

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIBEL CORDERO VILLALOBOS

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE
 α -D-GLUCOSE UTILIZANDO SÓLIDO FERMENTADO
CONTENDO LIPASES DE *Burkholderia contaminans* LTEB11**

CURITIBA

Fevereiro, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIBEL CORDERO VILLALOBOS

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE
 α -D-GLUCOSE UTILIZANDO SÓLIDO FERMENTADO
CONTENDO LIPASES DE *Burkholderia contaminans* LTEB11**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Química, Programa
de Pós-Graduação em Química-Área de Concentração
em Química Orgânica, Setor de Ciências Exatas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nadia Krieger

Co-orientador: Prof. Dr. Alan Gonçalves

CURITIBA

Fevereiro, 2016

V714s

Villalobos, Maribel Cordero

Síntese enzimática de ésteres de α -D-Glucose utilizando sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia contaminans* LTEB11/ Maribel Cordero Villalobos. – Curitiba, 2016.

76 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2016.

Orientador: Nadia Krieger – Co-orientador: Alan Gonçalves.

Bibliografia: p. 63-74.

1. Ésteres. 2. Enzimas - Síntese. 3. Biocatálise. 4. *Burkholderia contaminans*. I. Universidade Federal do Paraná. II. Krieger, Nadia. III. Gonçalves, Alan. IV. Título.

CDD: 572.757

TERMO DE APROVAÇÃO

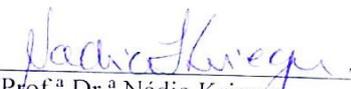
**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE α - D - GLUCOSE
UTILIZANDO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO LIPASES DE
BURKHOLDERIA CONTAMINANS LTEB11**

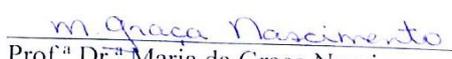
por

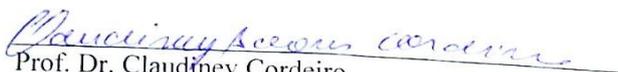
MARIBEL CORDERO VILLALOBOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:


Prof.^a Dr.^a Nádia Krieger
Dep. de Química – UFPR


Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Nascimento
Dep. de Química – UFSC


Prof. Dr. Claudiney Cordeiro
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 22 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Dios por crear la vida, el universo y permitirme nacer en un país de paz y abundante riqueza natural como lo es Costa Rica.

A mi familia por brindarme siempre el amor más puro y apoyo incondicional aún a la distancia, a mi madre Elizabeth Villalobos por guiarme por el sendero del esfuerzo, del trabajo y la dedicación para alcanzar las metas propuestas; a Geovanny Rojas por inculcarme el valor de la solidaridad, la tolerancia y el respeto hacia los demás; y a mi hermano Alberto por mostrarme que lo maravilloso de la vida se recibe en pequeñas dosis.

A mi orientadora Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger por depositar su confianza en mí, aceptarme en su grupo de investigación y sumergirme en el mundo de la biocatálisis. Especialmente por exigirme al máximo y llevarme de la mano al perfeccionamiento profesional.

A mi co-orientador Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves por proponer la idea innovadora del proyecto y transmitir sus conocimientos en el área de carbohidratos y química analítica.

A los miembros de la banca evaluadora Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Nascimento e Prof. Dr. Claudiney Cordeiro por la disposición en contribuir con este trabajo y por sus valiosas recomendaciones y consideraciones.

Al Programa de Posgraduación en Química por participar en el convenio internacional de becas para Latinoamérica. A todos los profesores y servidores del Departamento de Química de la UFPR que siempre me trataron con respeto y me apoyaron en todo momento, especialmente al Prof. Ronilson Vasconcelos, Prof. Francisco De Assis Marques, a Marcelino Cámara y a la Prof. Jaisa Soares.

A todos mis colegas del grupo de investigación del Laboratorio de Tecnología Enzimática y Biocatálisis (LTEB), del Núcleo de Pesquisas y Desarrollo de Energia Autosustentable (NPDEAS) y del Laboratorio de Tecnología y Enzimología Fermentativa (LTEF), por tener siempre disposición en enseñar metodologías utilizadas en el área, discutir temas en común y compartir sus conocimientos, lo cual desarrolló mi pensamiento científico crítico.

A todos(as) mis amigos(as) e colegas, dentro y fuera de la universidad, que me apoyaron y me hicieron crecer con sus consejos y experiencias, y que de una u otra forma participaron en el desarrollo de esta investigación. Gracias a ellos extrañé menos a mi tiquicia porque siempre me hicieron sentir como en casa.

Al Departamento de Desarrollo Humano, Educación y Empleo de la Organización de Estados Americanos (OEA) que mediante su Programa de Alianzas para la Educación y la

Capacitación (PAEC) creó el convenio OEA-Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) con el cual tuve la oportunidad de estudiar esta maestría.

A la Cordinación de Perfeccionamiento de Profesionales de Nivel Superior (CAPES), por el soporte económico.

RESUMO

Os derivados de carboidratos são precursores de várias moléculas com muitas aplicações na área médica. Para a síntese destes compostos, é necessário a preparação prévia de blocos estruturais a partir da modificação regioseletiva de carboidratos. Este é um processo complexo devido ao fato de os carboidratos apresentam múltiplos grupos hidroxila com reatividade química semelhante, necessitando de várias etapas de adição e remoção de grupos protetores. Uma alternativa promissora para realizar este tipo de reações regioseletivas é a catálise enzimática, que proporciona um elevado grau de seletividade em uma única etapa, aplicando condições experimentais brandas.

Neste trabalho, foi desenvolvido um novo processo para a acetilação enzimática de metil- α -D-glucopiranosídeo (α -MetGlc) com acetato de vinila, em reação catalisada pelo sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia contaminans* LTEB11. O produto principal da reação, metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo, foi purificado por cromatografia flash em coluna com sílica, identificado por RMN e quantificado por CLAE.

A eficiência da síntese enzimática em escala laboratorial (4 mL de meio reacional) foi avaliada em diferentes sistemas de reação que continham, em adição de α -MetGlc, somente acetato de vinila puro (sistema livre de solvente), acetato de vinila com dimetilformamida (1:1) e acetato de vinila com líquido iônico [emim][MeSO₃] (1:1). Foi demonstrado que a conversão do substrato claramente aumenta com o aumento da hidrofobicidade do solvente utilizado no meio reacional, atingindo-se a maior conversão de 65% no sistema livre de solvente em 72 h.

Posteriormente, foi aumentada a escala de produção nesta condição, utilizando-se 1 L de meio reacional, atingindo-se 76% de conversão em 72 h, com rendimento experimental de 1,047 g de metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo (pureza 90%), maior quantidade reportada atualmente aplicando sólido fermentado. Os resultados mostram que o sólido fermentado produzido por *Burkholderia contaminans* LTEB11 é um biocatalisador de baixo custo, com potencial para ser aplicado na síntese industrial de ésteres de α -D-glucose.

Palavras-chave: Ésteres de α -D-glucose, lipases, *Burkholderia contaminans* LTEB11, sólidos fermentados, acetilação regioseletiva, metil- α -D-glucopiranosídeo, sistemas livres de solvente, aumento de escala

ABSTRACT

Derivatives of carbohydrates are precursors of molecules with many applications in medicine. The synthesis of these compounds requires the preparation of appropriate building blocks, which is done by regioselective modification of carbohydrates. Since carbohydrates have multiple hydroxyl groups with similar reactivity, chemical methods for regioselective modification are complex, with several steps involving the addition and removal of protective groups. Enzymatic methods are promising for this kind of reaction since a high degree of selectivity can be obtained in a single step carried out using mild conditions. We developed a new method for acetylation of methyl- α -D-glucopyranoside (α -MetGlc) with vinyl-acetate, with the reaction being catalyzed by a fermented solid containing lipases from *Burkholderia contaminans* LTEB11. The main product of the synthesis, methyl- α -D-6-O-acetylglucopyranoside, was identified by NMR and quantified by HPLC. The efficiency of the synthesis at laboratory scale (4 mL of reaction medium) was evaluated in different reaction systems containing, in addition to α -MetGlc, only vinyl acetate (i.e. a solvent-free system), vinyl acetate with dimethylformamide (1:1) and vinyl acetate with the ionic liquid [emim][MeSO₃] (1:1). The conversion increased with increasing hydrophobicity of the solvent system used, with the highest conversion (65% in 72 h) being obtained in the solvent-free system. This system was scaled up to a 1-L reaction medium. A conversion of 76% in 72 h was obtained, with a yield of 1,047 g of methyl- α -D-6-O-acetylglucopyranoside (90% purity). This is the largest amount of this carbohydrate derivative produced by enzymatic catalysis with fermented solid reported in the literature to date. These results suggest that the fermented solid produced by *Burkholderia contaminans* LTEB11, which is a low-cost biocatalyst, could potentially be used for the industrial production of esters of α -D-glucose.

Keywords: α -D-glucose esters, lipases, *Burkholderia contaminans* LTEB11, fermented solids, regioselective acetylation, methyl- α -D-glucopyranoside, solvent-free system, scale-up

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REAÇÕES QUÍMICAS CATALISADAS POR LIPASES	5
FIGURA 2. MECANISMO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASE .	6
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CONFORMAÇÃO ABERTA DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i>	7
FIGURA 4. REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DO METIL- β -D-GLUCOPIRANOSÍDEO CATALISADA POR NOVOZYME SP435	12
FIGURA 5. REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE MALTOSE CATALISADA PELA LIPASE COMERCIAL DE <i>Pseudomonas cepacia</i>	13
FIGURA 6. REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO CATALISADA PELA LIPASE NOVOZYME 435	13
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DE GLICOCONJUGADOS, CONSTITUÍDOS DE DIFERENTES TIPOS DE CARBOIDRATOS	14
FIGURA 8. SÍNTESE QUÍMICA DO OLIGOSSACARÍDEO DE <i>Plasmodium falciparum</i> PARA UM PROTÓTIPO DE VACINA CONTRA A MALÁRIA	16
FIGURA 9. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	19
FIGURA 10. REAÇÃO DE GLICOSILAÇÃO DE α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO	20
FIGURA 11. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO NAS CONDIÇÕES PADRÃO.....	23
FIGURA 12. SISTEMA DE COLUNA COM FLUXO DE AR SECO UTILIZADO PARA SECAGEM DO SÓLIDO FERMENTADO	26
FIGURA 13. ESTRUTURA QUÍMICA DO 1-ETIL-3-METILIMIDAZÓLIO METANOSULFONATO [emim][MeSO ₃].....	27
FIGURA 14. CROMATOPLACA REFERENTE AOS SISTEMAS REACIONAIS DA ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO CATALISADA PELOS DIFERENTES SÓLIDOS FERMENTADOS.....	39
FIGURA 15. CROMATOPLACAS REFERENTES ÀS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO MEIO REACIONAL DA SÍNTESE ENZIMÁTICA POR CROMATOGRAFIA FLASH EM COLUNA DE SÍLICA	40
FIGURA 16. ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DO (A) METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO; (B) COMPOSTO MAJORITÁRIO A.....	41
FIGURA 17. ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO MAJORITÁRIO A.....	42

FIGURA 18. ESPECTROS DE CORRELAÇÃO DO COMPOSTO MAJORITÁRIO A) A) HSQC B) HMBC	43
FIGURA 19. ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO LIPASES DE <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11	44
FIGURA 20. ATIVIDADE DE HIDRÓLISE RESIDUAL APÓS INCUBAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO EM DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS	48
FIGURA 21. EFEITO DO SISTEMA REACIONAL NA CINÉTICA DA ACETILAÇÃO ENZIMÁTICA DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA .	53
FIGURA 22. CINÉTICA DA REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA CATALISADA COM SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO LIPASES DE <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11 EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE.....	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. EXEMPLOS DE UTILIZAÇÃO DE LIPASES COMERCIAIS NA ACILAÇÃO DE CARBOIDRATOS	11
TABELA 2. MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11	24
TABELA 3. COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS SÓLIDOS FERMENTADOS SECOS PRODUZIDOS POR <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO	36
TABELA 4. SOLUBILIDADE DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO EM DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS	46
TABELA 5. CONVERSÕES DA ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA, CATALISADA POR SÓLIDO FERMENTADO, EM DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS	50
TABELA 6. COMPARAÇÃO DOS ESTUDOS DE ACILAÇÃO DE CARBOIDRATOS CATALISADAS COM LIPASES	56

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
α -MetGlc	Metil- α -D-Glucopiranosídeo
BC	Bagaço de Cana
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (Unicamp, Campinas, SP)
CRL*	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
DIR	Detetor de Índice de Refração
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
FSG	Farinha de Semente de Girassol
HSQC*	Correlação de Acoplamento Heteronuclear espaçado por uma ligação
HMBC*	Correlação de Acoplamento Heteronuclear espaçado por várias ligações
LB	Luria Bertani
LI	Líquido Iônico
LP	Polissacarídeo de <i>Lilium lancifolium</i>
LTEB	Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise
OMS	Organização Mundial da Saúde
PSL-C	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
R_f *	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SFBC	Sólido Fermentado de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11

SFS1	Sólido Fermentado Seco (Condição A)
SFS2	Sólido Fermentado Seco (Condição B)
SFS3	Sólido Fermentado Seco (Condição C)
TBU*	Unidades de Bromelina-Tirosina
t_R	Tempo de retenção
THF	Tetraidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
U	Unidades de atividade enzimática

