mL de etilbenzeno e 1 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,00) contendo 3 mg mL⁻¹ de biocatalisador. A reação foi iniciada com a adição de 12 μL de uma solução de H₂O₂ 82 mmol L⁻¹ e mantida a 30 °C em agitação magnética vigorosa durante 1 h (Figura 12).

Foram retiradas alíquotas em 20 min e 1 h de reação. Nesse momento, não foram detectadas quantidades consideráveis do produto.

3.4.3 Teste da reação de oxidação do etilbenzeno com acetonitrila e heptano como cossolventes

Figura 13- Oxidação do Etilbenzeno com acetonitrila como cossolvente



Fonte: Autor

A um balão de fundo redondo de duas bocas foram adicionados 6mg da UPO em 8mL de tampão fosfato (50 mmol L⁻¹, pH 7,00), então uma solução de 125 μL de etilbenzeno em 1 mL de acetonitrila foi adicionada. Foi adicionada uma solução de 57

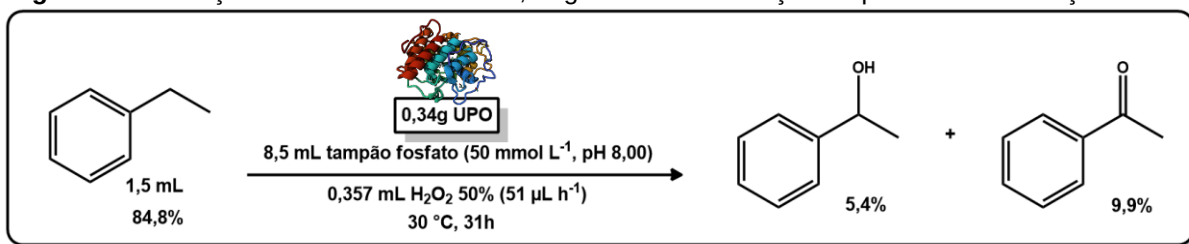
μL de H_2O_2 em 1 mL de água deionizada num fluxo de $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ com o auxílio de uma bomba de seringa da marca kdScientific® modelo *KDS 100 Legacy Syringe Pump* com uma seringa de vidro de 5mL da marca Becton Dickson®. A reação foi mantida a 30°C em agitação magnética vigorosa durante 2 h (Figura 13).

Foram retiradas alíquotas em 1 e 2 h. Nesse momento, não foram detectadas quantidades consideráveis do produto.

Esse procedimento foi testado outras vezes, uma vez usando 70 mg de enzima e outra heptano como cossolvente, não foram detectadas quantidades consideráveis de produto nas alíquotas analisadas. Ao final da reação foi feita uma extração líquido-líquido com acetato de etila, a fase orgânica foi coletada e rotoevaporada em um rotaevaporador da marca IKA®, modelo IKA RV10. Contudo, ao final não foi possível recuperar nada no balão.

3.4.4 Oxidação do Etilbenzeno com adição de peróxido manual

Figura 14- Oxidação do Etilbenzeno com 0,34 g de enzima e adição de peróxido com adição manual



Fonte: Autor

A um balão de fundo redondo foram adicionados 0,34 g da UPO em dissolvida em 8,5 mL de tampão fosfato (50 mmol L⁻¹, pH 8,00) então, 1,5 mL de etilbenzeno foram adicionados. A reação foi iniciada com 51 μL da solução estoque de peróxido de hidrogênio 50%, as subseqüentes adições foram feitas a cada 1h, amontoando um total de 7 horas de adição com um volume de 0,357 mL de peróxido de hidrogênio 50% no total. A reação foi mantida a 30°C em agitação magnética vigorosa durante as 7 h de adição mais 24 h de reação, totalizando 31 h de reação (Figura 14).

O monitoramento da reação foi feito por GC-MS em 12 e 24 h após o término da adição, nos quais foi detectada uma conversão total máxima de 15,2%, não havendo aumento entre as análises. Ao final da reação o meio reacional foi igualmente dividido entre tubos Falcon contendo acetato de etila e levados a uma centrífuga da marca Fanem® modelo EXCELSA II MODEL 206 BL. Durante 1 min a fase orgânica

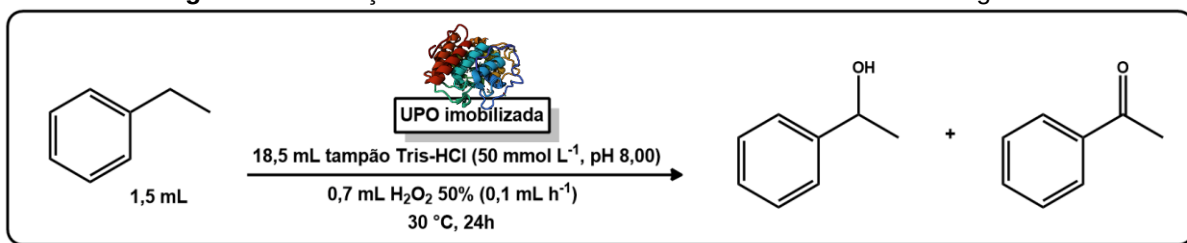
foi coletada, seca com sulfato de sódio anidro e rotoevaporada em um rotaevaporador da marca IKA®, modelo IKA RV10. A conversão em massa recuperada após a extração foi de 11,72%.

3.4.5 Imobilização enzimática com alginato de sódio

Para a imobilização enzimática da AaeUPO em esferas de alginato de sódio foram solubilizados 0,34 g de enzima em 1 mL de água ultra-pura, essa solução foi combinada com uma segunda, previamente preparada de 3,125% (m/v) alginato de sódio em 4 mL água deionizada, dando uma concentração final de 2,5% (m/v). Essa mistura foi então extrudada em solução de cloreto de cálcio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com o auxílio de uma bomba de seringa da marca kdScientific® modelo *KDS 100 Legacy Syringe Pump* com uma seringa de plástico de 10mL da marca Becton Dickson®. Após o término da extrusão da solução de enzima em alginato, as esferas formadas foram mantidas na solução de CaCl_2 com agitação magnética durante 1h. Após o término da primeira hora as esferas foram retiradas da solução, lavadas e transferidas para uma segunda solução de CaCl_2 de mesma concentração por mais uma hora. Por último, as esferas foram filtradas, lavadas e armazenadas na geladeira em tubos Falcon contendo tampão Tris-HCl pH 8,00 50 mmol L^{-1} durante a noite para serem usadas na manhã seguinte.

3.4.6 Oxidação do Etilbenzeno com AaeUPO imobilizada em alginato

Figura 15- Oxidação do Etilbenzeno com AaeUPO imobilizada em alginato



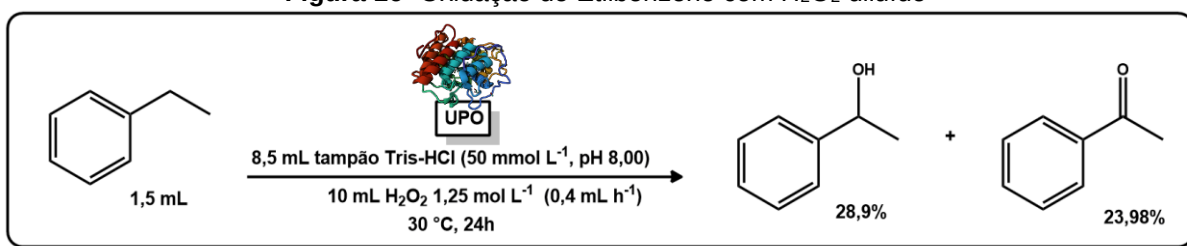
Fonte: Autor

Em um balão de fundo redondo de 50 mL de duas bocas foram adicionadas todas as esferas imobilizadas da enzima AaeUPO em alginato de sódio com 18,5 mL

de tampão Tris-HCl pH 8,00 50 mmol L⁻¹. Em seguida foram adicionados 1,5 mL de etilbenzeno. Para iniciar a reação foi adicionado 0,7 mL da solução estoque de H₂O₂ (50%) com um fluxo de 0,1 mL h⁻¹ e auxílio de uma bomba de seringa da marca kdScientific® modelo *KDS 100 Legacy Syringe Pump* com uma seringa de vidro de 5mL da marca Becton Dickson®. A reação foi mantida a 30 °C em agitação magnética vigorosa (Figura 15). A reação foi monitorada por GC-MS a cada hora durante 6 h, não foi detectada formação de produtos.

3.4.7 Oxidação do Etilbenzeno com uma solução diluída de peróxido de hidrogênio

Figura 16- Oxidação do Etilbenzeno com H₂O₂ diluído



Fonte: Autor

Em um balão de fundo redondo de 50 mL de duas bocas foram adicionados 0,34 g de enzima em 8,5 mL de tampão Tris-HCl pH 8,00 50 mmol L⁻¹. Em seguida foram adicionados 1,5 mL de etilbenzeno. Para iniciar a reação foram adicionados 10 mL de uma solução de H₂O₂ 1,25 mol L⁻¹ com um fluxo de 0,4 mL h⁻¹ com o auxílio de uma bomba de seringa da marca kdScientific® modelo *KDS 100 Legacy Syringe Pump* com uma seringa de vidro de 20 mL da marca Becton Dickson®. A reação foi mantida a 30 °C em agitação magnética vigorosa durante 24h (Figura 16). O monitoramento da reação foi feito por GC-FID a cada hora, de 1 até 3h, de 18 a 21h e 24h, e foi detectada uma conversão total máxima de 52,89% em 24h.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática da enzima AaeUPO fornecida pelo Prof. Dr. Aitao Li em pó liofilizado foi feita usando duas metodologias, uma usando o sal diamônico 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Martin-Diaz et al., 2021) e outra com 1,2-(metilenodióxi)-4-nitrobenzeno (NBD). Em ambos os casos foi constatada alta absorção pelo extrato enzimático no comprimento de onda analisado. Sendo assim, os brancos reacionais para zerar o equipamento foram feitos somente com a enzima e tampão.