*Siglas em inglês

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 LIPASES	4
2.1.1 Definição.....	4
2.1.2 Aspectos estruturais e mecanismo de ação.....	5
2.1.3 Produção de lipases de <i>Burkholderia cepacia</i> e sua aplicação em biocatálise	7
2.1.4 Lipases e regioselectividade.....	9
2.2 GLICOCONJUGADOS	14
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	19
4.3 MATERIAIS E REAGENTES	20
4.3.1 Síntese química do metil- α -D-glucopiranosídeo	20
4.4 PRODUÇÃO DAS LIPASES DE <i>BURKHOLDERIA CONTAMINANS</i> LTEB11 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).	21
4.4.1 Micro-organismo e manutenção da cepa.....	21
4.4.2 Preparação dos substratos sólidos.....	21
4.4.3 Preparo do inóculo	22
4.4.4 Fermentação em estado sólido.....	22
4.4.4.1 Produção do sólido fermentado nas condições-padrão.....	22
4.4.4.2 Variações do meio de cultivo da fermentação em estado sólido.....	23
4.4.4.3 Preparo da solução nutriente	24
4.4.4.4 Secagem do sólido fermentado	25
4.4.4.5 Delipidação do sólido fermentado seco	26
4.4.5 Caracterização dos diferentes sólidos fermentados.....	27
4.5 SELEÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA A ACETILAÇÃO DO METIL-A-D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA	27
4.5.1 Determinação da solubilidade do metil- α -D-glucopiranosídeo em diferentes sistemas reacionais	27
4.5.2 Efeito do solvente na estabilidade da atividade do sólido fermentado	28

4.5.3 Acetilação do metil- α -D-glucopiranosídeo com acetato de vinila em sistema livre de solvente.....	29
4.5.4 Efeito do solvente na acetilação do metil- α -D-glucopiranosídeo com acetato de vinila.....	29
4.6 ESCALONAMENTO DA ACETILAÇÃO DO METIL-A-D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA.....	30
4.7 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO MAJORITÁRIO DA ACETILAÇÃO DO METIL-A-D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA.....	30
4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	31
4.8.1 Determinação da umidade dos substratos sólidos.....	31
4.8.2 Determinação da atividade de hidrólise.....	31
4.8.3 Determinação da atividade de esterificação.....	32
4.8.3.1 Determinação do teor de ácidos graxos livres por método colorimétrico.....	33
4.8.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	34
4.8.5 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	34
4.8.6 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	34
4.8.7 Tratamento estatístico dos dados.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.2 SELEÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO PARA A ACETILAÇÃO DO METIL-A-D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA.....	36
5.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO A.....	38
5.3.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada.....	38
5.3.2 Cromatografia flash em coluna com sílica.....	39
5.3.3 Análise por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência.....	40
5.3.4 Análise por Ressonância Magnética Nuclear.....	41
5.4 OTIMIZAÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA A ACETILAÇÃO DO METIL-A-D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA.....	45
5.4.1 Síntese química do metil- α -D-glucopiranosídeo.....	45
5.4.2 Determinação da solubilidade do metil- α -D-glucopiranosídeo em diferentes sistemas reacionais.....	45
5.4.3 Efeito do solvente na estabilidade da atividade do sólido fermentado.....	47
5.4.4 Efeito do solvente na acetilação do metil- α -D-glucopiranosídeo.....	49
5.4.5 Cinética da acetilação do metil- α -D-glucopiranosídeo com acetato de vinila em diferentes sistemas reacionais.....	53

5.5 ESCALONAMENTO DA ACETILAÇÃO DO METIL-A-D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA	57
6. CONCLUSÕES	60
7. PERSPECTIVAS	62
8. REFERÊNCIAS	63
9. ANEXOS.....	75

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente, doenças infecciosas estão se espalhando pelo mundo rapidamente, infectando milhões de pessoas anualmente. Dentre as doenças mais comuns estão malária e a tuberculose, para as quais foram reportados 48 237 390 e 5 730 798 casos, respectivamente em 2015. Nesta situação de alarme mundial, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu como meta prioritária do milênio prevenir e tratar eficazmente este tipo de doenças (World Health Statistics, 2015). Uma das principais ferramentas para atingir este objetivo são as vacinas, que tradicionalmente são formuladas a partir dos mesmos organismos causadores das doenças, entre eles vírus, bactérias ou fungos, sejam vivos atenuados ou mortos. Este tipo de preparação de vacinas pode causar efeitos colaterais no paciente devido à presença de contaminantes provenientes do material celular dos organismos utilizados.

Para garantir maior eficácia e segurança das vacinas, foi necessário desenvolver novas metodologias para sua formulação, assim, no início do Século XXI surgiu uma nova geração de vacinas produzidas a partir de glicoconjugados. Estes compostos são formados mediante uma ligação covalente entre um carboidrato (principalmente oligossacarídeos) e outra biomolécula, que pode ser uma proteína ou um lipídeo, cumprindo importantes funções no reconhecimento tanto celular quanto molecular e interagindo com o sistema imunológico. Na produção deste tipo de vacinas é utilizado somente o glicoconjugado sintetizado pelo organismo causador da doença, fato que diminui o risco de contaminação biológica na formulação. A principal estratégia para obter estes glicoconjugados consiste na sua extração diretamente da parede celular dos organismos para os quais se quer a vacina, assim sendo, continua existindo a possibilidade de contaminação do produto de interesse com outros componentes (HUDAK & BERTOZZI, 2013; ADA & ISAACS, 2003).

Neste contexto, com a finalidade de evitar a contaminação biológica nas formulações de vacinas, os glicoconjugados começaram a ser preparados mediante síntese química, uma vez elucidada a estrutura química do composto produzido pelo micro-organismo. Esta abordagem aumentou o interesse nesta área, surgindo a glicoengenharia como a ciência responsável pela pesquisa que envolve transformações químicas dos carboidratos, síntese de oligossacarídeos e estabelecimento de novas ligações glicosídicas, com a finalidade de sintetizar novos glicoconjugados, para sua posterior utilização nas formulações de vacinas (HUDAK & BERTOZZI, 2013; MORELLI *et al*, 2011).

Porém, apesar dos diversos avanços realizados nesta área, o maior desafio continua sendo a regioselectividade das reações necessárias para a síntese dos oligossacarídeos, já que estes

possuem diversos grupos hidroxila com reatividade química semelhante. Por esta razão, a metodologia tradicional de sínteses química destes carboidratos exige a preparação prévia de blocos estruturais, que se constituem de monossacarídeos parcialmente protegidos, que são sintetizados também mediante técnicas convencionais da química orgânica (HORROBIN *et al*, 1998). Esta rota sintética apresenta várias desvantagens, tais como a necessidade de várias etapas de proteção e desproteção dos grupos funcionais do material de partida, uso de catalisadores e solventes tóxicos, ou condições drásticas de temperatura e pressão (RATHER & MISHRA, 2013).

Uma alternativa viável para substituir a metodologia química de síntese deste tipo de blocos estruturais é a biocatálise, na qual mono e oligossacarídeos são transformados regioselectivamente mediante reações de acilação ou desacilação (dependendo do caso), sendo as lipases e esterases as enzimas que apresentam maior interesse científico e comercial. Entretanto, a aplicação dos processos enzimáticos em larga escala é dificultada em razão do alto custo de produção e purificação das enzimas, e as baixas produtividades dos processos biocatalíticos, em comparação com os processos químicos. Devido a essas limitações, os pesquisadores têm desenvolvido metodologias que diminuem o custo de produção de enzimas que posteriormente possam ser aplicadas na síntese de diversos produtos de química fina, especialmente da área médica (BHARDWAJ & GARG, 2012). Entre estas metodologias está a aplicação da fermentação em estado sólido (FES) como técnica de produção de lipases a partir de matérias-primas residuais, gerando um sólido fermentado que pode ser aplicado diretamente ao sistema reacional, o que possibilita a eliminação das etapas de extração e purificação das enzimas (ZAGO *et al*, 2014; SOARES *et al*, 2013; BOTTON *et al*, 2013; SALUM *et al*, 2010; FERNANDES *et al*, 2007). Tanto bactérias quanto fungos têm sido utilizados para desenvolver a FES, entre eles, o gênero *Burkholderia* tem se destacado em produzir um sólido fermentado seco com lipases que apresentam grande potencial para catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação (SOARES *et al*, 2013; SALUM *et al*, 2010; FERNANDES *et al*, 2007). Porém, estudos da regioselectividade das enzimas presentes neste tipo de sólido fermentado seco ainda não têm sido realizados, nem tem sido reportados na literatura estudos com aplicação do sólido fermentado seco como biocatalisador para a síntese de produtos de química fina.

Com base nestas considerações, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a regioselectividade das enzimas presentes no sólido fermentado de *B. contaminans* LTEB11 (produzido a partir de resíduos agroindustriais), mediante a síntese de ésteres de metil- α -D-glucopiranosídeo com acetato de vinila como agente acilante, derivados de carboidratos que

têm potencial de utilização como blocos estruturais na preparação de glicoconjugados. A influência do sistema reacional utilizado na síntese enzimática foi estudada com a finalidade de desenvolver uma metodologia biocatalítica seletiva, simples, pouco agressiva ao meio ambiente, eficiente e economicamente viável, visando o aumento de escala do processo enzimático.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIPASES

2.1.1 Definição

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, que “*in vivo*” têm como principal função catalisar a reação de hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono) na interface lipídio/água, produzindo os ácidos graxos correspondentes, di- ou monoacilgliceróis e glicerol. Apesar de serem os triacilgliceróis o substrato natural das lipases, estas também são capazes de utilizar outros tipos de substratos e catalisar outros tipos de reações, dependendo do meio reacional utilizado (aquoso ou orgânico). Assim, na presença de um nucleófilo que pode competir com a água, é possível conduzir um número significativo de reações úteis em biocatálise, como esterificação, interesterificação, alcóolise, acidólise e aminólise (Figura 1), com alta especificidade, estabilidade e aplicando condições brandas (DIAZ *et al*, 2006; JAEGER & EGGERT, 2002).

Lipases são classificadas segundo sua interação com o substrato como quimiosseletivas, quando a enzima atua em um único grupo funcional da molécula do substrato com mais de uma funcionalidade, enantiosseletivas, quando reconhecem preferencialmente um dos isômeros de uma mistura racêmica e regiosseletivas, quando são capazes de distinguir as diferentes posições de grupos funcionais idênticos (SUN & XU, 2009; CHOJNACKA, OBARA & WAWRZENCZY, 2007; JAEGER & REETZ, 1998).

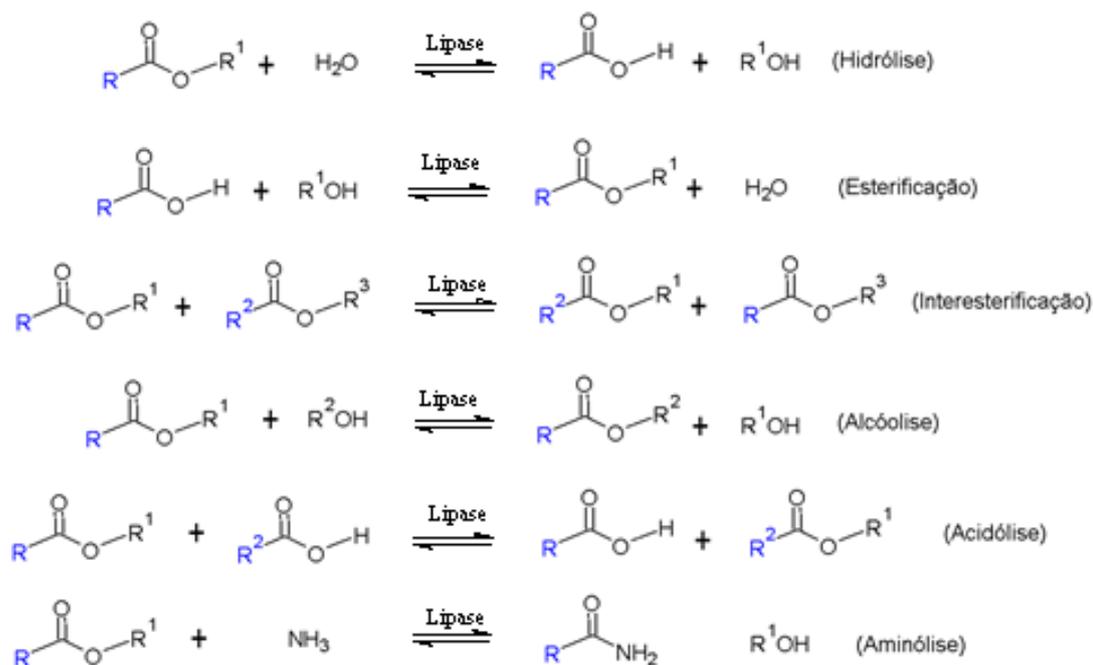


FIGURA 1. REAÇÕES QUÍMICAS CATALISADAS POR LIPASES

2.1.2 Aspectos estruturais e mecanismo de ação

As lipases pertencem à superfamília estrutural das α/β -hidrolases (OLLIS *et al*, 1992), cujas atividades dependem principalmente de um sítio catalítico formado por uma tríade catalítica, geralmente composta por resíduos de serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp) ou glutâmico (Glu) (DEREWENDA, 1994). Na maioria das lipases existe uma α -hélice curta que recobre o sítio catalítico chamada de “tampa” ou “lid” hidrofóbica, já que possui cadeias laterais hidrofóbicas. Em ambientes aquosos e na ausência de substratos hidrofóbicos, a lipase encontra-se na sua forma fechada. Na presença de substratos hidrofóbicos em solução aquosa, as lipases interagem com a interface hidrofóbica, promovendo uma alteração na conformação da lid que deixa a enzima na forma “aberta” e, portanto, cataliticamente ativa (SCHRAG *et al*, 1997; BRADY *et al*, 1990).

O mecanismo catalítico proposto para a reação de hidrólise de ésteres mediada por lipases é mostrado na Figura 2 numa sequência de seis etapas. No primeiro passo (1) a interação do resíduo negativamente carregado de aspartato (ou glutamato) permite ao resíduo de histidina agir como uma base, removendo um próton do grupo hidroxila do resíduo de serina do sítio ativo, aumentando seu caráter nucleofílico e gerando um íon alcóxido. Em seguida, na etapa 2, este íon alcóxido ataca a carboxila do substrato éster, formando o primeiro intermediário

tetraédrico, que consiste em um oxianion estabilizado por ligações de hidrogênio; posteriormente, no passo 3, há uma quebra da ligação éster com saída da porção alcoólica e formação do intermediário acil-enzima; na etapa 4 ocorre a hidrólise do intermediário acil-enzima, seguido pela formação do segundo intermediário tetraédrico (5) e, finalmente, na etapa 6, ocorre a formação do produto e regeneração do sitio ativo (CAMPBELL, 1995).

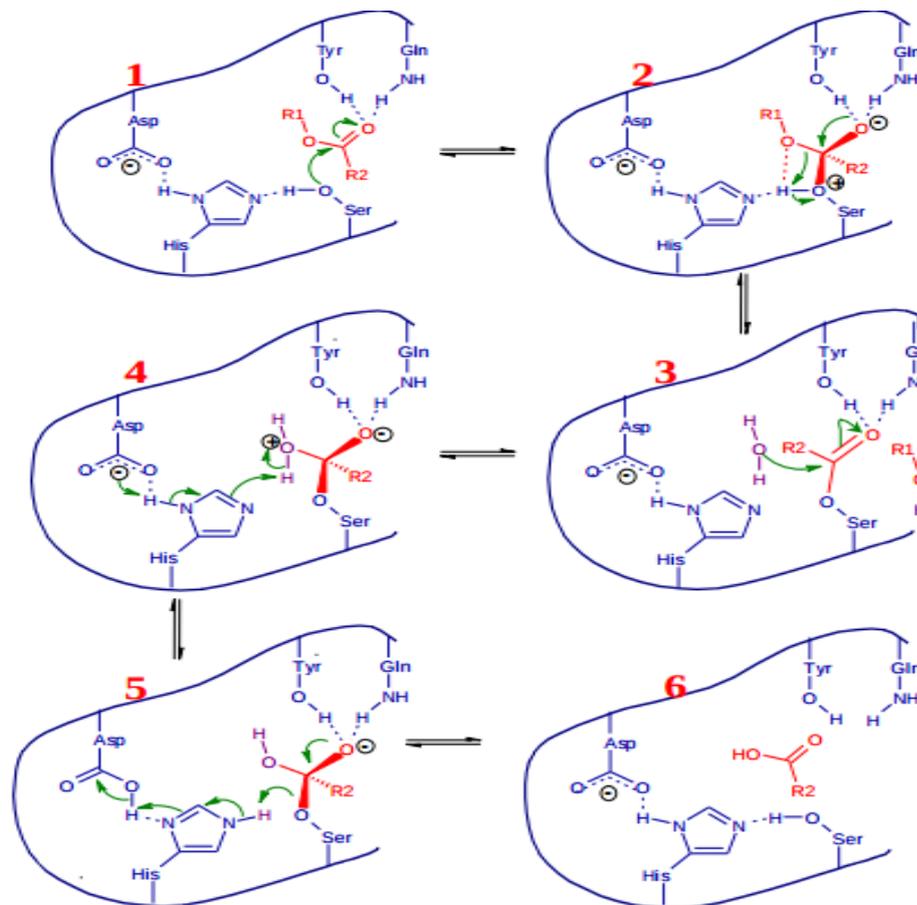


FIGURA 2. MECANISMO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASE

Fonte: CAMPBELL (1995)

A maioria das lipases possui massa molecular entre 30 e 60 kDa, sendo que a cadeia polipeptídica da lipase de *B. cepacia* (da mesma família que *B. contaminans* LTEB11) apresenta uma massa molar de aproximadamente 33 kDa e contém 320 resíduos de aminoácidos (NOBLE *et al*, 1993). As estruturas tridimensionais desta lipase foram determinadas por Schrag *et al* (1997), que relataram 11 α -hélices e 8 fitas β (Figura 3), onde o resíduo Ser87 catalítico situa-se no final da região C-terminal da fita β 5 na fita-volta hélice. O

resíduo ácido, Asp264, também catalítico, faz parte de uma volta que segue a fita $\beta 7$ e o resíduo His286 está localizado na alça que segue a fita $\beta 8$.

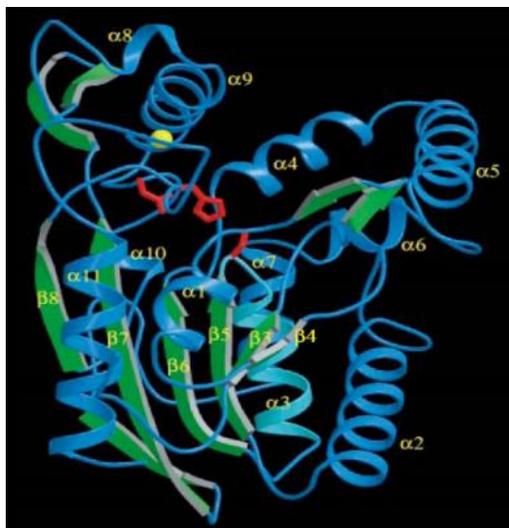


FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CONFORMAÇÃO ABERTA DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia*

As fitas β estão representadas como setas de cor verde, as hélices em azul e os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho (SCHRAG *et al*, 1997).

2.1.3 Produção de lipases de *Burkholderia cepacia* e sua aplicação em biocatálise

Lipases podem ser produzidas por plantas, animais e por micro-organismos, geralmente são enzimas extracelulares e o seu papel biológico está relacionado ao metabolismo de lipídios. Nos últimos anos, as lipases microbianas têm ganhado maior interesse industrial, pois apresentam algumas vantagens em relação às de origem vegetal ou animal, entre elas maior variedade, maior disponibilidade e menor custo de produção (TREICHEL *et al*, 2010; KADEMI *et al*, 2003). As lipases microbianas podem ser produzidas mediante processos fermentativos, seja por fermentação submersa (FS) ou por fermentação em estado sólido (FES), requerendo um meio de cultivo com fontes de carbono, lipídios e outros nutrientes (LOTTI *et al*, 1998). A fonte de lipídios, que induzem a produção das lipases, pode ser constituída por triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres, surfactantes ou sais biliares, e as fontes de carbono são principalmente polissacarídeos e aminoácidos (GUPTA *et al*, 2004; GILBERT *et al*, 1991).

Na FES, o micro-organismo cresce em substratos sólidos ou suportes inertes com pouca quantidade de água livre (MITCHELL *et al*, 2006), o que apresenta várias vantagens ambientais e econômicas em relação à FS convencional. Entre as vantagens, estão a utilização de substratos sólidos naturais como resíduos agroindustriais, menor consumo de energia e água, e pouca produção de águas residuais. Desta maneira, o processo da FES obedece a uma tecnologia simples e autossustentável que contempla dois propósitos diferentes: geração de produtos de alto valor agregado e gestão de resíduos, ganhando maior relevância para a produção de enzimas microbianas e sua aplicação em biocatálise (RANI & GHOSH, 2011; PANDEY, 2003).

Nesta direção, o grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), desde o ano 2004, têm desenvolvido vários projetos para a produção de lipases por FES utilizando bactérias e fungos a partir de resíduos agroindustriais, avaliando sua aplicação em biocatálise. A bactéria *Burkholderia cepacia* LTEB11(SFBC), reclassificada recentemente como *Burkholderia contaminans* LTEB11 (VANLAERE *et al*, 2009) e o fungo *Rhizopus microsporus* são os micro-organismos mais estudados pelo LTEB, pois produziram lipases com atividades enzimáticas promissórias e mostraram estabilidade em meios orgânicos (ZAGO *et al*, 2014; BOTTON, 2014; SOARES *et al*, 2013; SALUM *et al*, 2010; FERNANDES *et al*, 2007).

Fernandes *et al* (2007) foram pioneiros em produzir e aplicar o sólido fermentado de SFBC liofilizado em reações de esterificação e transesterificação. Para a reação de esterificação, foram utilizados ácido oleico e etanol como substratos, dissolvidos em *n*-heptano que com adição direta de SFBC, foi obtida uma conversão em oleato de etila de 94% após 18 h. Na reação de transesterificação utilizou-se óleo de milho e etanol em *n*-heptano, com adição direta de SFBC e atingindo-se uma conversão de 95% em ésteres etílicos em 120 h.

Posteriormente, Salum *et al* (2010) otimizaram a produção de SFBC, conseguindo dobrar a atividade lipolítica obtida anteriormente. Aplicando SFBC produzido na reação de transesterificação em reator de leito fixo, a partir de óleo de soja e etanol em sistema livre de solvente, os autores obtiveram 95% de conversão em ésteres etílicos após 46 h. Na sequência, Soares *et al* (2013) otimizaram e escalonaram o processo de produção de ésteres etílicos (em escala quatro vezes maior), utilizando um reator de leito fixo preenchido com SFBC e meio reacional composto por borra ácida de óleo de soja e etanol em sistema livre de solvente, reportando uma conversão de 92% em 31 h.

O sucesso obtido na aplicação de sólidos fermentados principalmente na produção de ésteres etílicos (principais componentes do biodiesel) motivou os estudos de avaliação do potencial deste biocatalisador em outro tipo de reações, como por exemplo, na síntese de produtos de química fina. Nesta direção, tem sido estudada a aplicação de sólidos fermentados na síntese de lipídios estruturados e na resolução cinética de álcoois secundários. Rasesa et al (2012) utilizaram os sólidos fermentados de *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* como catalisadores para a produção de lipídios estruturados, mediante a reação de transesterificação ácida utilizando óleo de oliva extra virgem e ácido cáprico como substratos, em sistema livre de solvente, obtendo uma incorporação de 26 % (m/m) de ácido cáprico após 24 h, dando origem a um produto com as características físicas adequadas para a produção de margarinas.

Posteriormente, foi estudada a enantiosseletividade das lipases do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM, mediante a reação de transesterificação do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol com acetato de isopropenila, obtendo-se 23% de conversão em 96 h com solvente *n*-heptano, mostrando a enantiopreferência das lipases para o isômero *S* do substrato (TODO BOM, 2014).

Além da aplicação de sólidos fermentados como biocatalisadores ser uma metodologia inovadora, tem a vantagem de reduzir o custo do processo enzimático, pois não há necessidade de extração, purificação e imobilização das lipases após a produção por FES, porque depois da secagem, o sólido fermentado seco é adicionado diretamente no meio reacional.

2.1.4 Lipases e regioseletividade

Devido à regioseletividade apresentada *in vivo* pelas lipases em sistemas onde existe a possibilidade de formação de vários isômeros estruturais, estas enzimas têm se tornado biocatalisadores atrativos para reações de síntese de compostos de importância industrial. Assim sendo, as lipases extensivamente utilizadas para acilar seletivamente as hidroxilas primárias e/ou secundárias dos carboidratos e de nucleosídeos, e também para hidrolisar seletivamente estas biomoléculas previamente peraciladas (SABAINI *et al*, 2010).

Vários autores têm utilizado as lipases produzidas por cepas de *Burkholderia sp* para a acilação regioseletiva de carboidratos em diferentes condições de reação: com substratos mono, di ou polissacarídeos, com diferentes tipos de agente acilante (de cadeia curta ou longa), em presença de diferentes sistemas reacionais, utilizando principalmente solventes

orgânicos e mais atualmente líquidos iônicos (LIs), mas os estudos em sistemas livres de solvente são escassos (Tabela 1).

TABELA 1. EXEMPLOS DE UTILIZAÇÃO DE LIPASES COMERCIAIS NA ACILAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Lipase	Substratos		Condições		Conversão (%)	Posição do grupo acila	Referências
	Carboidrato	Agente acilante	Solvente	Temperatura (°C)			
Novozyme 435	¹ Cordicepina	Acetato de vinila	[C ₂ MIm][BF ₄]	50	56,1 (6 h)	5	Zhang <i>et al</i> (2014)
Novozyme SP435	β-D-glucopiranosídeo	Acetato de vinila	Acetona	55	54 (36 h)	6	Park & Kazlauskas (2001)
<i>Burkholderia cepacia</i> (PSL-C Amano)	² LP	Acetato de vinila	MeTHF [C ₄ MIm][BF ₄] (20% v/v)	55	61 (24 h)	6	Chen <i>et al</i> (2013)
Lipolase 100T	Metil-α-D-glucopiranosídeo	Ésteres vinílicos de ácidos fenólicos	Acetonitrila	37	77 (42 h)	6	Mastihubová & Mastihuba (2013)
Novozyme 435	Maltose	Ácido linoleico	Acetona/dimetilformamida (1:1)	65	72,1 (72 h)	6	Fischer <i>et al</i> (2013)
Novozyme 435	Metil-α-D-glucopiranosídeo	Ácido caprílico	[4bmpy][PF ₆]	50	65 (72 h)	6	Mutschler <i>et al</i> (2009)
Novozyme 435	Etil-D-glucopiranosídeo	Butirato de vinila	THF	60	81 (1 h)	6	Gonçalves <i>et al</i> (2004)
<i>Candida rugosa</i> (CRL, Sigma)	Metil-6-O-tritil-β-D-glucopiranosídeo	Acetato de vinila	[BMIm][BF ₆]	Temperatura ambiente	82 (60 h)	2	Kim <i>et al</i> (2003)
Novozyme 435	α-D-glucopiranosídeos	Acetato de vinila	THF/piridina (4:1)	45	98 (20 h)	6	Danieli <i>et al</i> (1997)
<i>Pseudomonas cepacia</i> (Amano)	Metil-6-O-tritil-α-D-glucopiranosídeo	Acetato de vinila	Livre de solvente	37	75 (24 h)	2	MacManus & Vulfson (1995)

1: 3'-desoxiadenosina derivado de *Camellia sp.* 2: polissacarídeo derivado de *Lilium lancifolium*, composto por unidades de D-glucose e D-manose com ligações β-1,4.

Além disso, estes estudos estão limitados até agora à utilização de enzimas comerciais imobilizadas em suportes sintéticos, obtendo-se geralmente maiores conversões na presença de solventes orgânicos ou LI, gerando principalmente um produto monoacilado no carbono da posição 6 do carboidrato (CHEN *et al*, 2013; FISCHER *et al*, 2013; DANIELI *et al*, 1997).