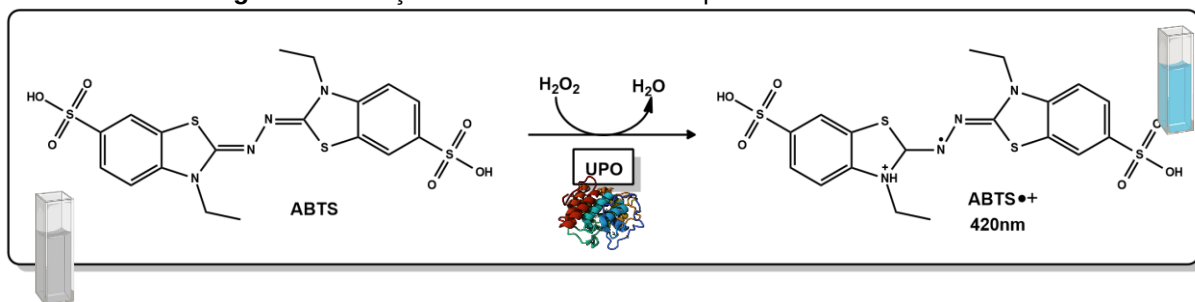
Os primeiros testes foram conduzidos com o ABTS, esses testes iniciais serviram como base para entender a absorbância da enzima devido à sua forte coloração (Figura 17), levando ao aperfeiçoamento das futuras metodologias.

Figura 17- Coloração das enzimas a) Soluções enzimáticas e suas diferentes colorações; b) Enzima AaeUPO em pó liofilizado do extrato enzimático



Fonte: Autor

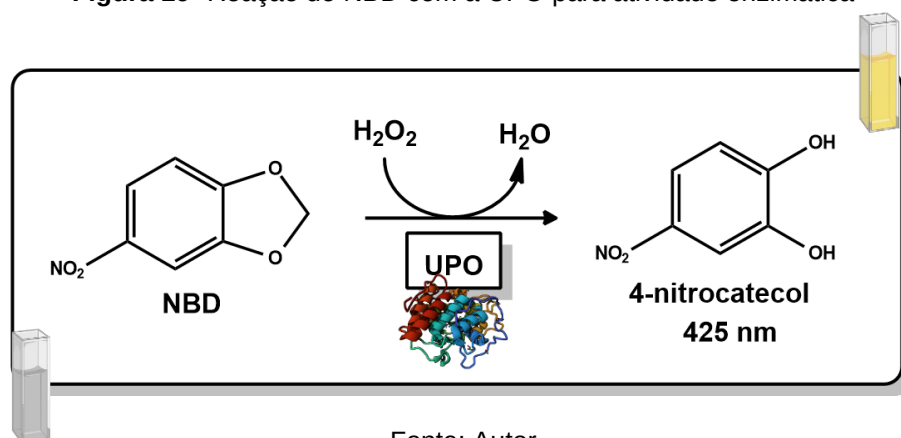
A reação foi iniciada com a adição de 150 μL de uma solução de H_2O_2 (40 mmol L^{-1}). A enzima oxidou o ABTS para $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (Figura 18), mudando a coloração da solução para um verde-azulado. O avanço da oxidação foi monitorado pelo aumento da absorbância em 420 nm ao final de 1 minuto. Nesse primeiro momento foi possível perceber como a falta de agitação na cubeta de vidro gerava uma solução não homogênea, apresentando diferentes colorações em certos pontos, o que afeta as medidas espectrofotométricas. O valor de U calculado usando a equação 2 para a oxidação do ABTS pela AaeUPO foi 0,210 U.

Figura 18- Reação do ABTS com a UPO para atividade enzimática

Fonte: Autor

As informações coletadas foram repassadas para o Prof. Dr. Aitao Li, o qual enviou um procedimento usando o 1,2-(metilenodióxido)-4-nitrobenzeno (NBD) para atividade enzimática e parâmetros reacionais para a oxidação do etilbenzeno com a AaeUPO.

A reação de oxidação do NBD foi acompanhada por meio da formação do produto 4-nitrocatecol, que apresenta coloração amarela distinta e absorvância em 425 nm (Figura 19). Para assegurar a homogeneidade da coloração na cubeta todas as reações foram conduzidas em balões de fundo redondo sobre uma placa de agitação magnética e posteriormente transferidos para uma cubeta de vidro ao final de 1 minuto para a análise dos valores de absorvância, gerando desvios bem menores do que os observados com o ABTS.

Figura 19- Reação do NBD com a UPO para atividade enzimática

Fonte: Autor

Seguindo as informações coletadas do primeiro teste da atividade, as medidas com os novos parâmetros com o NBD foram feitas usando diferentes concentrações de enzima. O uso de concentrações menores provou ser uma ótima estratégia contra o problema da interferência nas medidas pela absorvância da solução enzimática. Os resultados das medidas da atividade enzimática estão representados na Tabela 1.

Tabela 1- Resultados das medidas da atividade enzimática com o NBD para soluções de concentração 30mg mL⁻¹, 3mg mL⁻¹, 0,3 mg mL⁻¹ e 0,15 mg mL⁻¹

30 mg mL ⁻¹			3 mg mL ⁻¹			0,3 mg mL ⁻¹			0,15 mg mL ⁻¹		
A ₍₀₎	A _(f)	ΔA	A ₍₀₎	A _(f)	ΔA	A ₍₀₎	A _(f)	ΔA	A ₍₀₎	A _(f)	ΔA
0,005	0,069	0,064	0,004	0,399	0,395	0,013	0,4	0,387	0,015	0,386	0,371
0,005	0,068	0,063	0	0,41	0,41	0,013	0,404	0,391	0,011	0,413	0,402
0,009	0,067	0,058	0,003	0,412	0,409	0,012	0,398	0,386	0,011	0,388	0,377
Médias			Médias			Médias			Médias		
0,006	0,068	0,062	0,002	0,407	0,405	0,013	0,4007	0,388	0,012	0,3957	0,383
Desvio padrão			Desvio padrão			Desvio padrão			Desvio padrão		
0,0023	0,0010	0,0032	0,0021	0,0070	0,0084	0,0006	0,0031	0,0026	0,0023	0,0150	0,0164

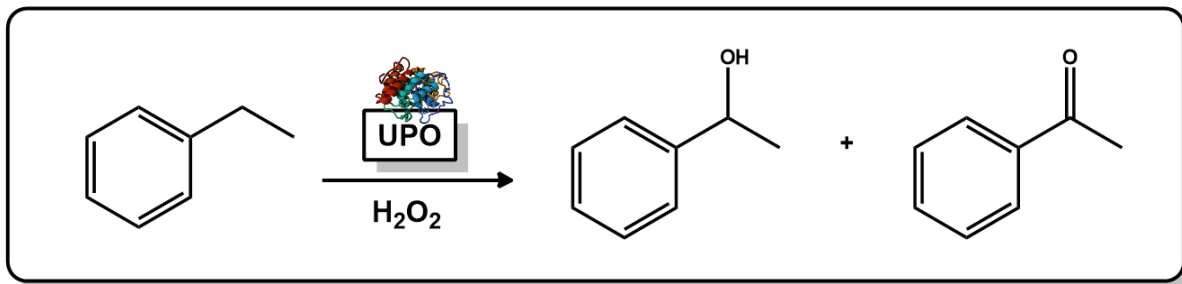
Fonte: Autor

A concentração de 0,03 mg mL⁻¹ apresentou um ΔA muito baixo, por esse motivo não foram feitas mais medidas nesse valor. A concentração escolhida para o cálculo da atividade foi a com a solução com a segunda menor concentração (0,15 mg mL⁻¹ e fator de diluição 200). Nesse valor a interferência da coloração da enzima foi bem menor do que a inicial (30 mg mL⁻¹). O valor encontrado da atividade enzimática da AaeUPO para oxidação do NBD usando a equação 2 foi de 78,97 U. Usando as informações fornecidas pelo Prof. Dr. Aitao Li, esse valor foi convertido em uma concentração enzimática de 8,77 μM.

4.2 Primeiro teste da reação de oxidação do etilbenzeno com AaeUPO

O primeiro teste da reação de oxidação do etilbenzeno (Figura 20) foi realizado sem os valores da atividade enzimática. Isso foi feito, pois era somente desejado testar a reatividade da enzima perante o etilbenzeno seguindo algumas metodologias descritas na literatura. Para isso foi escolhido usar 1 mL de uma solução de 30 mg de enzima em 10 mL de tampão, com uma concentração enzimática final de 3 mg mL⁻¹.

Figura 20- Reação de oxidação do etilbenzeno com a AaeUPO e seus produtos esperados



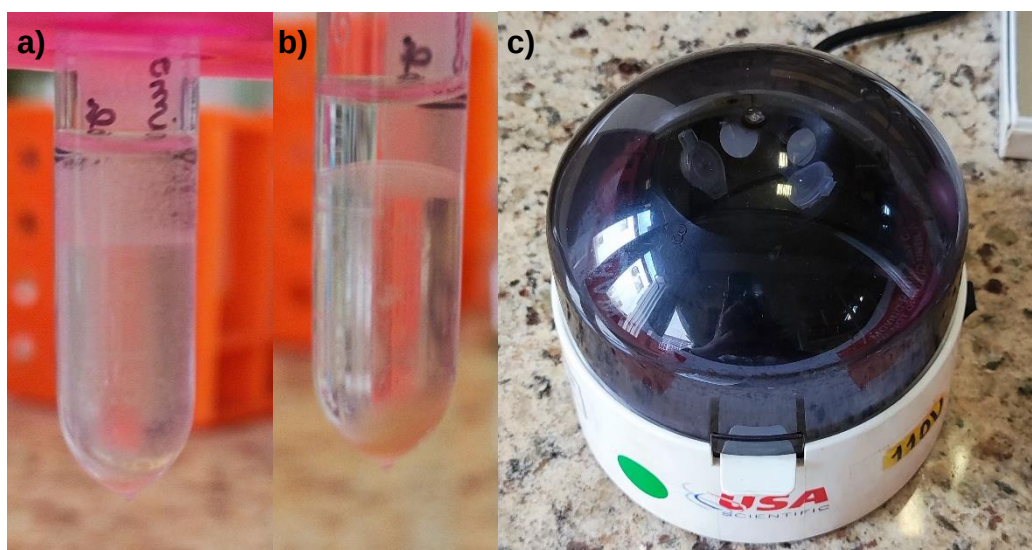
Fonte: Autor

Atualmente, várias metodologias de reações de oxidação com UPO usam sistemas 1:1 de etilbenzeno e tampão com enzima, fazendo com que o etilbenzeno seja não somente o reagente da reação, como também o solvente (Hobisch et al., 2022). Esse excesso de substrato também é útil para evitar a sua diminuição no meio reacional devido à sua alta volatilidade. Por esse motivo foi escolhido conduzir a reação inicial em um sistema de escala de bancada contendo 1 mL de substrato e 1 mL da solução enzimática em tampão.

Outro fator muito importante e estudado é a forma de adição e a concentração do peróxido de hidrogênio para tentar minimizar a inativação da UPO por influência do agente oxidante H_2O_2 . Como a estabilidade da enzima utilizada não era conhecida ainda, nesse primeiro momento foi utilizada uma quantidade bem pequena de peróxido de hidrogênio (12 μL de uma solução 82 mM) adicionada manualmente, a fim de assegurar que não houvesse inativação.

Alíquotas foram coletadas em 20 e 60 minutos, o preparo de amostra para análise por GC-FID foi feito por meio de microextrações em Eppendorf® (Figura 21). Isso foi efetuado para assegurar que não haveria presença de peróxido residual nas amostras, o que poderia danificar o equipamento. Nesse momento foi reparada a tendência de formação de emulsões quando a enzima entra em contato com o peróxido. Dessa forma, para auxiliar a quebra da emulsão e garantir uma boa microextração, o Eppendorf® contendo a emulsão foi levado a uma centrífuga de bancada por 3 minutos.

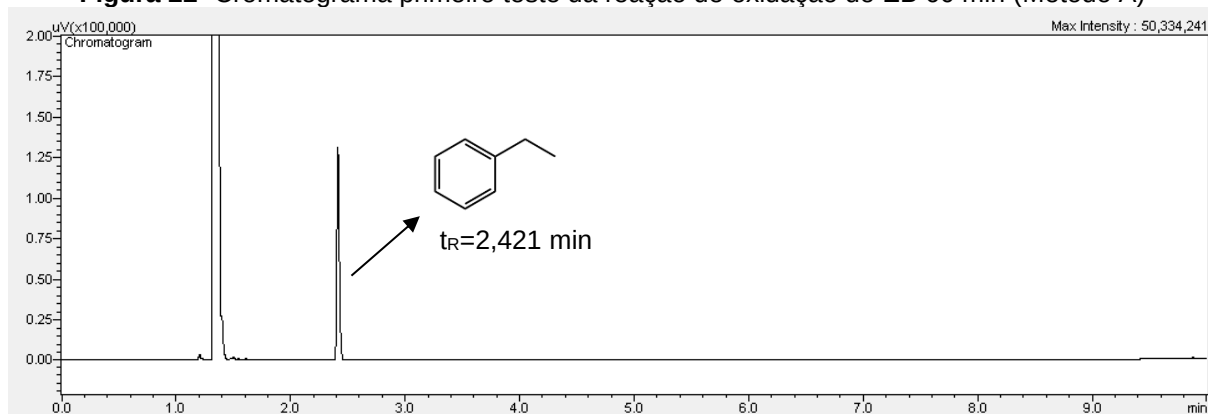
Figura 21- Microextrações feitas em Eppendorf. a) Tubo antes da centrifugação; b) Tubo depois da centrifugação; c) Centrífuga de bancada utilizada nas microextrações



Fonte: Autor

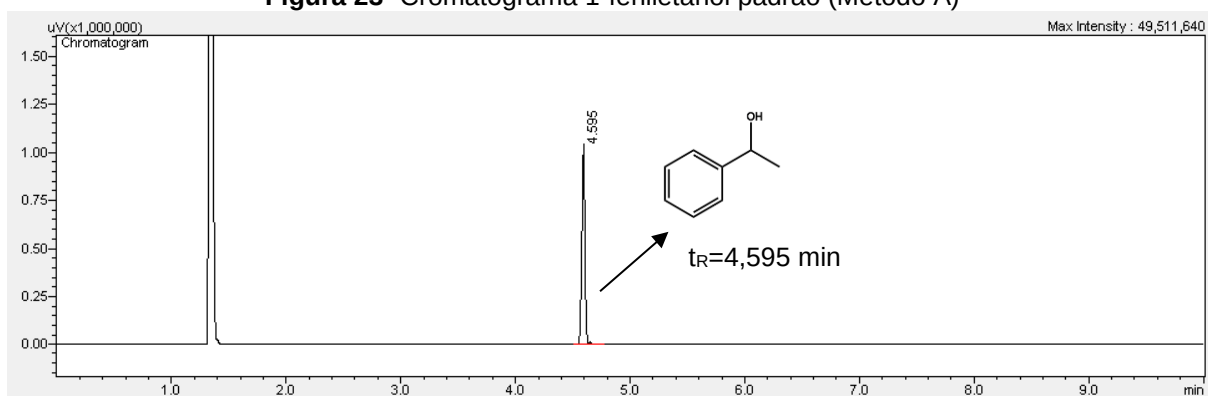
Nesse momento não foram detectadas formação (Figura 22) de nenhum dos possíveis produtos de oxidação 1-feniletanol e acetofenona (Figura 23 e 24 respectivamente), somente etilbenzeno (Figura 25), por esse motivo a reação foi encerrada em 60 min.

Figura 22- Cromatograma primeiro teste da reação de oxidação do EB 60 min (Método A)



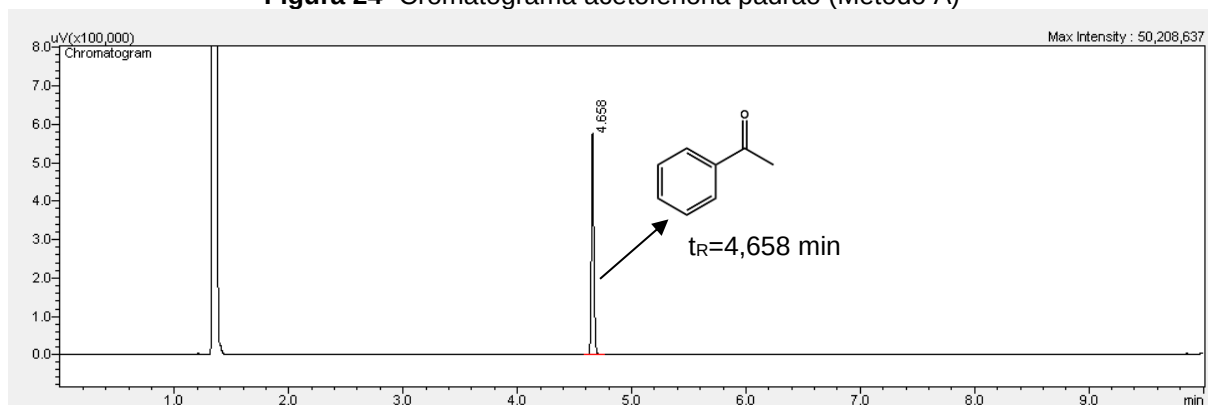
Fonte: Autor

Figura 23- Cromatograma 1-feniletanol padrão (Método A)

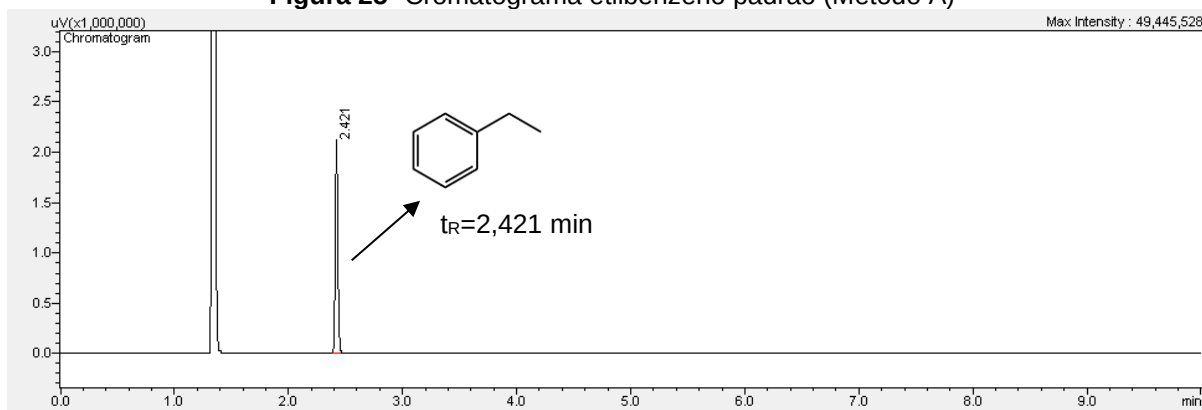


Fonte: Autor

Figura 24- Cromatograma acetofenona padrão (Método A)



Fonte: Autor

Figura 25- Cromatograma etilbenzeno padrão (Método A)

Fonte: Autor

4.3 Teste da reação de oxidação do etilbenzeno com acetonitrila e heptano como cossolventes

Como não foram detectados valores de conversão no primeiro teste da reação, a metodologia de Pogrányi et al., (2024) foi usada como base para elaboração de um novo protocolo mudando parâmetros como a concentração de substrato, solventes, modo de adição de peróxido e concentração enzimática.

Apesar do uso do etilbenzeno como solvente e substrato parecer ter sido uma ótima alternativa no começo, talvez sua alta concentração nas amostras analisadas por GC-FID pudesse estar mascarando alguns valores baixos de conversão. Por esse motivo, foi tomada uma nova abordagem usando uma relação molar 1:1 entre o etilbenzeno em acetonitrila como cossolvente e peróxido de hidrogênio em água deionizada.

Seguindo os valores encontrados para a atividade enzimática da UPO com o ABTS, uma nova quantidade de enzima foi pesada para a reação, sendo usados somente 6 mg de enzima em 8 mL tampão fosfato pH 7,00 50 mmol L⁻¹.

A adição manual da quantidade total de peróxido na reação mostrou ser uma estratégia problemática, por poder levar à rápida inativação enzimática em vigor da concentração inicial relativamente alta de peróxido na solução. Para impedir esse problema, o peróxido de hidrogênio foi lentamente adicionado usando um sistema com uma bomba de seringa (Figura 26) em um fluxo de 0,5 mL h⁻¹.