Park e Kazlauskas (2001) utilizaram a lipase Novozyme SP435 (30 mg) para a acetilação do β -D-glucopiranosídeo (0,5 mmol) com acetato de vinila (1 mmol) em presença de vários tipos de solventes, entre eles LI (Figura 4). Para todos os casos, foram gerados dois produtos com grau de acetilação diferente. Um deles, um monoéster no carbono da posição 6 (6-O-acetil-D-glucopiranosídeo), e o outro, um diéster posicionado nos carbonos nas posições 3 e 6 (3,6-O-diacetil-D-glucopiranosídeo), com conversões de até 54% em 36 h, utilizando acetona como solvente (1 mL).

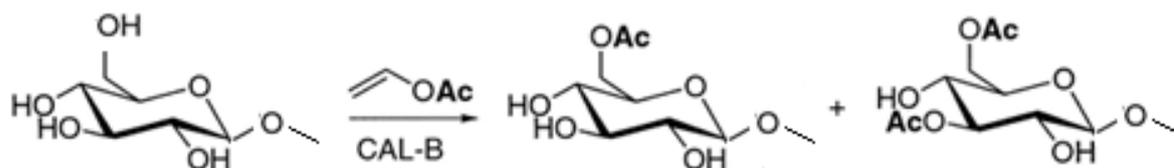


FIGURA 4. REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DO METIL- β -D-GLUCOPIRANOSÍDEO CATALISADA POR NOVOZYME SP435

Fonte: Adaptado do Park e Kazlauskas (2001).

Resultados similares foram obtidos para a reação de acilação da maltose com ácido linoleico, catalisada por *Pseudomonas cepacia* (Figura 5), em diferentes solventes orgânicos e LIs, produzindo-se uma mistura de dois monoésteres (na proporção 1,4:1), ambos acilados no carbono da posição 6 de cada monômero da maltose, com conversão de 72% em 72 h, utilizando uma mistura de acetona/dimetilformamida (DMF) 1:1 v/v como solvente (FISCHER *et al*, 2013).

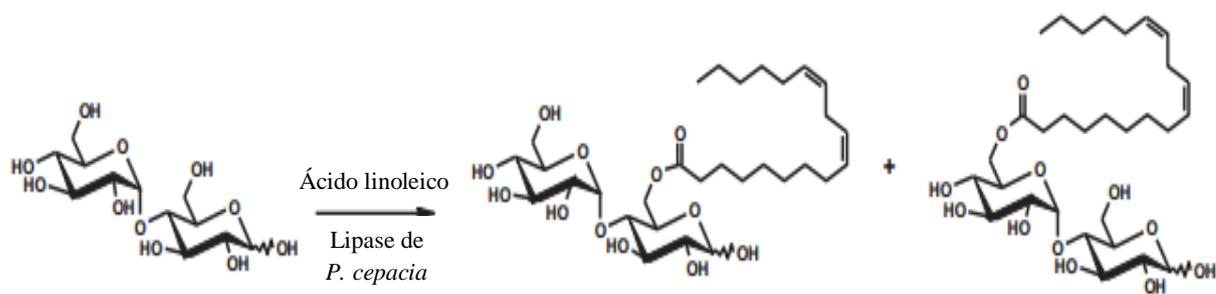


FIGURA 5. REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE MALTOSE CATALISADA PELA LIPASE COMERCIAL DE *Pseudomonas cepacia*

Fonte: FISCHER *et al* (2013).

Outro estudo similar, foi realizado em 1997, Danieli *et al* utilizaram acetato de vinila (1 mL) para acetilar o α -MetGlc (100 mg), em reação catalisada pela lipase Novozyme 435 (50 mg), obtendo-se um monoéster no carbono da posição 6 e uma conversão de 98% após 20 h, utilizando uma mistura de THF/piridina (4:1 v/v) como solvente (Figura 6).

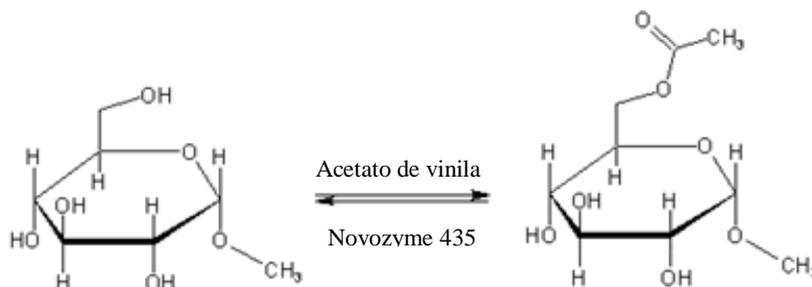


FIGURA 6. REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO CATALISADA PELA LIPASE NOVOZYME 435

Fonte: Adaptado de Danieli *et al* (1997).

Observa-se que nesta seleção de estudos, além de utilizarem-se lipases comerciais, são empregados sistemas de reação com solvente, ou seja, solventes orgânicos ou LI. Assim sendo, proporcionar uma metodologia mais amigável com o ambiente e mais econômica é fundamental para a aplicação industrial deste tipo de processos.

2.2 GLICOCONJUGADOS

Os carboidratos são componentes universais e essenciais presentes nos seres vivos, constituídos por blocos estruturais chamados monossacarídeos, que dão origem a biomoléculas complexas, tais como oligossacarídeos, polissacarídeos e glicoconjugados (JU *et al*, 2011; HANISH, 2001; WENNEKES *et al*, 2009; SOMERVILLE, 2008; APWEILER *et al*, 1999).

As principais funções dos carboidratos na natureza são armazenar energia e constituir o material estrutural das plantas e animais. No entanto, com o passar do tempo, foi descoberta a importância biológica dos glicoconjugados, tanto de glicoproteínas quanto glicolipídeos (RADEMACHER *et al*, 1988).

Como foi mencionado, os glicoconjugados estão formados geralmente por uma proteína ligada covalentemente a um carboidrato, que pode ser constituído por um ou vários polissacarídeos como mostrado na Figura 7. Estes carboidratos são chamados de carboidratos antígenos, que são derivados de células patogênicas que apresentam um elevado potencial para o diagnóstico de doenças e para o tratamento delas a partir do desenvolvimento de vacinas, devido a suas estruturas químicas únicas e específicas.

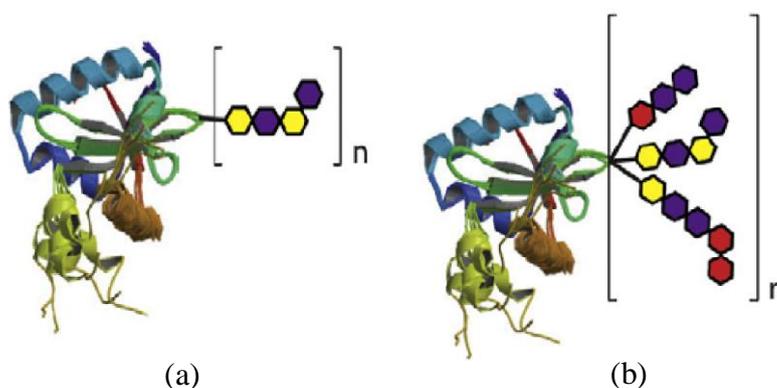


FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DE GLICOCONJUGADOS, CONSTITUÍDOS DE DIFERENTES TIPOS DE CARBOIDRATOS

(a) com só um tipo de polissacarídeo, (b) com vários tipos de polissacarídeos. Fonte: Adaptado de HECHT *et al* (2009).

Atualmente, estas vacinas baseadas em glicoconjugados são produzidas mediante a extração direta dos glicoconjugados dos próprios organismos patogênicos, com a

problemática de extrair também outros componentes da parede celular, impurezas que podem causar efeitos colaterais no paciente (POOLMAN & BORROW, 2011; ADA & ISAACS, 2003).

Além da complexidade da etapa de extração do glicoconjugado, são necessários múltiplos passos de purificação para obter a formulação final da vacina, exigindo controles de qualidade estritos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Portanto, os glicoconjugados sintéticos têm sido uma opção atraente para produzir vacinas livres deste tipo de contaminantes (SEEBERGER & WERZ, 2007), além que permitem que o processo de fabricação de vacinas seja reprodutível, mais eficiente e potencialmente mais barato (ANISH *et al*, 2014).

Para a síntese química dos oligo ou polissacarídeos que formam os glicoconjugados, são necessárias grandes quantidades de blocos estruturais, constituídos de monossacarídeos diferencialmente funcionalizados com grupos protetores, já que as ligações glicosídicas devem ser específicas entre eles, em concordância com a estrutura química do glicoconjugado natural (ADIBEKIAN *et al*, 2008). Esta estratégia tem sido bem sucedida para o desenvolvimento de glicoconjugados candidatos a serem utilizados na formulação de vacinas contra doenças parasitárias, tais como malária, leishmaniose e mal de Chagas, contra infecções bacterianas, como tuberculose, e as causadas por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* tipo b, contra infecções virais como VIH e até contra o câncer (SONG *et al*, 2016; BERMUDEZ *et al*, 2016; KALLENIOUS *et al*, 2008; LIU *et al*, 2006; WANG, 2006; VEREZ-BENCOMO *et al*, 2004).

Por exemplo, em 2002, Schofield e sua equipe sintetizaram quimicamente mediante nove etapas (Figura 8), o oligossacarídeo de *Plasmodium falciparum*, glicosilfosfatidilinositol (GPI). O carboidrato foi depois conjugado com transportadores proteicos para formular uma potencial vacina contra a malária.

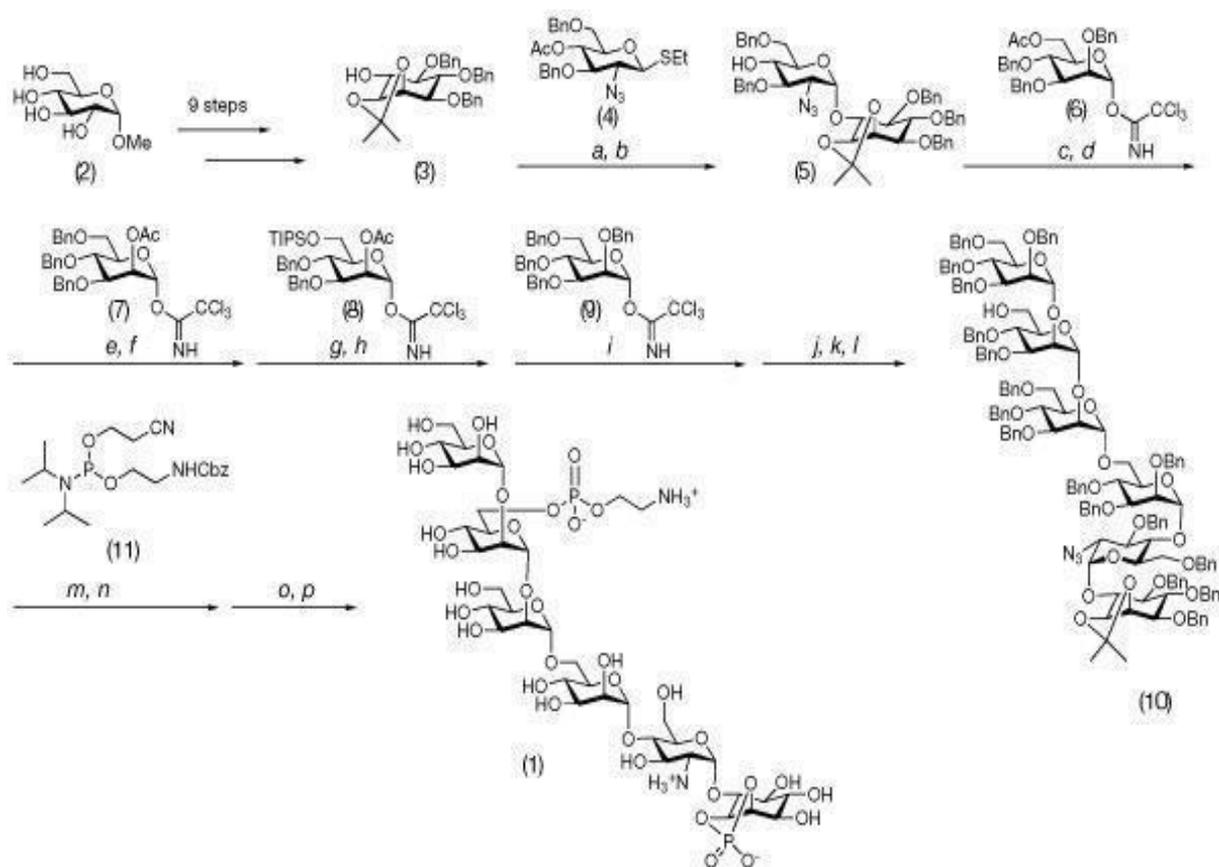


FIGURA 8. SÍNTESE QUÍMICA DO OLIGOSSACARÍDEO DE *Plasmodium falciparum* PARA UM PROTÓTIPO DE VACINA CONTRA A MALÁRIA

Fonte: Schofield *et al* (2002).

Outro importante aporte foi a síntese química do tetrassacarídeo antígeno, conjugado posteriormente para formar um lipofosfoglicosídeo para desenvolver uma vacina contra a leishmaniose, doença que na atualidade é tratada com vacinas produzidas à base de antimônio, que são caras e estão associadas com efeitos colaterais significativos (LIU *et al*, 2006).

Com base nestes resultados promissores, muitos pesquisadores estão trabalhando na síntese química de novas vacinas à base de glicoconjugados que apresentam atividade imunizadora contra outras doenças infecciosas e que sejam mais acessíveis para a população mundial (CIPOLLA *et al*, 2008; POZSGAY, 2008; OUFERELLI *et al*, 2005).

Porém, os estudos da aplicação das reações enzimáticas para essa finalidade são muito escassos. A maioria deles reportam a utilização de lipases comerciais imobilizadas em suportes sintéticos como catalisadores das reações regioseletivas de carboidratos e são dirigidos somente à identificação dos produtos obtidos mediante técnicas espectroscópicas, e à otimização das condições reacionais em pequena escala, produzindo quantidades de produto

na faixa de miligramas, em tempos prolongados de reação. Além disso, normalmente, estas lipases comerciais têm um custo elevado, fato que limita sua aplicação somente a escala laboratorial; assim sendo, não têm sido reportados na literatura estudos de aumento de escala da produção de blocos estruturais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar, por via enzimática, ésteres de α -D-glucose com acetato de vinila como agente acilante, mediante a aplicação direta do sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia contaminans* LTEB11, visando sua aplicação na síntese de glicoconjugados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Aumentar a atividade lipolítica do sólido fermentado de *B. contaminans* LTEB11 produzido com resíduos agro-industriais, pela variação dos componentes do meio de cultivo sólido, particularmente pela adição de indutores da atividade lipolítica.