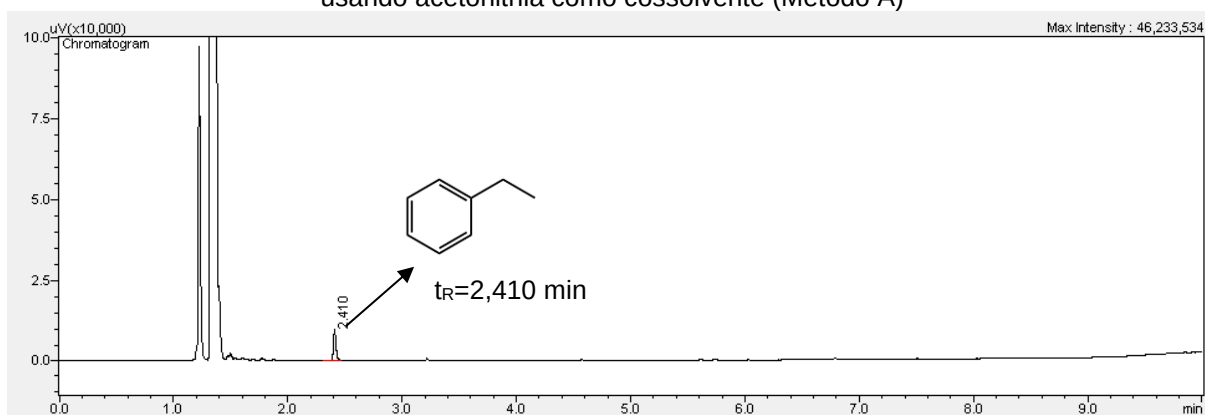
Figura 26- Sistema de adição de peróxido com bomba de seringa para a reação de oxidação com MeCN como cossolvente



Fonte: Autor

As alíquotas retiradas em 1 h e 2 h foram preparadas com o auxílio da centrífuga e levadas para análise por meio de GC-FID. Em ambas as amostras não foi detectada nenhuma formação de 1-feniletanol (Figura 23, p.40) e acetofenona (Figura 24, p.40).

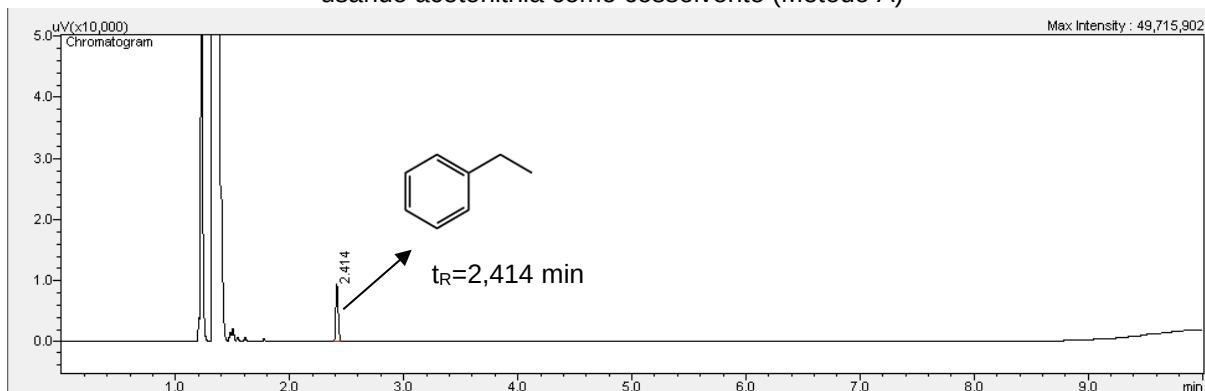
Figura 27- Cromatograma da amostra de 2 h da reação de oxidação do EB com 6 mg de AaeUPO usando acetonitrila como cossolvente (Método A)



Fonte: Autor

Como não foi detectada nenhuma conversão, considerou-se que a enzima poderia não ser tão ativa quanto determinado pelo ensaio de atividade inicial usando ABTS. Portanto, o mesmo procedimento foi testado novamente, dessa vez usando 70 mg da AaeUPO. A formação do produto foi monitorada a cada 30 minutos por GC-FID (Figura 28). Mas ainda sim não foram detectadas quantidades consideráveis de 1-feniletanol.

Figura 28- Cromatograma da amostra de 1 h da reação de oxidação do EB com 70 mg de AaeUPO usando acetonitrila como cossolvente (Método A)



Fonte: Autor

Ao final dessa reação foi feita uma extração a fim de determinar se havia algum rendimento em massa. Contudo, as já observadas emulsões nas microextrações (Figura 21, p.29) provaram ser um problema novamente em maiores escalas, formando emulsões no funil de separação (Figura 29), além de necessitar de quantidades de solvente maiores do que o habitual para ter uma mínima separação das fases.

Figura 29- Emulsão no funil de separação da reação de oxidação do EB usando 70 mg de AaeUPO e acetonitrila como cossolvente



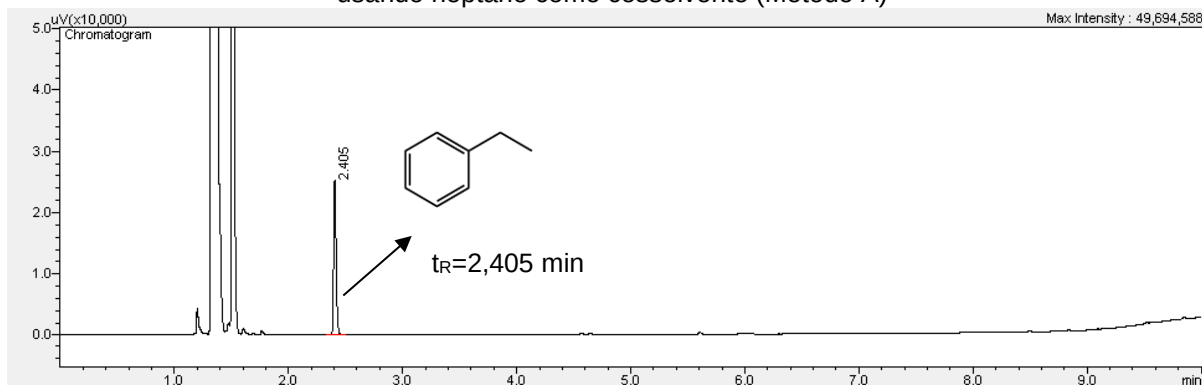
Fonte: Autor

A extração não foi bem sucedida e não foi possível recuperar nenhum rendimento em massa após a rotoevaporação do solvente.

Devido à alta miscibilidade da acetonitrila em água, o meio reacional ficou constituído de somente uma fase contendo todos os reagentes. Por esse motivo foi considerada a possibilidade dos produtos da oxidação, os quais são mais polares do

que o etilbenzeno, ficarem retiros na fase aquosa quando feitas as microextrações em Eppendorf®. Por esse motivo foi selecionado um cossolvente imiscível em água, o heptano, criando um sistema reacional bifásico. Para essas reações foram usadas as mesmas condições descritas anteriormente. Contudo, ao final das 2 h de reação não foi detectada nenhuma conversão (Figura 30).

Figura 30- Cromatograma da amostra de 2 h da reação de oxidação do EB com 70 mg de AaeUPO usando heptano como cossolvente (Método A)



Fonte: Autor

4.4 Oxidação do Etilbenzeno com adição de peróxido manual

As informações coletadas até esse ponto foram todas enviadas ao Prof. Dr. Aitao Li a fim de esclarecer as dúvidas sobre o funcionamento da enzima e receber orientações sobre quais medidas deveriam ser tomadas quanto à atividade enzimática e aos parâmetros reacionais.

Seguindo a nova metodologia para obtenção da atividade enzimática usando NBD, foi determinado que a atividade seria de 78,87 U referente aos 30 mg de enzima usados. Usando esse novo valor foi calculado a massa de enzima necessária para a nova metodologia recebida, a qual pedia 90,9 U mL⁻¹. Dessa forma, foi determinado que a quantidade de enzima a ser usada nas reações a partir desse ponto seria 0,34 g.

Também seguindo as recomendações do nosso colaborador, as análises passaram a ser feitas em tempos reacionais bem maiores, sendo retiradas somente 12 h e 24 h após o final da adição do peróxido.

Outra estratégia explorada para ativação da enzima foi a adição do peróxido durante um período de tempo maior para assegurar sua baixa concentração em solução durante toda a reação. Para isso foi seguido o procedimento enviado pelo Prof. Dr. Aitao Li com um tempo de adição total de 7h. Contudo, o fluxo necessário para fazer a adição dos 0,356 mL de peróxido de hidrogênio 50% necessários, era

muito pequeno para ser adicionado por meio da bomba de seringa. Por esse motivo, foi escolhido fazer a adição manual em um balão de uma boca só com pequenos incrementos de 57µL por meio de micropipetas (Figura 31). Logo na primeira adição foi possível perceber a formação de uma “espuma”, muito parecida com aquela gerada pelo H_2O_2 na liberação de O_2 , que logo se dissipava. Vale ressaltar também a mudança na coloração e espessura da solução com o avanço da reação, à medida que eram adicionadas maiores quantidades de peróxido de hidrogênio a solução ia ficando cada vez mais turbida e viscosa, apresentando um caráter quase leitoso no final (Figura 31).

Figura 31- Balão de reação da oxidação do EB usando 0,34 g de AaeUPO a) no início da reação b) no final da reação