3.2.2 Comprovar a regiosseletividade da síntese enzimática de ésteres de α -D-glucose através de técnicas espectroscópicas.

3.2.3 Estabelecer as condições da síntese enzimática de metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo, utilizando o sólido fermentado de *B. contaminans* LTEB11, avaliando os efeitos do sistema reacional na estabilidade da atividade de hidrólise das lipases, e no rendimento experimental da síntese.

3.2.4 Aumentar a escala de produção enzimática de metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo utilizando o sólido fermentado de *B. contaminans* LTEB11.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios experimentais deste trabalho foram realizados no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biotecnologia (LTEB), no Laboratório do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), situados na Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Este trabalho foi desenvolvido mediante diferentes etapas apresentadas no diagrama da Figura 9, onde estão descritos os métodos utilizados.

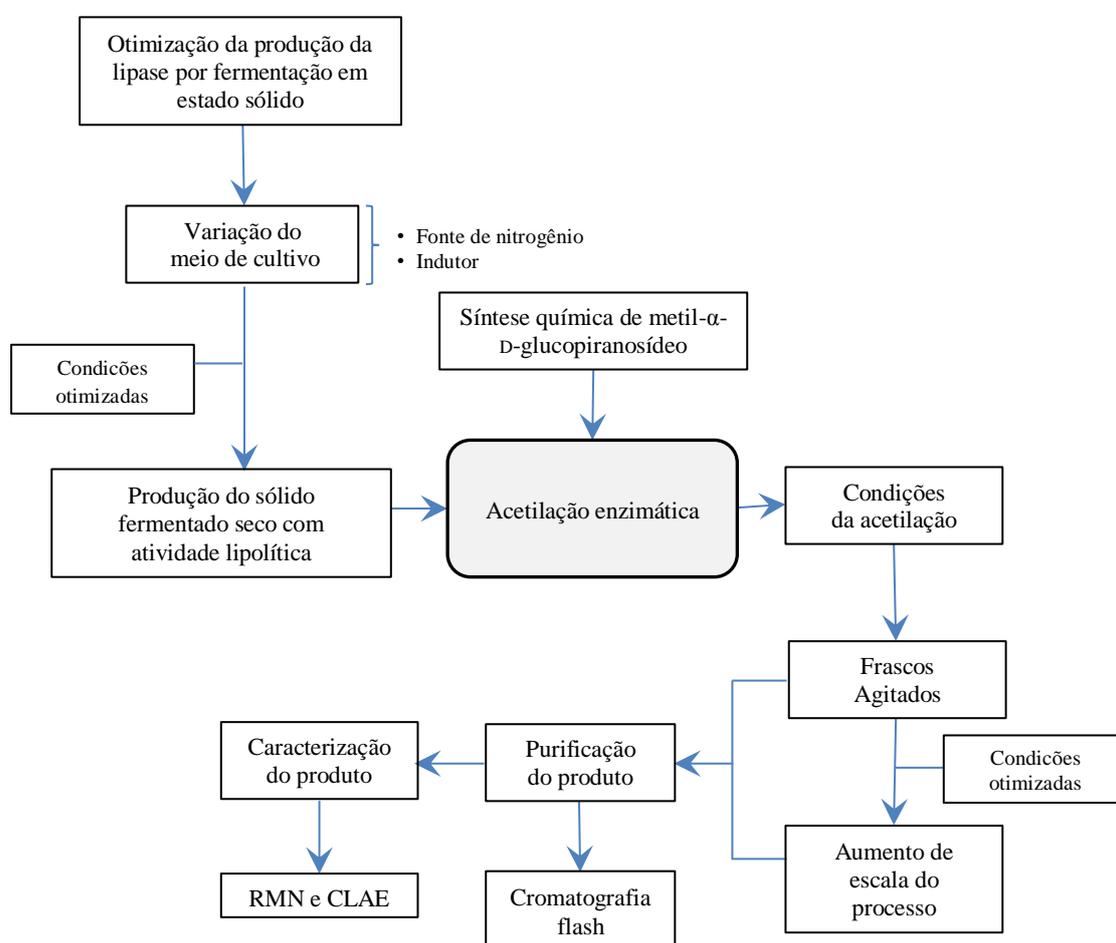


FIGURA 9. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

4.3 MATERIAIS E REAGENTES

A α -D-glucose anidra (96% de pureza) e o LI 1-etil-3-metilimidazólio metanosulfonato [emim][MeSO₃] foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). O ácido sulfúrico utilizado para a preparação da fase móvel foi de qualidade HPLC e adquirido da Tedia (Ohio, EUA). A lipase de *Candida antarctica* B (NOVOZYME 435) foi gentilmente doada por Novozymes Latin America Ltda (Araucária, Paraná, Brasil). O bagaço de cana foi doado pela Usina de Alcool Melhoramentos (Jussara, Paraná, Brasil). A semente de girassol e o óleo de soja Liza da Cargill (São Paulo, Brasil) foram adquiridos no mercado local. Os solventes orgânicos e demais reagentes atenderam o grau analítico e foram utilizados sem tratamento prévio.

4.3.1 Síntese química do metil- α -D-glucopiranosídeo

O α -MetGlc foi utilizado como substrato na reação enzimática catalisada pelos sólidos fermentados produzidos. Este composto foi preparado mediante síntese química a partir de α -D-glucopiranosídeo anidro (Figura 10), seguindo a metodologia proposta por Bollenback (1963)

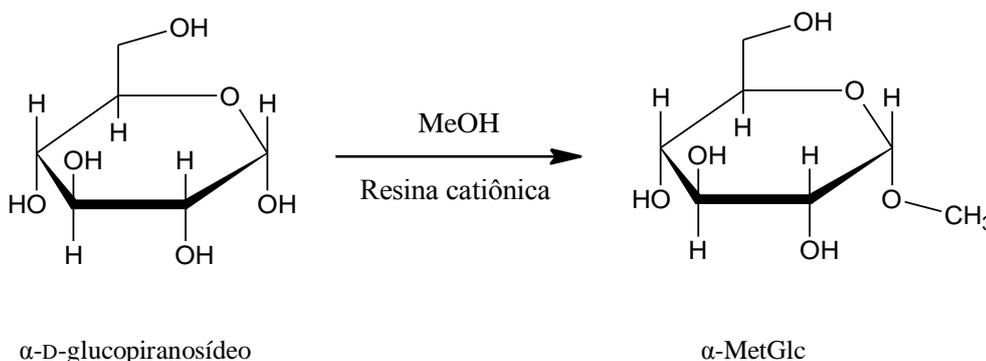


FIGURA 10. REAÇÃO DE GLICOSILAÇÃO DE α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 23,15 g de α -D-glucose anidra (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), 5,8 g de resina catiônica (Arberlite IR 120, Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) e 60 mL de metanol (MeOH). Todos os reagentes permaneceram na forma de suspensão sob agitação magnética e em refluxo por 24 h. Após

esse período, o meio reacional foi filtrado em papel Whatman n. 1 e concentrado em rotaevaporador até metade do seu volume original. A solução resultante foi mantida a 4 °C até ocorrer a cristalização do α -MetGlc, obtendo-se cristais brancos que foram lavados em funil de Büchner com MeOH gelado e secos em temperatura ambiente.

4.4 PRODUÇÃO DAS LIPASES DE *Burkholderia contaminans* LTEB11 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

4.4.1 Micro-organismo e manutenção da cepa

A produção de lipases por FES foi realizada utilizando a cepa bacteriana de *B. contaminans* LTEB11, anteriormente conhecida como *B. cepacia* LTEB11 (VANLAERE *et al*, 2009). Esta cepa foi isolada no LTEB e inicialmente identificada pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA, UNICAMP). Para sua manutenção, o micro-organismo foi inoculado em Eppendorfs com meio Luria Bertani [LB, 1% (m/v) triptona, 1% (m/v) NaCl e 0,5% (m/v) extrato de levedura] com 40% (v/v) de glicerol a -18 °C.

4.4.2 Preparação dos substratos sólidos

Para a FES, foram utilizados os substratos de origem vegetal bagaço de cana (BC) e farinha de semente de girassol (FSG). O BC foi lavado três vezes (com água da torneira) e seco na estufa a 60 °C por 24 h, enquanto as sementes de girassol foram moídas em liquidificador. Após estes processos, devido à heterogeneidade do tamanho das partículas, ambos os substratos sólidos foram tamisados para obter partículas entre 0,85 e 2,36 mm de diâmetro (SOARES *et al*, 2013). Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL, com umidade inicial do meio de cultivo de 75% (m/m). Após a preparação descrita acima, os frascos foram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 20 min. As porcentagens de umidade dos substratos sólidos isolados foram determinadas com 1 g de amostra em balança de infravermelho, conforme descrito em 4.8.1.

Depois esterilização, os frascos foram resfriados à temperatura ambiente e os meios de cultivo sólidos foram inoculados com 1 mL da solução preparada como descrito no item 4.4.3 e imediatamente incubados a 29 °C por 72 h (FERNANDES *et al*, 2007).

4.4.3 Preparo do inóculo

O inóculo para a FES foi preparado vertendo 1 mL da solução estoque de *B. contaminans* LTEB11 em uma placa de Petri, contendo meio sólido LA estéril [50 mL de meio LB com 1,5% (m/v) de ágar bacteriológico]. Para o crescimento da bactéria, a placa de Petri inoculada foi incubada em estufa por 48 h a 29 °C. Após este período, foi recortado um círculo de 5 mm do ágar contendo a bactéria crescida, sendo este imediatamente transferido para um frasco Erlenmeyer de 125 mL, que continha 30 mL de meio LB. O frasco foi incubado em agitador orbital a 200 rpm e 29 °C por um período de entre 6 a 8 h, até o meio atingir uma absorbância na faixa de 0,8 e 1,0 no comprimento de onda de 600 nm, onde o micro-organismo se encontra na sua fase de crescimento exponencial, de acordo com o estudo cinético realizado por FERNANDES *et al* (2007).

4.4.4 Fermentação em estado sólido

4.4.4.1 Produção do sólido fermentado nas condições-padrão

Inicialmente, foi produzido o sólido fermentado na condição A (SFS1) reportada previamente por SOARES *et al* (2013), mostrado na Figura 11. Foram utilizados frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 10 g (base seca) de mistura de FSG e BC, na proporção 1:1 (m/m). A umidade inicial da mistura foi ajustada com adição de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹ e pH 7,0), atingindo 75% (m/m). Em seguida, os Erlenmeyers foram autoclavados a 120 °C por 20 min e resfriados à temperatura ambiente. Após isto, foram inoculados com 1 mL do inóculo (4.4.3) e incubados em estufa bacteriológica a 29 °C por 72 h. Os experimentos foram realizados em triplicata e com controles sem inóculo da bactéria. Esta metodologia foi referência para o preparo dos outros meios de cultivo da FES, e também foi utilizada como padrão de comparação da atividade enzimática para a seleção do sólido fermentado com melhor potencial como biocatalisador.

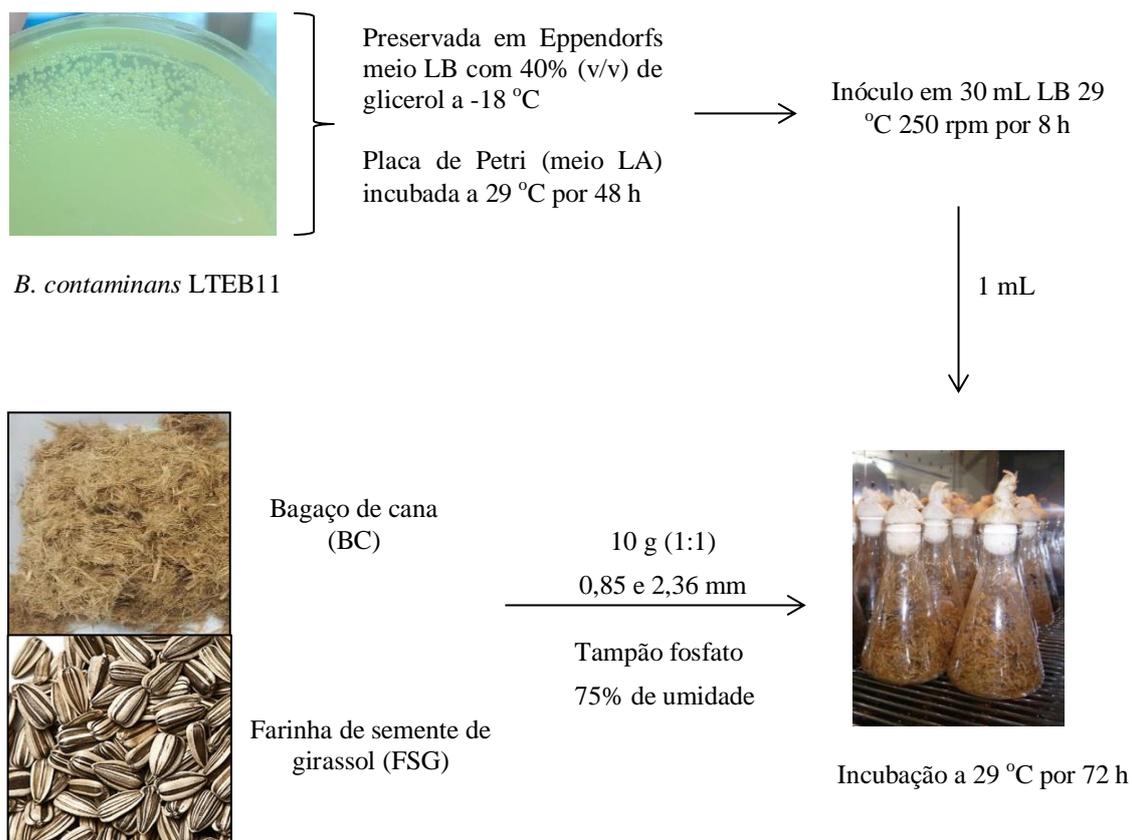


FIGURA 11. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO NAS CONDIÇÕES PADRÃO

4.4.4.2 Variações do meio de cultivo da fermentação em estado sólido

Com o objetivo de melhorar a atividade lipolítica do sólido fermentado SFS1 (4.4.4.1), foram realizadas mais duas variações do meio de cultivo utilizado no processo fermentativo (condições B e C), em relação ao substrato sólido, solução umedecedora e ao indutor de produção de lipases, que estão descritas na Tabela 2.