Fonte: Autor

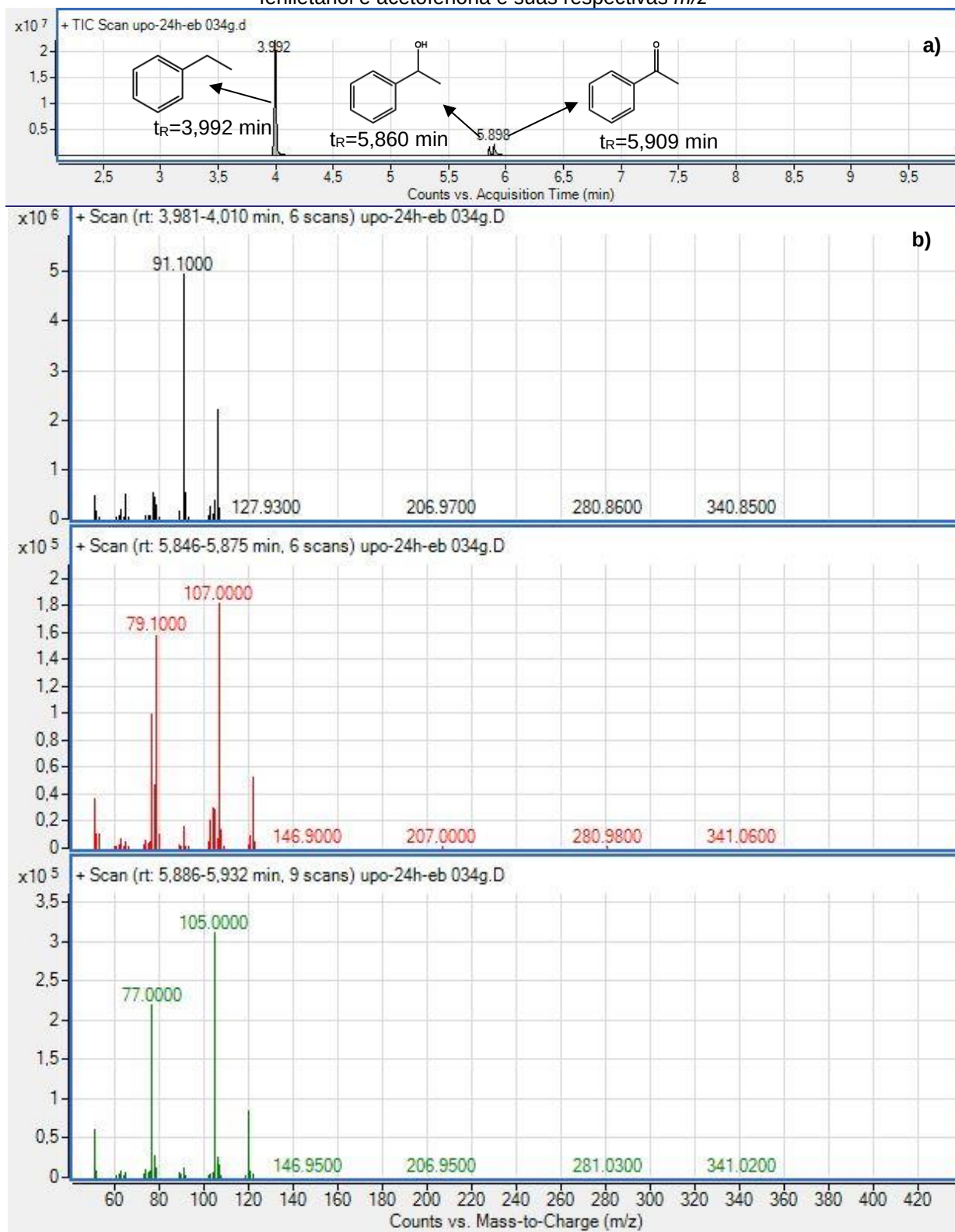
A fim de caracterizar os constituintes, as alíquotas retiradas em 12h e 24h após o término da adição do peróxido foram levadas para análise em GC-MS (Figura 32). Por meio do espectro de massas foi possível constatar a formação de ambos 1-Feniletanol e Acetofenona ao final das 24h, com uma conversão total de 15,3%, esse valor se manteve constante entre as análises de 12 e 24h, indicando que a conversão máxima possível para esse sistema já havia sido atingida.

Um fator interessante foi a relação encontrada entre a quantidade de 1-Feniletanol e Acetofenona formados, 5,4 e 9,9% respectivamente. O que indica que apesar da conversão relativamente baixa o sistema apresentou maiores quantidades do produto mais oxidado, a acetofenona, demonstrando o quão reativas são as peroxigenases para reações de oxidação.

Para comprovar esses valores decidiu-se fazer uma extração líquido-líquido a fim de isolar os produtos e definir a conversão em massa. Contudo, as emulsões

provaram ser um problema novamente, apresentando dificuldade ainda maior, haja vista a espessura da solução.

Figura 32- Resultados das análises de 24 h por GC-MS usando 0,34 g de AaeUPO e adição de peróxido manual a) Cromatograma de 24h; b) espectro de massas destacando do etilbenzeno, 1-feniletanol e acetofenona e suas respectivas m/z



Ao ser adicionado o meio reacional ao funil de separação com acetato de etila durante a extração, houve a formação de uma espécie de “gel” (Figura 33). Essa nova fase dificultou muito a extração, não sendo mais possível distinguir se havia fase aquosa nela retida, ou não.

Figura 33- Funil de separação com a emulsão e camada de “gel” durante a extração da reação de oxidação do EB usando 0,34g de AaeUPO



Fonte: Autor

O funil com toda essa solução foi deixado decantando no laboratório para ver se a separação das fases poderia acontecer de forma natural. Quando não houve indícios que seria possível quebrar a emulsão dessa forma, toda essa solução foi igualmente dividida entre tubos Falcon contendo acetato de etila e levados a uma centrífuga durante 1 min. A fase orgânica foi coletada, seca com sulfato de sódio anidro e rotoevaporada. A conversão em massa recuperada após a extração foi de 11,72%. Considerando as dificuldades enfrentadas durante o processo de extração e possíveis perdas, pode se dizer que os valores de conversão dados pelo GC-MS e em massa são condizentes, comprovando os valores encontrados anteriormente.

4.5 Imobilização enzimática com alginato de sódio

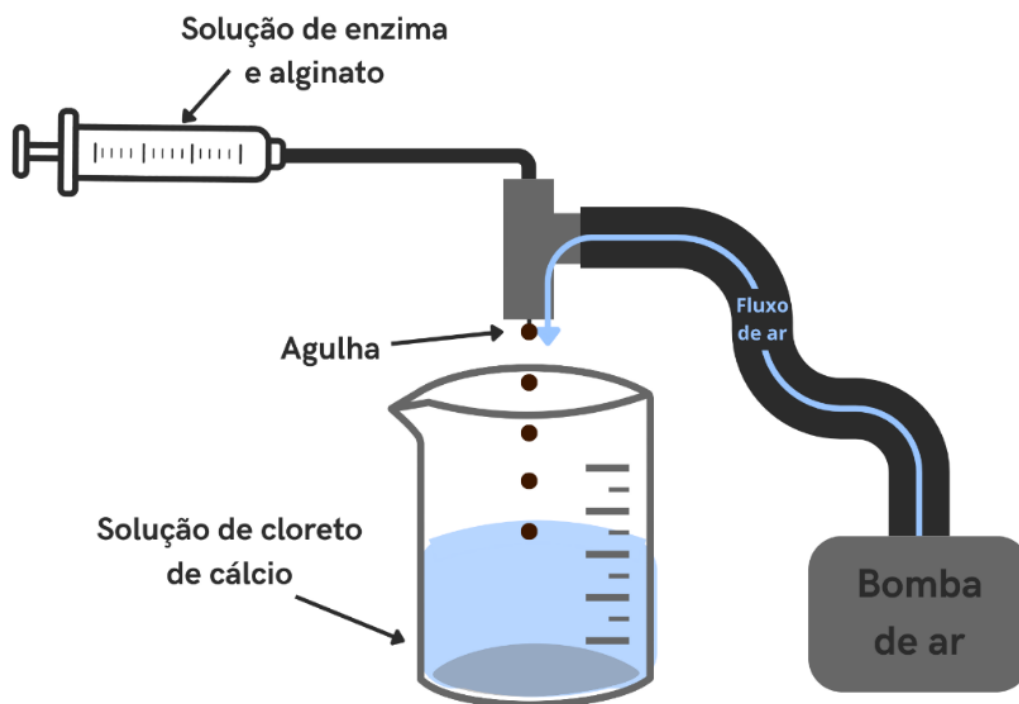
Após ser constatada a reatividade da AaeUPO para a oxidação do etilbenzeno, o processo de *downstream* demonstrou ser extremamente relevante e um gargalo na otimização dessas reações devido à influência do pó liofilizado da enzima AaeUPO. A

estratégia escolhida para contorná-lo foi evitar a formação de emulsões através de protocolos de imobilização enzimática. Afinal, estando a enzima retida dentro de uma matriz as chances de formação de emulsões são muito menores. Além disso, estratégias de imobilização também são conhecidas por aumentar a estabilidade do biocatalisador, agindo como uma barreira protetora e possivelmente diminuindo os efeitos de inativação na presença do peróxido de hidrogênio.

O meio de imobilização escolhido foi o alginato de sódio devido a sua já mencionada alta biocompatibilidade, baixo custo, facilidade de manipulação e acima de tudo por não ser tóxico aos seres humanos e facilmente biodegradado.

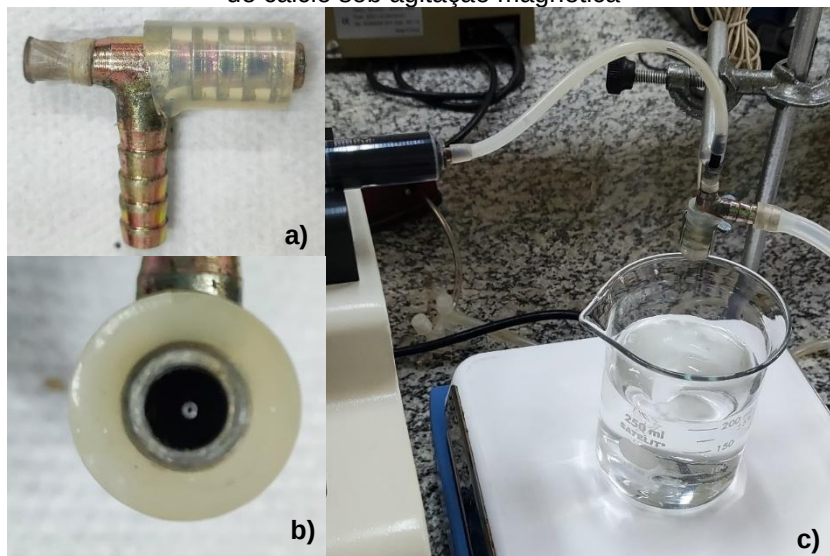
Um sistema de imobilização por extrusão (Figura 34) foi montado usando uma agulha presa à parte interna de uma peça metálica em formato de T (Figura 35). Essa peça foi então conectada a uma seringa de plástico contendo a solução de alginato e enzima. Ao redor da agulha foi passado um fluxo de ar para diminuir o tamanho das esferas formadas, evitando o seu crescimento devido à tensão superficial.

Figura 34- Representação esquemática do sistema de imobilização enzimática em alginato de sódio



Fonte: Autor

Figura 35- Partes do sistema de imobilização. a) peça metálica em T com a agulha presa; b) visão interna da peça metálica com agulha; c) sistema de imobilização completo com a solução de cloreto de cálcio sob agitação magnética



Fonte: Autor

A taxa de formação das gotas foi controlada por meio do fluxo da bomba de seringa. Conforme a solução de alginato e enzima era extrudada pela seringa o processo de gelificação ocorre instantaneamente quando a solução de alginato gotejada entra em contato com o CaCl_2 . Para garantir a formação completa da matriz de alginato e aumentar o seu endurecimento, a solução com as esferas foi deixada sobre agitação magnética durante 1 h. Depois, as esferas foram filtradas, lavadas e transferidas para uma segunda solução de CaCl_2 , isso foi feito para retirar qualquer enzima remanescente na superfície externa das esferas e as tornar ainda mais resistentes.

Normalmente as esferas feitas com esse procedimento apresentam boa precisão entre as suas medidas de diâmetro. Contudo, algumas das esferas formadas para a enzima AaeUPO apresentaram uma espécie de “cauda” (Figura 36). Isso pode ter acontecido por conta de diversos fatores, mas os principais são a alta viscosidade da solução de alginato e enzima e uma agitação magnética muito forte na solução de CaCl_2 .

Figura 36- Esferas de alginato contendo a enzima AaeUPO.



Fonte: Autor

Até esse momento o tampão que havia sendo usado nas reações era o tampão fosfato, contudo, o íon fosfato (PO_4^{3-}) é conhecido por sequestrar o íon Ca^{+2} e é comumente utilizado para reverter processos de imobilização com alginato, quebrando a estrutura formada pela gelificação ionotrópica. Por esse motivo foi necessário fazer a troca do tampão fosfato pelo tampão Tris-HCl pH 8,00 50 mmol L⁻¹, e testes com esferas de alginato sem enzima incubadas nessa solução tampão por 96 h não apresentaram mudanças estruturais. As esferas formadas da imobilização da AaeUPO foram então levadas à geladeira em tubo Falcon contendo tampão Tris-HCl pH 8,00 50 mmol L⁻¹ (Figura 37) até serem usadas nas próximas oxidações.

Figura 37- Esferas de AaeUPO em alginato guardadas em tampão Tris-HCl pH 8,00 50 mmol L⁻¹



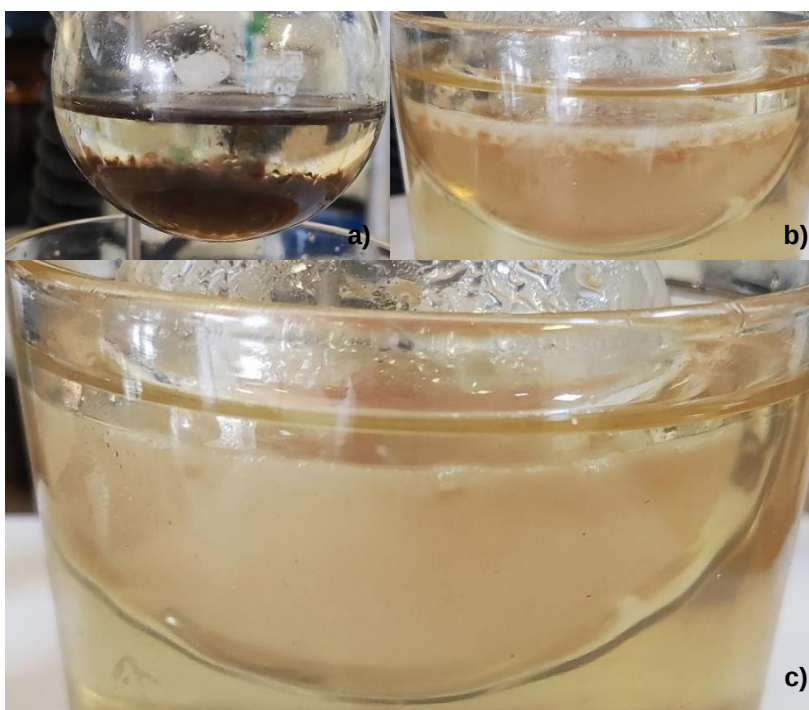
Fonte: Autor

4.6 Oxidação do Etilbenzeno com AaeUPO imobilizada em alginato

As esferas produzidas pela imobilização da AaeUPO em alginato foram usadas no dia seguinte para a oxidação do etilbenzeno. O volume total ocupado pelas esferas acabou sendo bem maior do que o somente pelo pó liofilizado da enzima, por esse motivo o volume total da reação teve de ser aumentado para 20 mL, e a quantidade de tampão Tris-HCl usada foi 18,5 mL. Para assegurar que a quantidade de peróxido disponível para a reação continuasse a mesma, o seu volume de adição total foi aumentado para 0,7 mL, o que possibilitou a adição por meio da bomba de seringa novamente, usando um fluxo de $0,1 \text{ mL h}^{-1}$ com tempo de adição total de 7 horas.

Todavia, conforme o progresso da adição foi avançando a solução foi ficando cada vez mais turbida e espessa, ainda mais do que o observado antes. Essa mudança provou ser vinda da degradação oxidativa da matriz de alginato pelo peróxido de hidrogênio, destruindo o meio de imobilização utilizado (Figura 38). Por esse motivo o monitoramento da reação foi encerrado em 6 horas e retomado somente ao final das 24h para ver se haveria alguma conversão, todavia, não foram detectados nenhum valor de conversão durante todo esse tempo.

Figura 38- Balão com as esferas de AaeUPO em alginato. a) Antes do início da adição do peróxido b) Durante a adição do peróxido; c) No final da reação.



Fonte: Autor

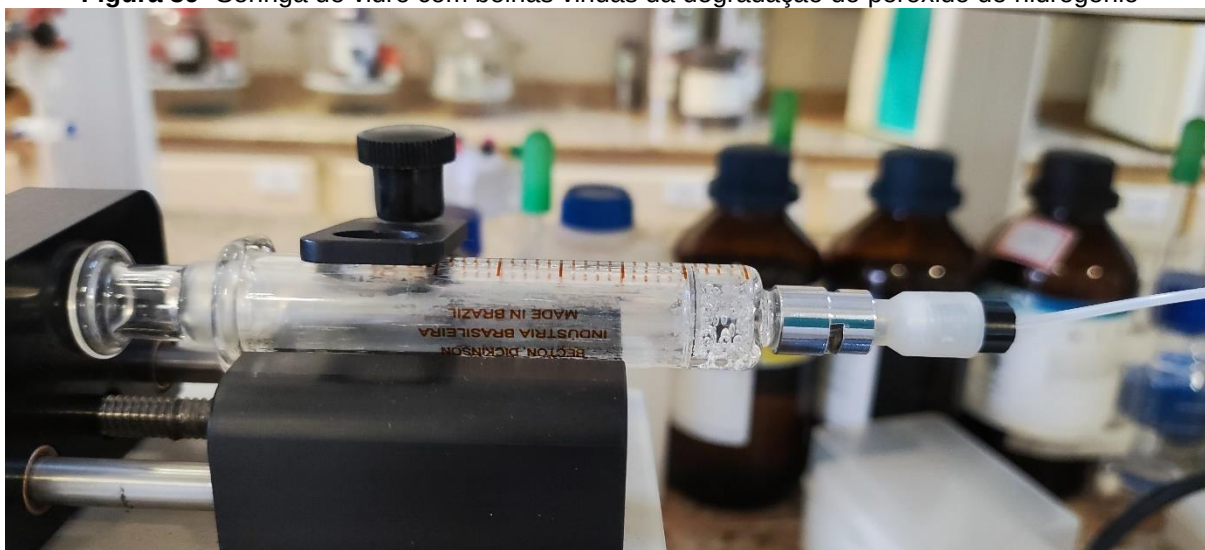
4.7 Oxidação do Etilbenzeno com uma solução diluída de peróxido de hidrogênio

Como a imobilização em alginato acabou não sendo compatível com o peróxido de hidrogênio, foi decidido por enquanto focar os estudos mais na adição do peróxido de hidrogênio e um maior número de análises da conversão.

A primeira medida tomada para minimizar a possibilidade de inativação enzimática pelo peróxido de hidrogênio foi aumentar o tempo de adição para 24 h, diminuindo significativamente os incrementos da sua concentração no meio reacional.

Adicionalmente, durante a reação com as esferas de alginato foi percebido um acúmulo de bolhas na seringa (Figura 39) provavelmente devido à degradação do H_2O_2 e liberação de O_2 , isso significa que talvez a concentração de peróxido na solução fosse bem menor do que a necessária para completar a reação, ocasionando em valores de conversão muito mais baixos.

Figura 39- Seringa de vidro com bolhas vindas da degradação do peróxido de hidrogênio



Fonte: Autor

Alguns fatores que podem influenciar na taxa de degradação do peróxido são a concentração, exposição à luz e temperaturas mais altas. Dessa forma, para evitar a sua degradação foi feita sua diluição em água deionizada e a seringa de adição foi coberta com papel alumínio (Figura 40).

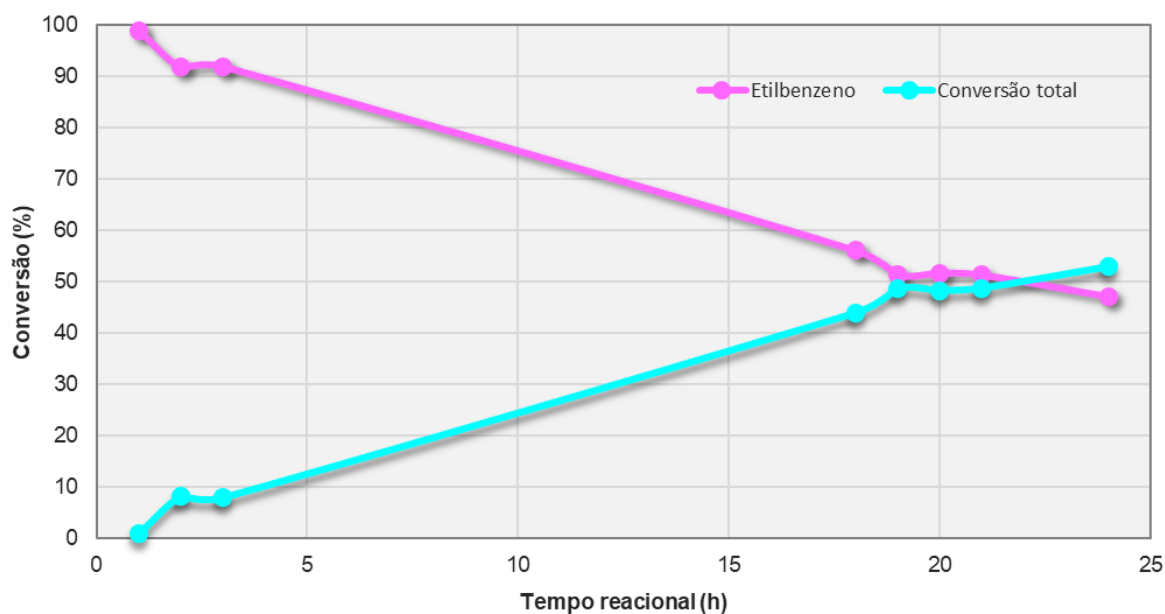
Figura 40- Seringa de vidro com peróxido de hidrogênio diluído envolvida em papel alumínio.