TABELA 2. MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM *Burkholderia contaminans* LTEB11

Sólido fermentado	Peso seco (g)		Solução umedecedora (umidade inicial de 75% m/m)
	BC	FSG	
SFS1	5	5	Tampão Fosfato (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0)
SFS2	5	5	Solução nutriente ¹
SFS3	5	0	Solução nutriente com óleo de soja (20% m/m)

Condições de cultivo: umidade inicial 75% (m/m), incubação: 40 °C por 72 h.. ¹Ureia (4 g L⁻¹); lactose (5 g L⁻¹); K₂HPO₄ (5 g L⁻¹); MgSO₄·7H₂O (1 g L⁻¹) e solução de oligoelementos (4 mL L⁻¹); pH 7,0, composta por EDTA (10 g L⁻¹); MnCl₂·4H₂O (1,98 g L⁻¹); CoSO₄·7H₂O (2,81 g L⁻¹); CaCl₂·2H₂O (1,47 g L⁻¹); CuCl₂·2H₂O (0,17 g L⁻¹); ZnSO₄·7H₂O (0,29 g L⁻¹); pH 4,0.

Para a modificação do meio de cultivo A (condição B), manteve-se a mistura 1:1 de BC e FSG (10 g base seca), mas a solução tampão fosfato utilizada para umedecer os substratos sólidos de SFS1 foi substituída por uma solução nutriente sintética preparada conforme o descrito no item 4.4.4.3. Este sólido fermentado foi denominado de SFS2.

Para a terceira modificação estudada (condição C), foi utilizado somente BC como substrato sólido (5 g base seca), sendo umedecido com a mesma solução nutriente sintética utilizada na condição B. Neste cultivo, foi adicionado óleo de soja (LIZA, São Paulo, Brasil) na concentração de 20% (m/m), utilizado como fonte de carbono e indutor da produção de lipases (BOTTON, 2014; RODRIGUEZ *et al*, 2006). Este sólido fermentado foi denominado de SFS3. Para este caso, o óleo de soja foi adicionado à solução nutriente, e em seguida, emulsionado por 1 min em vórtex, antes de umedecer o substrato sólido.

4.4.4.3 Preparo da solução nutriente

A solução nutriente utilizada para umedecer os substratos sólidos para a produção de SFS2 e de SFS3 foi preparada segundo a metodologia descrita por Rodriguez et al (2006), apresentando a seguinte composição: ureia (4 g L⁻¹); lactose (5 g L⁻¹); K₂HPO₄ (5 g L⁻¹); MgSO₄·7H₂O (1 g L⁻¹) e solução de oligoelementos (4 mL L⁻¹). O pH da solução nutriente foi ajustado para 7,0 com HCl a 10% (v/v). A solução de oligoelementos tinha a seguinte

composição: EDTA (10 g L^{-1}); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,98 \text{ g L}^{-1}$); $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($2,81 \text{ g L}^{-1}$); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,47 \text{ g L}^{-1}$); $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,17 \text{ g L}^{-1}$); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,29 \text{ g L}^{-1}$). A fim de dissolver os componentes, o pH da solução de oligoelementos foi ajustado para 4,0 com HCl a 10% (v/v).

4.4.4.4 Secagem do sólido fermentado

Após o período de fermentação, a umidade inicial do sólido fermentado foi determinada em balança de infravermelho e posteriormente este sólido úmido foi seco em coluna com fluxo de ar seco até atingir 10-13% (m/m) de umidade (SOARES *et al*, 2013).

Para este processo de secagem (Figura 12), foi montado um sistema fechado com dois tubos (4,3 cm de diâmetro, 50 cm de altura e 726 mL) de cloreto de polivinila transparentes conectados entre si. O tubo inferior foi preenchido com sílica ativada para secagem do ar introduzido ao sistema e o tubo superior foi preenchido com o sólido fermentado úmido. No topo da coluna superior, foi conectada uma mangueira para a saída do ar, que foi borbulhado em Erlenmeyer contendo uma solução de hipoclorito de sódio 10% (m/v). O ar proveniente de um compressor foi introduzido na base da coluna inferior em sentido ascendente com fluxo de 20 L min^{-1} em temperatura ambiente (aproximadamente $25 \text{ }^\circ\text{C}$), sendo seco na sua passagem pela coluna inferior pela sílica, e, posteriormente, secando o sólido fermentado úmido na coluna superior. Durante este processo, a umidade da sílica foi acompanhada visualmente pela mudança da coloração do indicador da sílica. Após a secagem, o sólido fermentado seco foi armazenado em sacos plásticos, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.



FIGURA 12. SISTEMA DE COLUNA COM FLUXO DE AR SECO UTILIZADO PARA SECAGEM DO SÓLIDO FERMENTADO

Condições: fluxo de ar de 20 L min^{-1} em temperatura ambiente (aproximadamente $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

4.4.4.5 Delipidação do sólido fermentado seco

Considerando que as matérias-primas utilizadas para o preparo dos meios de cultivo das FES possuem lipídeos que ficam retidos no sólido fermentado seco e que estes podem interferir nas determinações das atividades lipolíticas, tanto da hidrólise quanto da esterificação, foi realizado um processo de delipidação dos sólidos fermentados, de acordo com o proposto por Salum et al (2010). Para isto, os lipídeos residuais presentes no sólido fermentado seco foram extraídos com *n*-hexano ($3 \times 20 \text{ mL}$ por grama de sólido fermentado seco), seguido por incubação a 200 rpm e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min . A eficácia do processo de delipidação foi determinada mediante análises por cromatografia de camada delgada (CCD) do sobrenadante, utilizando iodo sublimado como revelador (4.8.4). Posteriormente, o sólido fermentado seco foi filtrado com papel Whatman n. 1 e dessecado a vácuo em temperatura ambiente.

4.4.5 Caracterização dos diferentes sólidos fermentados

Com o objetivo de comparar as características biocatalíticas dos diferentes sólidos fermentados (SFS1, SFS2 e SFS3), foram determinadas suas atividades de hidrólise (4.8.2), de esterificação (4.8.3) e a conversão na reação de acetilação do α -MetGlc (4.5.3). Os experimentos foram realizados em triplicata e com controles que continham cada tipo de sólido fermentado autoclavado (para desnaturação das enzimas).

4.5 SELEÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA A ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA

4.5.1 Determinação da solubilidade do metil- α -D-glucopiranosídeo em diferentes sistemas reacionais

A solubilidade do substrato α -MetGlc foi determinada nos seguintes sistemas reacionais: (a) sistema livre de solvente, contendo somente 20 mL de acetato de vinila (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); (b) 10 mL de acetato de vinila e 10 mL de DMF (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil); (c) 10 mL de acetato de vinila e 10 mL de acetona (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil); (d) 10 mL de acetato de vinila e 10 mL de uma solução de [emim][MeSO₃] (Figura 13) em DMF (10% v/v) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

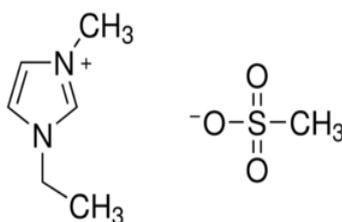


FIGURA 13. ESTRUTURA QUÍMICA DO 1-ETIL-3-METILIMIDAZÓLIO METANOSULFONATO [emim][MeSO₃]

Os testes de solubilidade foram feitos em Erlenmeyers de 25 mL contendo 30 mg de α -MetGlc (pureza do 95%) e 1,4 g de SFS3 autoclavado em 20 mL totais de meio reacional, incubados por 24 h, a 40 °C e 250 rpm. A quantidade do α -MetGlc solubilizado

na fase orgânica de cada sistema reacional foi determinada mediante análises por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) conforme as condições descritas no item 4.8.5.

4.5.2 Efeito do solvente na estabilidade da atividade do sólido fermentado

A estabilidade das lipases foi testada nos seguintes sistemas reacionais: (a) acetato de vinila, (b) acetato de vinila/DMF (1:1 v/v) e (c) acetato de vinila/[emim][MeSO₃] (solução em DMF 10% v/v), 1:1 v/v.

Os experimentos foram feitos com 480 mg de SFS3 e 4,5 mg de α -MetGlc em 4 mL de meio reacional colocados em vials de vidro de 5 mL com tampa de plástico, incubados por 24 h a 40 °C e 250 rpm. A atividade residual de hidrólise do sólido fermentado seco foi determinada após diferentes intervalos de tempo de incubação nos diferentes sistemas reacionais. Para cada intervalo de tempo, o sólido fermentado de um frasco foi removido por filtração em papel Whatman n. 1 e imediatamente foi determinada sua atividade de hidrólise (4.8.2). A atividade residual de hidrólise foi expressa em termos de uma percentagem relativa em relação à atividade apresentada pelo sólido fermentado seco fresco.

Para avaliar a influência da hidrofobicidade do sistema reacional na estabilidade enzimática do sólido fermentado, foi calculado o parâmetro log P para cada um dos sistemas reacionais (Equação 1), segundo Howard & Brown (2002). O log P é um parâmetro utilizado para a escolha de um sistema adequado para um processo biocatalítico e é definido como o logaritmo do coeficiente de partição de um solvente em um sistema padrão composto por as fases octanol/água.

$$\log P_{sr} = \sum \log P_a \cdot X_a \quad (\text{Equação 1})$$

onde: $\log P_{st}$ é o logaritmo de partição do sistema reacional; $\log P_a$ é o logaritmo de partição do solvente a do sistema reacional; X_a é a fração molar do solvente a no sistema reacional.

4.5.3 Acetilação do metil- α -D-glucopiranosídeo com acetato de vinila em sistema livre de solvente

Em biocatálise, um sistema no qual apenas os substratos da reação compõem o meio reacional é chamado de “sistema livre de solvente”. Este tipo de sistema apresenta vantagens, pois dispensa a eliminação de solventes exógenos após a reação enzimática. Neste contexto, as reações preliminares de acetilação do α -MetGlc foram realizadas no sistema livre de solvente, com a finalidade de escolher o sólido fermentado que apresentasse maior conversão na reação.

Com a finalidade de solubilizar a maior quantidade de substrato possível e padronizar as reações de acordo com os testes de solubilidade do α -MetGlc, foram colocados 30 mg (0,08 mmol) de α -MetGlc e 20 mL (217 mmol) de acetato de vinila em frascos Erlenmeyer de 25 mL com tampa de vidro e incubados em agitador orbital por 24 h, a 250 rpm e 40 °C. Após desse período, 1,60 g dos diferentes tipos de sólidos fermentados secos (SFS1, SFS2 e SFS3) foram adicionados aos Erlenmeyers, que continuaram incubados nas mesmas condições por mais 72 h. Ao fim da reação, foram coletadas alíquotas de 500 μ L de cada meio reacional e analisadas através de CLAE (4.8.5). Uma pequena parte dos meios reacionais (5 mL) foi filtrada a vácuo e extraída com os solventes acetato de etila, clorofórmio e MeOH, com a finalidade de selecionar aquele solvente capaz de extrair completamente os produtos formados. Este solvente foi escolhido depois de verificar-se por CCD (4.8.4) a eficiência de extração dos componentes retidos no sólido fermentado. As reações foram realizadas em triplicata e com seus respectivos controles com sólido fermentado seco autoclavado a 120 °C por 20 min.

4.5.4 Efeito do solvente na acetilação do metil- α -D-glucopiranosídeo com acetato de vinila

O efeito da presença do solvente no meio reacional da acetilação do α -MetGlc foi avaliado nos seguintes sistemas: (a) sistema livre de solvente, (b) acetato de vinila e DMF (1:1), (c) acetato de vinila e uma solução de [emim][MeSO₃] em DMF a 10% v/v; (1:1) e (d) acetato de vinila/tetrahidrofurano (THF) (1:1). Os experimentos foram realizados com 4,5 mg (0,02 mmol) de α -MetGlc com 4 mL de meio reacional em vials de vidro de 25 mL incubados em agitador orbital por 24 h a 250 rpm e 40 °C. Após desse período, 480 mg de SFS3 foram adicionados aos vials, que continuaram incubados nas mesmas condições por

mais 72 h. Ao fim da reação, foram coletadas alíquotas de 500 μ L de cada meio reacional e analisadas através de CLAE (4.8.5).

4.6 ESCALONAMENTO DA ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA

O volume do meio reacional para a acetilação do α -MetGlc foi aumentado em 250 vezes. O experimento foi realizado numa garrafa de vidro de 1 L com tampa de rosca, contendo 1,125 g (5,8 mmol) de α -MetGlc, 52,5 g de SFS3 e 1 L (10,9 mol) de acetato de vinila. O meio reacional foi incubado durante 8 dias a 40 °C e 250 rpm. Em intervalos fixos, amostras de 500 μ L do meio reacional foram retiradas e analisadas por CLAE (4.8.5) para determinação da concentração do produto majoritário da acetilação do α -MetGlc e cálculo das conversões.

4.7 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO MAJORITÁRIO DA ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA

Os meios reacionais da síntese catalisada por SFS1, SFS2 e SFS3 (4.5.3) foram filtrados com papel Whatman n. 1, lavados com MeOH (3x20 mL por grama de sólido fermentado) e concentrados mediante rotaevaporação e posteriormente analisados por CCD (4.8.4), utilizando como fase móvel os seguintes solventes: acetato de etila, MeOH e misturas deles nas proporções 7:3 e 9:1.

Uma vez selecionada a fase móvel adequada, o produto majoritário da reação foi purificado mediante cromatografia flash, com uma coluna de 20 mm de diâmetro e preenchida com sílica gel 60 mesh 220-440 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) com altura de 19 cm.

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.8.1 Determinação da umidade dos substratos sólidos

Os teores de umidade dos substratos sólidos e dos sólidos fermentados foram determinados em balança de infravermelho Gehaka modelo IV de 2000 (São Paulo, Brasil). Para este ensaio, foi adicionado 1,00 g de amostra no prato da balança, que foi programada com temperatura de 105 °C, em modo de auto-secagem até variação da umidade menor do que 0,05% (m/m).

4.8.2 Determinação da atividade de hidrólise

A determinação da atividade de hidrólise dos sólidos fermentados foi realizada com base no método titulométrico proposto por Tiss, Carriere e Verger (2001). O método consiste na titulação dos ácidos graxos liberados durante a reação de hidrólise dos triacilgliceróis catalisada pelas lipases presentes no sólido fermentado seco, com NaOH (0,05 mol L⁻¹), num titulador automático do tipo pH-STAT da Metrohm, modelo 718 Stat Titrimo (Herisau, Appenzell, Suíça).

Para todos os ensaios, foi preparada uma emulsão com goma arábica 3% (m/v), CaCl₂·2H₂O (2 mmol L⁻¹), tampão Tris-HCl (2,5 mmol L⁻¹, pH 7,0) e NaCl (150 mmol L⁻¹) (TISS, CARRIERE e VERGER, 2001). A esta emulsão foi adicionado azeite de oliva (67 mmol L⁻¹, extra-virgem, GALLO). Esta mistura foi homogeneizada durante 15 min em liquidificador e, em seguida, 20 mL desta emulsão foram adicionados no frasco de reação do titulador (previamente termostatizado a 40 °C e sob agitação magnética de 300 rpm). O pH foi ajustado automaticamente em 7,0. Imediatamente, o sólido fermentado seco (100 mg) foi adicionado ao frasco e as reações foram conduzidas por 5 min.

A atividade de hidrólise (A_H) foi calculada com a Equação 2.

$$A_H = \frac{\frac{dV}{dt} \times [\text{NaOH}] \times f \times F_{\text{pH}}}{M_{\text{SF}}} \quad (\text{Equação 2})$$

onde: dV/dt é a velocidade inicial do consumo de NaOH em mL min^{-1} ; $[\text{NaOH}]$ é a concentração de NaOH em $\mu\text{mol mL}^{-1}$; f é o fator de correção da solução de NaOH padronizada (adimensional); M_{SF} é a quantidade de sólido fermentado seco (g) e F_{pH} é o fator de correção (adimensional) relacionado à dissociação parcial do ácido oleico presente no azeite de oliva, de pKa de 6,8. O valor de F_{pH} foi calculado com a Equação 3, considerando o pH do ensaio (7,0) (SOARES *et al*, 2013).

$$F_{\text{pH}} = \frac{1 + 10^{(\text{pH}-\text{pKa})}}{10^{(\text{pH}-\text{pKa})}} \quad (\text{Equação 3})$$

Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um μmol de ácidos graxos por minuto, nas condições do ensaio. Para o sólido fermentado seco, a atividade de hidrólise foi expressa como unidades de atividade por grama de sólido seco ($\text{U g}^{-1}\text{SS}$).

4.8.3 Determinação da atividade de esterificação

As atividades de esterificação dos sólidos fermentados secos e delipidados (4.4.4.5) foram avaliadas utilizando como reação padrão a síntese do oleato de etila a partir de ácido oleico (70 mmol L^{-1} , 90% de pureza, Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) e etanol (210 mmol L^{-1} , pureza 99,5% LabMaster BIOTEC, Pinhais, Paraná, Brasil). As reações foram realizadas em frascos de vidro de 50 mL com tampas de plástico, contendo 10 mL de meio reacional, utilizando *n*-hexano como solvente. Em cada frasco, foram adicionados 500 mg de sólido fermentado seco e delipidado, que, em seguida, foram incubados em agitador orbital a 250 rpm e 40 °C por 2 h. Durante a reação, foram coletadas alíquotas de 100 μL do meio reacional, em intervalos de 15 min e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual, através do método de Lowry-Tinsley (4.8.3.1).

Para os cálculos de atividade de esterificação (A_E), foi considerada a velocidade inicial do consumo de ácidos graxos livres (AGL), que corresponde ao coeficiente angular da equação ajustada aos pontos iniciais (faixa de linearidade) de um gráfico de concentração de ácido graxo (μmol) versus tempo (min). Para o sólido fermentado, a atividade foi

expressa como unidades de atividade de esterificação por grama de sólido seco ($U\ g^{-1}SS$), calculada a partir da Equação 4.

$$A_E = -\frac{dN_{AGL}}{dt} \times \frac{1}{M_{SF}} \quad \text{Equação 4}$$

onde: dN_{AGL}/dt é a velocidade do consumo de AGL em $\mu\text{mol}\ \text{min}^{-1}$, M_{SF} é a quantidade de sólido fermentado seco (g), Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como o consumo de um μmol de ácido graxo por min nas condições do ensaio.

4.8.3.1 Determinação do teor de ácidos graxos livres por método colorimétrico

O método espectrofotométrico de Lowry e Tinsley (1976) foi utilizado para determinar a concentração de ácidos graxos residual durante a síntese de oleato de etila catalisada pelo sólido fermentado, em presença de solvente orgânico *n*-hexano. O método consiste em medir a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons cobre II e os AGL solúveis na fase orgânica.

Para cada ensaio, foram adicionados 100 μL da amostra em Eppendorfs de 2 mL, contendo 1,15 mL de tolueno e 250 μL do reativo de cor, que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II 5% (m/v), a pH 6,0-6,2, corrigido previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex durante 30 s. A fase orgânica foi separada por decantação, as amostras foram coletadas nesta fase com pipeta e suas absorbâncias foram lidas a 715 nm, em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800 (Kyoto, Japão). A concentração de ácido graxo residual presente no meio orgânico foi relacionada à absorbância através de uma curva de calibração previamente preparada nas mesmas condições do ensaio, com soluções padrão do ácido oleico (pureza 90%, Labsynth, Diadema, São Paulo-Brasil) com concentrações de 0 a 100 $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ dissolvidos em *n*-hexano.

As atividades de esterificação foram determinadas a partir da cinética da reação, considerando a velocidade inicial da reação. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de consumir um μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. Para o sólido fermentado seco, a atividade de esterificação foi expressa como unidades de atividade por grama de sólido seco ($U\ g^{-1}SS$).

4.8.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A presença de AGL no sobrenadante das lavagens do sólido fermentado no processo de delipidação foi verificada mediante CCD utilizando como fase estacionária placas de sílica gel 60 em folhas de alumínio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e éter etílico como fase móvel. Após as corridas, as cromatoplasmas foram reveladas com iodo sublimado.

A CCD foi utilizada também para analisar os componentes do meio reacional da síntese enzimática e para avaliar a fase móvel que proporcionasse a melhor separação do produto majoritário, para sua posterior purificação por cromatografia flash de coluna com sílica. Para estes ensaios, foram utilizadas placas de sílica gel testando-se as fases móveis de acetato de etila/MeOH em distintas proporções. Após as corridas, as cromatoplasmas foram reveladas com resorcinol-ácido sulfúrico [resorcinol a 4% (v/v) em etanol/H₂SO_{4conc} 20:1], com subsequente aquecimento da placa até aparecimento das manchas (STAHL, 1965).

4.8.5 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

As amostras recolhidas ao longo das reações enzimáticas foram analisadas por CLAE num cromatógrafo Agilent Technologies, Inc (Waldbronn, Alemanha) modelo 1260 equipado com detector de índice de refração (DIR) operado a 40 °C. Foi utilizada uma coluna iônica Hi-Plex Ca, com dimensões 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno (Agilent Technologies, Inc, Waldbronn, Alemanha) com temperatura constante de 65 °C. A fase móvel foi uma solução aquosa de ácido sulfúrico 5 mM, com um fluxo de 0,6 mL min⁻¹. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL e o tempo de análise de 30 min. Os dados foram analisados com o software Chem Station Open Lab LC[®].

4.8.6 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Para a determinação estrutural do produto majoritário da reação, foram feitas análises de RMN tanto unidimensional (¹H e ¹³C) quanto bidimensional HSQC (Correlação de Acoplamento Heteronuclear espaçado por uma ligação, ¹J_{CH}) e HMBC (Correlação de Acoplamento Heteronuclear espaçado por várias ligações, ²J_{CH} e ³J_{CH}). Para obtenção dos espectros, as amostras foram solubilizadas em CDCl₃ e colocadas em tubos de 5 mm de

diâmetro para análise a temperaturas entre 25 e 50 °C. Os espectros foram obtidos em espectrômetro BRUKER DRX 600 (Centro de RMN do Departamento de Bioquímica, UFPR), operando na frequência base de 400,13 MHz e 100,63 MHz para os núcleos ^1H e ^{13}C , respectivamente. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram referenciados utilizando como padrões internos trimetilsilano (TMS), com sinais em 0,00 ppm para ^1H e ^{13}C ; e CDCl_3 com sinais em 7,27 ppm e 77,23 ppm, ^1H e ^{13}C , respectivamente.

4.8.7 Tratamento estatístico dos dados

Todos os valores apresentados nos gráficos e tabelas correspondem às médias dos resultados dos experimentos feitos em triplicata e reportadas com os seus respectivos erros padrão, calculados pela Equação 5.

$$\bar{s} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} / \sqrt{n} \quad \text{Equação 5}$$

onde: \bar{s} é o erro padrão da média; x_i é o valor de cada resultado individual (x_1, x_2, x_3); \bar{x} a média aritmética dos valores x_i e n é o número de amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2 SELEÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO PARA A ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA

Com o objetivo de melhorar a atividade lipolítica do sólido fermentado produzido por *B. contaminans* LTEB11, foram avaliadas três condições (A, B e C) com diferentes meios de cultivo para o processo da FES. Para escolher o biocatalisador (SFS1, SFS2 e SFS3) com as melhores características, foram determinadas suas atividades de hidrólise, de esterificação, e as conversões na acetilação do α -MetGlc em sistema livre de solvente (4.5.3).

Na Tabela 3 são apresentados os valores de cada determinação, mostrando que o SFS3 exibiu tanto a maior atividade de hidrólise (160 U g⁻¹SS) quanto de esterificação (7,5 U g⁻¹SS), além disso, também proporcionou a maior conversão na acetilação do α -MetGlc (71%, 12,4 mg) em sistema livre de solvente, após 72 h. SFS3 foi produzido com BC e óleo de soja (20% m/m, base seca) adicionado de solução nutriente (75% m/m de umidade inicial).

TABELA 3. COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS SÓLIDOS FERMENTADOS SECOS PRODUZIDOS POR *Burkholderia contaminans* LTEB11 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

Sólido Fermentado ¹	Atividade de hidrólise ² (U g ⁻¹ SS)	Atividade de esterificação ³ (U g ⁻¹ SS)	Conversão na acetilação do α -MetGlc ⁴ ($\pm 0,1$ %)
SFS1	110 \pm 8	6,5 \pm 0,4	59,3
SFS2	128 \pm 10	4,6 \pm 1,1	66,1
SFS3	160 \pm 9	7,5 \pm 0,8	71,4

¹Condições de cultivo: SFS1: BC/FSG (1:1 m/m, base seca); umedecido com tampão fosfato. SFS2: BC/FSG (1:1 m/m, base seca); SFS3: BC e 20% (m/m) de óleo de soja. SFS2 e SFS3 umedecidos com solução nutriente. Umidade inicial de 75% (m/m), incubação por 72 h a 29 °C. ²Método titulométrico (pH-STAT) frente azeite de oliva, a 40 °C e pH 7,0. ³Condições reacionais: 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico e 210 mmol L⁻¹ de etanol em 10 mL de *n*-hexano, 500 mg de SFS e delipidado, 250 rpm por 2 h a 40 °C. ⁴Condições reacionais: 15 mg de α -MetGlc (0,08 mmol, pureza 95%), 1,6 g de SFS em 20 mL de acetato de vinila (218 mmol), 40 °C e 250 rpm por 72 h. Conversões determinadas por CLAE. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata \pm o erro padrão da média.

Observa-se também que os resultados apresentam a tendência de aumento na capacidade biocatalítica de SFS1<SFS2<SFS3, o que indica que, tanto os nutrientes minerais e oligoelementos, quanto o óleo de soja adicionado ao meio de cultivo da FES, geram um efeito positivo na produção de enzimas com atividade lipolítica a partir de *B. contaminans* LTEB11. Para SFS3, houve um aumento de 46% na atividade de hidrólise, 15% na atividade de esterificação e 20% na conversão da síntese enzimática, em comparação a SFS1.

Resultados similares em relação a este efeito positivo na FES utilizando BC como substrato sólido foram obtidos por Rodríguez et al (2006), ao avaliar a influência da adição de diferentes nutrientes no meio de cultivo da FES utilizando *Rhizopus homothallicus*. Este estudo demonstrou que os nutrientes que influenciaram positivamente na produção das lipases foram principalmente ureia, azeite de oliva e oligoelementos. Eles reportaram uma atividade lipolítica máxima de 826 U g⁻¹SS frente azeite de oliva, após 12 h de incubação, quando se adicionou ureia e óleo de oliva nas proporções 4 e 40 g L⁻¹ na solução umedecedora, respectivamente. LIU et al (2013) obtiveram o mesmo efeito positivo na atividade enzimática das lipases produzidas por *Burkholderia cenocepacia* mediante FES, quando adicionaram íons Fe⁺², Ca⁺², Mg⁺² e Cu⁺² ao meio de cultivo. Estes autores utilizaram BC e FSG como substratos sólidos, atingindo uma atividade de hidrólise máxima de 72,3 U g⁻¹SS frente ao azeite de oliva.