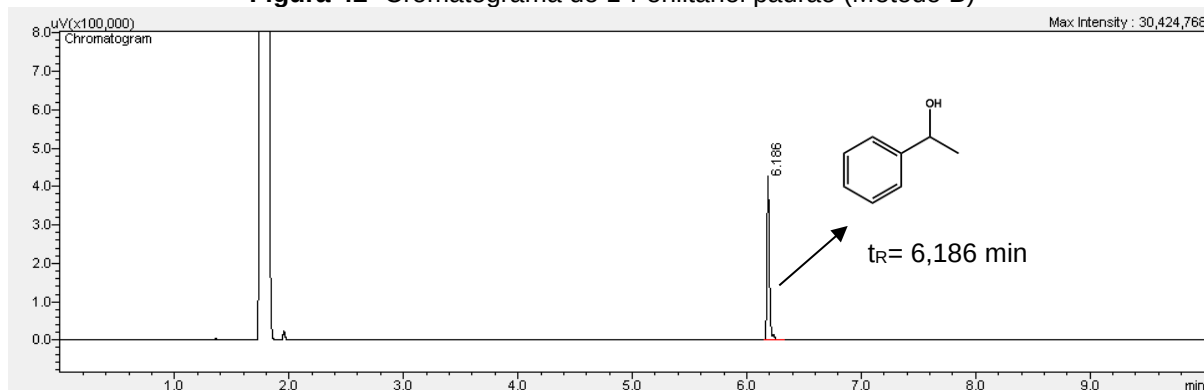
Fonte: Autor

Essa medida provou ser muito eficaz, sendo possível detectar formação de 1-feniletanol (Figura 42) logo na primeira hora de adição (Figura 43). A conversão total em 1-feniletanol e acetofenona chegou até mesmo ultrapassar a concentração do reagente etilbenzeno, alcançando um valor máximo de 52,88% em 24 horas (Figura 41 e 44).

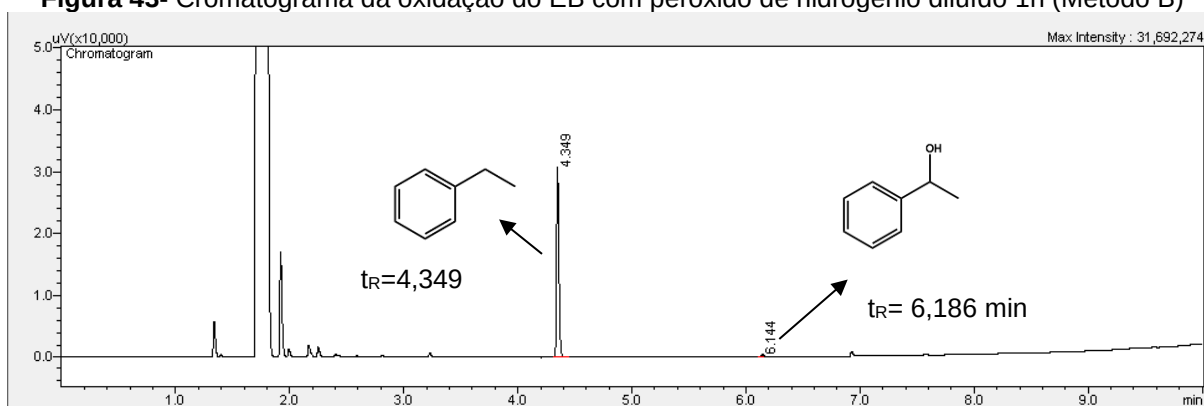
Figura 41- Gráfico da conversão total pelo tempo reacional da oxidação do EB com peróxido de hidrogênio diluído (Método B)



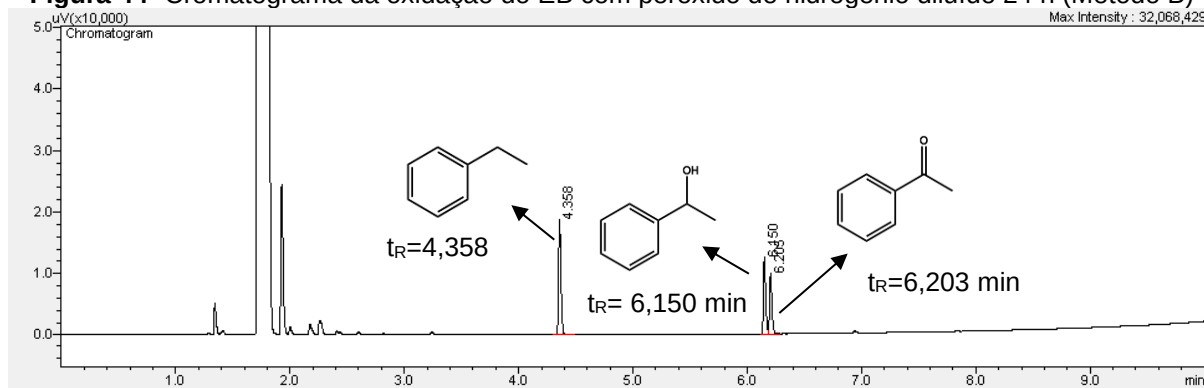
Fonte: Autor

Figura 42- Cromatograma do 1-Feniltanol padrão (Método B)

Fonte: Autor

Figura 43- Cromatograma da oxidação do EB com peróxido de hidrogênio diluído 1h (Método B)

Fonte: Autor

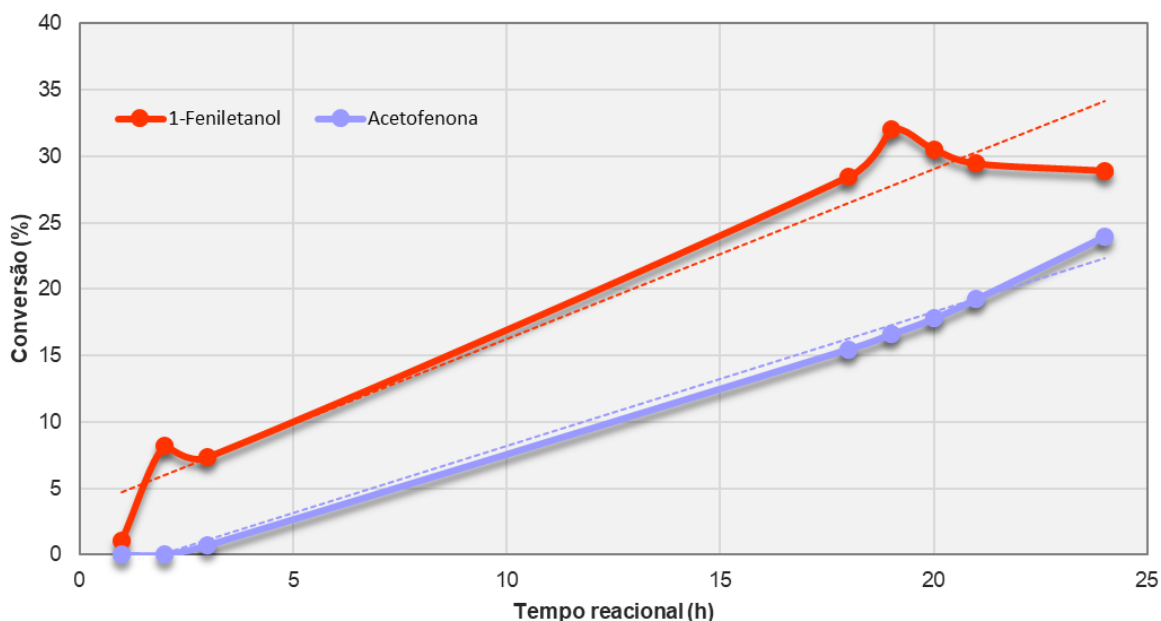
Figura 44- Cromatograma da oxidação do EB com peróxido de hidrogênio diluído 24 h (Método B)

Fonte: Autor

Um dado muito interessante coletado com essa reação foi a medida em tempo real da proporção formada de 1-feniletanol e acetofenona (Figura 45). Através dos valores estimulados de conversão fica clara a rápida formação de 1-feniletanol na primeira hora de adição, sem presença de acetofenona ainda (Figura 43), seguida da diminuição do 1-feniletanol e aparecimento da acetofenona. Esses dados confirmam a relação entre a formação desses dois produtos, na qual o etilbenzeno é primeiramente oxidado a 1-feniletanol, que sofre processo oxidativo novamente,

levando à formação da acetofenona. Como é possível perceber na Figura 40 a taxa de formação do 1-feniletanol e acetofenona se manteve constante durante a maior parte do tempo. No entanto, quando a reação alcançou 20 h a concentração do 1-feniletanol, a qual até esse momento sempre foi maior do que a da acetofenona, começou a diminuir gradativamente. Isso indica que a formação da acetofenona estava sendo mais favorecida em relação a formação de 1-feniletanol, chegando até quase se igualar em 24 h.

Figura 45- Gráfico da conversão do 1-feniletanol e acetofenona pelo tempo reacional usando peróxido de hidrogênio diluído.



Fonte: Autor

Como o enfoque desse trabalho era mais voltado para a oxidação seletiva de carbonos não ativados, a reação foi encerrada no momento em que essa seletividade começou a diminuir no marco de 24 h. Curiosamente esse horário coincide com o final da adição de peróxido de hidrogênio na solução, indicando que a reação acontece ativamente durante todo esse período e que ao seu final ocorre uma mudança na seletividade da reação, expandindo ainda mais as informações coletadas no tópico 4.4, na qual as medidas foram feitas somente após o término da adição do peróxido, e a quantidade de acetofenona em relação ao 1-feniletanol era maior (Figura 32, p. 46).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram exploradas diversas condições reacionais para a oxidação eficiente e sustentável de carbonos não ativados com peroxignases não específicas vinda do fungo *Agrocybe aegerita* (AaeUPO) usando o etilbenzeno como substrato modelo em concordância com os 12 Princípios da Química Verde.

Por meio dos testes feitos foi possível comprovar a reatividade da enzima AaeUPO por meio de estudos da atividade enzimática e reações de oxidação com o etilbenzeno como substrato. Essas reações foram essenciais para explorar parâmetros importantes, como a quantidade de biocatalisador utilizada, quais sistemas de adição de peróxido de hidrogênio são mais eficazes e sua influência na taxa de conversão e inativação da enzima, proporcionando um entendimento muito maior desse biocatalisador.

Além disso, foi também explorada uma estratégia de estabilização por meio da imobilização enzimática, a qual possui potencial de otimização do complicado processo de *downstream*. Através desse protocolo foi evidenciada a baixa estabilidade do alginato de sódio em meios contendo peróxido de hidrogênio.

Foram também feitos mais estudos sobre a estabilidade do próprio peróxido adicionado, o qual demonstrou sofrer degradação se exposto à luz, temperaturas mais altas e usado em altas concentrações. O controle do peróxido adicionado às reações provou poder aumentar bastante a conversão total, sendo possível atingir valores de até 52,88% em 24 h.

Por fim, quando alíquotas de reação foram retiradas durante o processo de adição de peróxido e analisadas, foi possível perceber a mudança de seletividade da enzima com o avanço da reação. Esse dado é de extrema importância para a elaboração de processos com catalisadores mais verdes, possibilitando o controle da seletividade e diminuição de derivados indesejados.

5.1 Perspectivas futuras

Com base nos resultados obtidos, diversas oportunidades de aprofundamento e expansão deste trabalho tornam-se evidentes. Como próximos passos, propõe-se a ampliação do escopo de substratos, a avaliação de diferentes estratégias de imobilização enzimática e a otimização dos métodos analíticos empregados.

Adicionalmente, a integração com sistemas de geração *in situ* de peróxido de hidrogênio surge como uma abordagem promissora para mitigar a inativação da

AaeUPO causada pelo acúmulo de peróxido em concentrações superiores às catalíticas, comumente observado na adição contínua via bomba de seringa.

Esse controle mais preciso da concentração de peróxido pode permitir estudos mais aprofundados sobre a seletividade da AaeUPO na oxidação do etilbenzeno, particularmente na formação seletiva de 1-feniletanol e acetofenona.

REFERÊNCIAS

ANASTAS, Paul T.; WARNER, John. **Green chemistry: Theory and practice**. New York, NY: Oxford University Press, 1998.

ANASTAS, Paul T.; WARNER, John. **Química verde: Teoria e prática**. Tradução de Cintia de Freitas Duarte Milagre, Dulce Helena Siqueira Silva, Juliana Vidal. São Paulo: Editora Unesp, 2025.

CÁRDENAS-MORENO, Yosberto *et al.* Oxidoreductase enzymes: Characteristics, applications, and challenges as a biocatalyst. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 70, n. 6, p. 2108–2135, 1 dez. 2023.

CARSON, Rachel L. **Silent Spring**. [S.l.]: Houghton Mifflin, 1962.

CELESTINO, Teresa. High School Sustainable and Green Chemistry: Historical–Epistemological and Pedagogical Considerations. **Sustainable Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 304–320, 2023.

COSTA, Gustavo J.; LIANG, Ruibin. Understanding the Multifaceted Mechanism of Compound I Formation in Unspecific Peroxygenases through Multiscale Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 127, n. 41, p. 8809–8824, 19 out. 2023.

DINIS, Pedro *et al.* Chapter 14 - Chimeragenesis for Biocatalysis. *In*: SINGH, Ram Sarup *et al.* (Orgs.). **Advances in Enzyme Technology**. [S.l.]: Elsevier, 2019. p. 389–418.

DORAGHI, Fatemeh *et al.* Rhodium-catalyzed transformations of diazo compounds via a carbene-based strategy: recent advances. **RSC Advances**, v. 14, n. 53, p. 39337–39352, 2024.

EBNER, Katharina *et al.* Discovery and Heterologous Expression of Unspecific Peroxygenases. **Catalysts**, v. 13, n. 1, 2023.

FRANCE, Scott P.; LEWIS, Russell D.; MARTINEZ, Carlos A. The Evolving Nature of Biocatalysis in Pharmaceutical Research and Development. **JACS Au**, v. 3, n. 3, p. 715–735, 27 mar. 2023.

GANESH, Krishna N. *et al.* Green Chemistry: A Framework for a Sustainable Future. **Environmental Science & Technology**, v. 55, n. 13, p. 8459–8463, 6 jul. 2021.

HILBERATH, Thomas *et al.* Toward Kilogram-Scale Peroxygenase-Catalyzed Oxyfunctionalization of Cyclohexane. **Organic Process Research & Development**, v. 27, n. 7, p. 1384–1389, 21 jul. 2023.

HOBISCH, Markus *et al.* Solvent-Free Photobiocatalytic Hydroxylation of Cyclohexane. **ChemCatChem**, v. 12, n. 16, p. 4009–4013, 20 ago. 2020.

HOBISCH, Markus *et al.* Recent developments in the use of peroxygenases – Exploring their high potential in selective oxyfunctionalisations. **Biotechnology Advances**, v. 51, p. 107615, 2021.

HOBISCH, Markus *et al.* Peroxygenase-Driven Ethylbenzene Hydroxylation in a Rotating Bed Reactor. **Organic Process Research & Development**, v. 26, n. 9, p. 2761–2765, 16 set. 2022.

JOY, Jesly *et al.* A brief review on the palladium-catalyzed C–H activation reactions of 2-phenylpyridines. **RSC Advances**, v. 15, n. 14, p. 11065–11084, 2025.

KOSINOV, Nikolay. Learning Catalysis through Analyzing Raw Catalytic and Characterization Data. **Journal of Chemical Education**, v. 101, n. 10, p. 4251–4255, 8 out. 2024.

KOSTOVA, Irena. Cytotoxic Organometallic Iridium(III) Complexes. **Molecules**, v. 30, n. 4, 2025.

LEVESON-GOWER, Reuben B.; MAYER, Clemens; ROELFES, Gerard. The importance of catalytic promiscuity for enzyme design and evolution. **Nature Reviews Chemistry**, v. 3, n. 12, p. 687–705, 2019.

LIU, Mengmeng *et al.* EC2Vec: A Machine Learning Method to Embed Enzyme Commission (EC) Numbers into Vector Representations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 65, n. 5, p. 2173–2179, 10 mar. 2025.

MAGHRABY, Yasmin R. *et al.* Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, v. 8, n. 6, p. 5184–5196, 14 fev. 2023.

MARTIN-DIAZ, Javier *et al.* Directed evolution of unspecific peroxygenase in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 8, p. 3002–3014, 1 ago. 2021.

MIRSALAMI, Seyed Mehrdad; MIRSALAMI, Mahsa; GHODOUSIAN, Amin. Techniques for immobilizing enzymes to create durable and effective biocatalysts. **Results in Chemistry**, v. 7, p. 101486, 2024.

MOGHADAM FARID, Sara *et al.* Modern metal-catalyzed and organocatalytic methods for synthesis of coumarin derivatives: a review. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 20, n. 24, p. 4846–4883, 2022.

MOKHOSOEV, Innokenty M. *et al.* Cytochrome P450 monooxygenase systems: Diversity and plasticity for adaptive stress response. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 193, p. 19–34, 2024.

MÜNCH, Judith *et al.* Computational-Aided Engineering of a Selective Unspecific Peroxygenase toward Enantiodivergent β -Ionone Hydroxylation. **ACS Catalysis**, v. 13, n. 13, p. 8963–8972, 7 jul. 2023.

OLIVERI CONTI, Gea *et al.* Toxicological Implications of Platinum Group Elements (PGEs): A Systematic Review of In Vivo and In Vitro Studies Using Mammalian Models. **FBL**, v. 29, n. 8, p. 304- null, 2024.

PATTI, Stefania *et al.* Advances and Challenges in the Development of Immobilized Enzymes for Batch and Flow Biocatalyzed Processes. **ChemSusChem**, v. 18, n. 8, p. e202402007, 14 abr. 2025.

POGRÁNYI, Balázs *et al.* Selective Oxidations of Toluenes and Benzyl Alcohols by an Unspecific Peroxygenase (UPO). **ChemCatChem**, v. 16, n. 18, p. e202400702, 23 set. 2024.

RAMIREZ-ESCUDERO, Mercedes *et al.* Structural Insights into the Substrate Promiscuity of a Laboratory-Evolved Peroxygenase. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 12, p. 3259–3268, 21 dez. 2018.

RENÉ, Ullrich *et al.* Novel Haloperoxidase from the Agaric Basidiomycete *Agrocybe aegerita* Oxidizes Aryl Alcohols and Aldehydes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4575–4581, 1 ago. 2004.

ROBB, Craig S. *et al.* Specificity and mechanism of carbohydrate demethylation by cytochrome P450 monooxygenases. **Biochemical Journal**, v. 475, n. 23, p. 3875–3886, 12 dez. 2018.

ROBESCU, Marina Simona; BAVARO, Teodora. A Comprehensive Guide to Enzyme Immobilization: All You Need to Know. **Molecules**, v. 30, n. 4, 2025.

SAVIC, Maja *et al.* The Antitumor and Toxicity Effects of Ruthenium(II) Complexes on Heterotopic Murine Colon Carcinoma Model. **Experimental and Applied Biomedical Research (EABR)**, v. 0, n. 0, 2022.

SHELDON, Roger Arthur. Green chemistry and biocatalysis: Engineering a sustainable future. **Catalysis Today**, v. 431, p. 114571, 2024.

SHERIKAR, Mahadev Sharanappa *et al.* Rhodium(iii)-catalyzed synthesis of trisubstituted furans via vinylic C–H bond activation. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 19, n. 34, p. 7470–7474, 2021.

TENG, Kaixuan *et al.* Recent Development of Alginate-Based Materials and Their Versatile Functions in Biomedicine, Flexible Electronics, and Environmental Uses. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 7, n. 4, p. 1302–1337, 12 abr. 2021.

URLACHER, Vlada B.; GIRHARD, Marco. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 26–36, 2012.

VATANPOUR, Vahid *et al.* Polysaccharides in fabrication of membranes: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 281, p. 119041, 2022.

WENG, Yilun *et al.* Alginate-based materials for enzyme encapsulation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 318, p. 102957, 2023.

WINKLER, Christoph K.; SCHRITTWIESER, Joerg H.; KROUTIL, Wolfgang. Power of Biocatalysis for Organic Synthesis. **ACS Central Science**, v. 7, n. 1, p. 55–71, 27 jan. 2021.

XU, X.; HILBERATH, T.; HOLLMANN, F. Selective oxyfunctionalisation reactions catalysed by P450 monooxygenases and peroxygenases – A bright future for sustainable chemical synthesis. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 39, p. 100745, 2023.

YORIMITSU, Hideki; KOTORA, Martin; PATIL, Nitin T. Special Issue: Recent Advances in Transition-Metal Catalysis. **The Chemical Record**, v. 21, n. 12, p. 3335–3337, 1 dez. 2021.

ZHANG, Lilan *et al.* Structural insight into the electron transfer pathway of a self-sufficient P450 monooxygenase. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2676, 2020