Vários autores reportaram o efeito positivo da adição de lipídios nos meios de cultivo da FES como indutores na produção de lipases, utilizando geralmente óleos vegetais como os de girassol, oliva, soja, palma, canola e milho, e gorduras animais (SILVA *et al*, 2005). Porém, tem sido demonstrado que esse efeito depende do tipo de lipídeo e a concentração adicionada ao meio de cultivo da FES (RODRÍGUEZ *et al*, 2006; MAHADIK *et al*, 2002).

Neste estudo, o óleo de soja foi o responsável por provocar o maior efeito positivo na produção das lipases na FES, demonstrando ser mais eficiente como indutor que a FSG, fato que pode ser justificado de acordo à porcentagem lipídica adicionada a cada meio de cultivo sólido. Quando se utilizou a FSG como indutor na produção de SFS1 e SFS2, a porcentagem de lipídeos totais foi de 13% (base seca), enquanto que ao adicionar-se óleo de soja no meio de cultivo para produzir SFS3, essa porcentagem foi de 16% (base seca), sendo, em sua maioria, ácido *cis*-linoleico e ácido oleico (DAGOSTIN *et al*, 2015).

Cabe ressaltar que os valores das atividades de hidrólise são muito maiores comparados com os de esterificação, o que é esperado, uma vez que lipases possuem

menos atividade em solventes orgânicos (PENCREACH & BARATTI, 1997). Este comportamento tem sido explicado por duas condições que podem dificultar a catálise: (1) as enzimas na presença deste tipo de solventes permanecem em uma conformação mais rígida comparado com o ambiente aquoso, (2) o substrato pode ser estabilizado termodinamicamente pelas interações hidrofóbicas com o solvente (DOUKYU & OGINO, 2010). Porém, as razões deste comportamento ainda não estão bem esclarecidas. Na atividade de hidrólise, o meio reacional utilizado se aproxima mais ao ambiente natural das lipases, sendo uma emulsão aquosa de azeite de oliva onde os triacilgliceróis atuam como substrato (4.8.2), condição que promove a lixiviação das lipases contidas no SF, fato que pode contribuir ao aumento da atividade enzimática.

A partir dos resultados anteriores, SFS3 foi escolhido para o desenvolvimento das etapas seguintes, tendo apresentado as melhores características como biocatalisador: atividade de hidrólise de 160 ± 9 U g⁻¹SS frente azeite de oliva, atividade de esterificação de $7,5 \pm 0,8$ U g⁻¹SS e conversão de 71% na reação de acetilação do α -MetGlc.

5.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO A

5.3.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada

Os extratos brutos de cada sistema reacional da acetilação do α -MetGlc utilizando SFS1, SFS2 e SFS3 (4.5.3) foram analisados por CCD junto a seus respectivos controles com o sólido fermentado autoclavado e com os padrões de α -MetGlc, α -D-glucose e per-O-acetil- α -MetGlc (α -MetGlc acetilado nos carbonos 2, 3, 4, 5 e 6). Utilizaram-se como fases móveis misturas de acetato de etila e MeOH em diferentes proporções, sendo a proporção 9:1 aquela que apresentou a melhor separação do produto majoritário da reação.

A Figura 14 corresponde à cromatoplaça dos meios reacionais, que revela a formação do produto majoritário chamado de composto A, com um valor de fator de retenção (R_f) de 0,3. Além dele, é possível observar a formação de um produto secundário com um valor de R_f de 0,7. De acordo com os valores de R_f determinados para cada sistema analisado por CCD e os tempo de retenção (t_R) nas análises por CLAE, foi confirmado que os três sólidos fermentados catalisaram a mesma reação, porque formaram os mesmos produtos. Não foi evidenciada a formação do per-O-acetil- α -MetGlc, indicando que foram obtidos

compostos com diferentes graus de acetilação, mas que não ocorreu a acetilação completa. Além disso, com os controles negativos, não houve formação de nenhum produto.

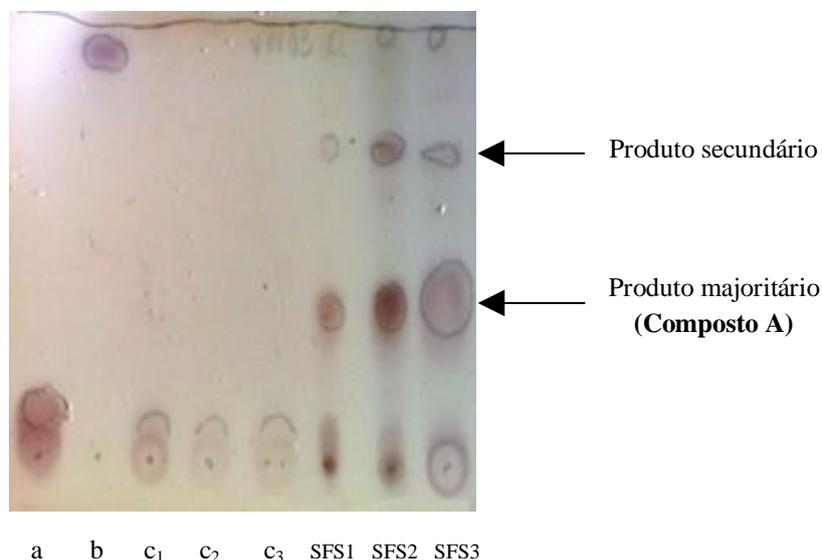


FIGURA 14. CROMATOPLACA REFERENTE AOS SISTEMAS REACIONAIS DA ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO CATALISADA PELOS DIFERENTES SÓLIDOS FERMENTADOS

Condições cromatográficas: fase estacionária sílica gel 60, fase móvel acetato de etila/MeOH 9:1, revelador resorcinol a 4% (v/v) em etanol/H₂SO₄ conc 20:1. (a) padrão de α -MetGlc, (b) padrão per-O-acetil- α -MetGlc, (c₁) controle da reação com SFS1 autoclavado, (c₂) controle da reação com SFS2 autoclavado, (c₃) controle da reação com SFS3 autoclavado.

5.3.2 Cromatografia flash em coluna com sílica

Nesta etapa, procedeu-se à purificação dos produtos de reação através de cromatografia flash em coluna com sílica, utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila/MeOH na proporção 9:1. O processo de purificação dos extratos brutos do meio reacional da síntese enzimática permitiu purificar tanto o composto A, quanto o produto secundário, que foram eluídos em várias frações durante a cromatografia, sem presença de contaminantes (Figura 15). Porém, devido às limitações de quantidade de produto secundário purificado, não foi possível realizar a sua identificação e quantificação.

As frações que continham o composto A purificado foram concentradas em rotaevaporador e preparadas para análise por CLAE e RMN.

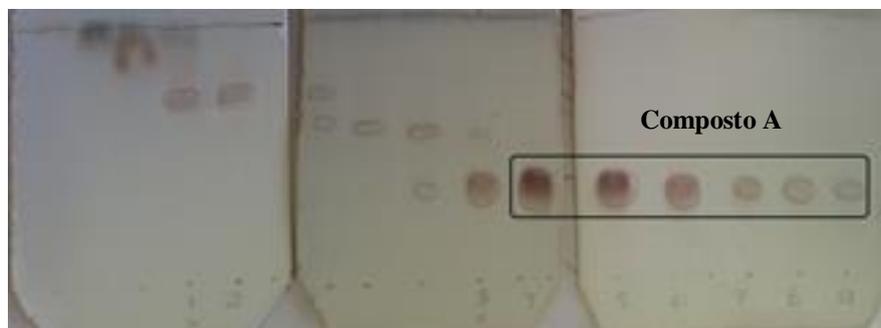


FIGURA 15. CROMATOPLACAS REFERENTES ÀS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO MEIO REACIONAL DA SÍNTESE ENZIMÁTICA POR CROMATOGRAFIA FLASH EM COLUNA DE SÍLICA

Condições cromatográficas: fase estacionária sílica gel 60, fase móvel acetato de etila/metanol 9:1, revelador resorcinol a 4% (v/v) em etanol/H₂SO_{4 conc} 20:1.

5.3.3 Análise por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

A análise por CLAE do composto A foi realizada para determinar seu tempo de residência (t_R) e seu grau de pureza, para permitir a sua utilização como padrão em cálculos de concentração posteriores. O cromatograma do composto A, após o processo de purificação por cromatografia flash em coluna com sílica, mostrou um pico majoritário com um t_R de 16,112 min e indicou uma pureza de 83%. Assim sendo, para aumentar o seu grau de pureza, foi feito um segundo processo de purificação, aplicando a técnica de cromatografia em placa preparativa, obtendo-se uma pureza de 90% (Anexo 2a). Sendo conhecidas as características do analito nas condições cromatográficas utilizadas, foi preparada uma curva de calibração para quantificar posteriormente o composto A nas amostras coletadas durante a síntese enzimática. A curva de calibração apresentou um valor de coeficiente de correlação de 0,9966 indicando uma boa correlação entre a concentração do analito e a resposta do detector (Anexo 2b).

5.3.4 Análise por Ressonância Magnética Nuclear

A estrutura química do composto A (pureza 90%) foi determinada pela análise dos espectros de RMN, uni e bidimensionais. Os espectros RMN de ^{13}C do substrato da reação α -MetGlc e do composto A são comparados na Figura 16 A e B respectivamente. Observa-se que o espectro B apresenta dois sinais que não aparecem no espectro A do material de partida, um deles em 170,9 ppm, que corresponde ao carbono da carbonila da acetila (C-9), e o outro sinal em 20 ppm, relativo ao carbono da metila do grupo acetila (C-8).

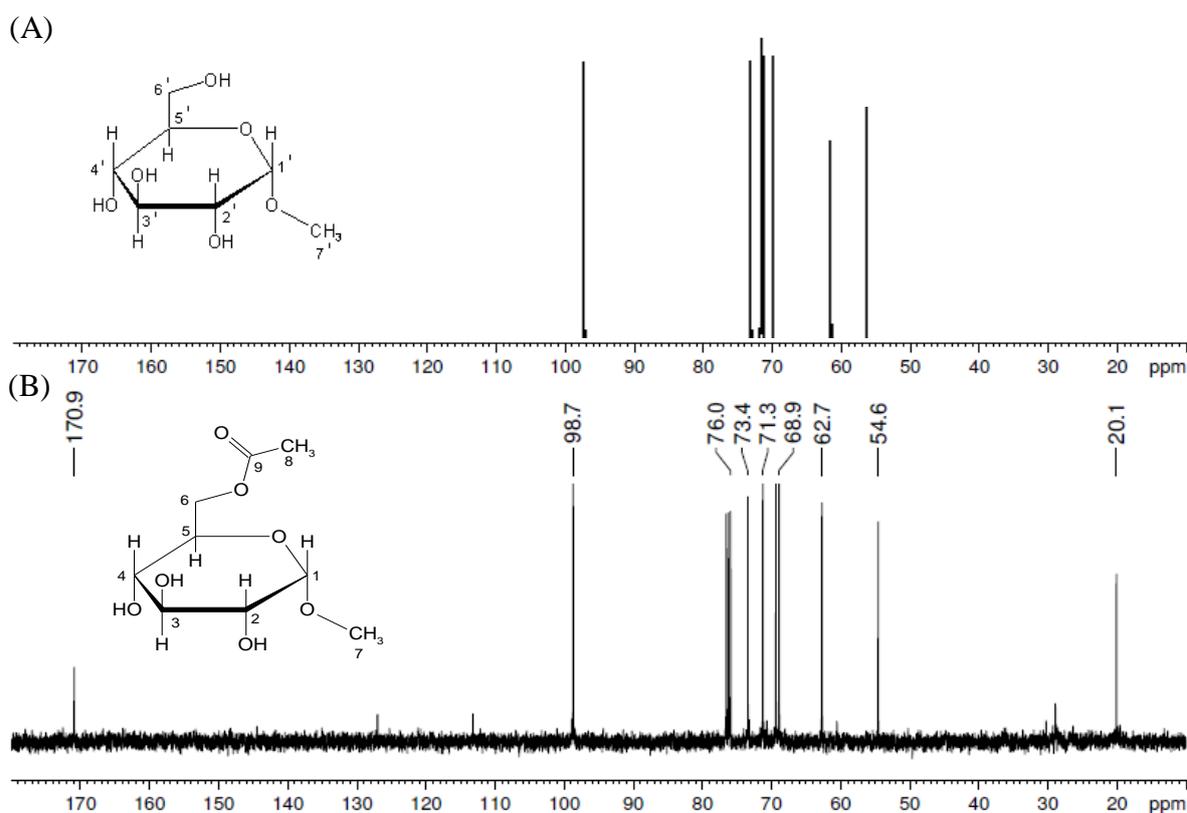


FIGURA 16. ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DO (A) METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO; (B) COMPOSTO MAJORITÁRIO A

Condições da análise: (A) solvente CDCl_3 e TMS como padrão de referência. (B) solvente D_2O e acetona como padrão de referência. Frequência 400 MHz.

A Figura 17 mostra o espectro de RMN ^1H do composto A, onde aparecem sinais característicos do anel de carboidrato na região entre 3,37-4,77 ppm. Observam-se cinco sinais referentes aos hidrogênios do anel do carboidrato ligados aos carbonos C-1 (4,77

ppm), C-2 (3,55 ppm), C-3 (3,75 ppm), C-4 (3,73 ppm) e C-5 (3,37 ppm). O sinal do hidrogênio ligado ao carbono C-1 apresentou um aumento no deslocamento químico (4,77 ppm) em relação aos demais sinais, fenômeno que pode ser atribuído à eletronegatividade dos oxigênios que estão ligados diretamente a este carbono.

O sinal com menor deslocamento deste conjunto é relativo ao hidrogênio ligado ao carbono C-5, que é o único carbono do anel do carboidrato que não tem ligação direta com oxigênio. Observa-se também dois picos largos que correspondem a dois singletos, um deles centrado em 2,11 ppm, relativo aos três hidrogênios da metila do grupo acetila (H-8) e o outro centrado em 3,43 ppm, correspondente aos três hidrogênios da metila do grupo metoxila (H-7).

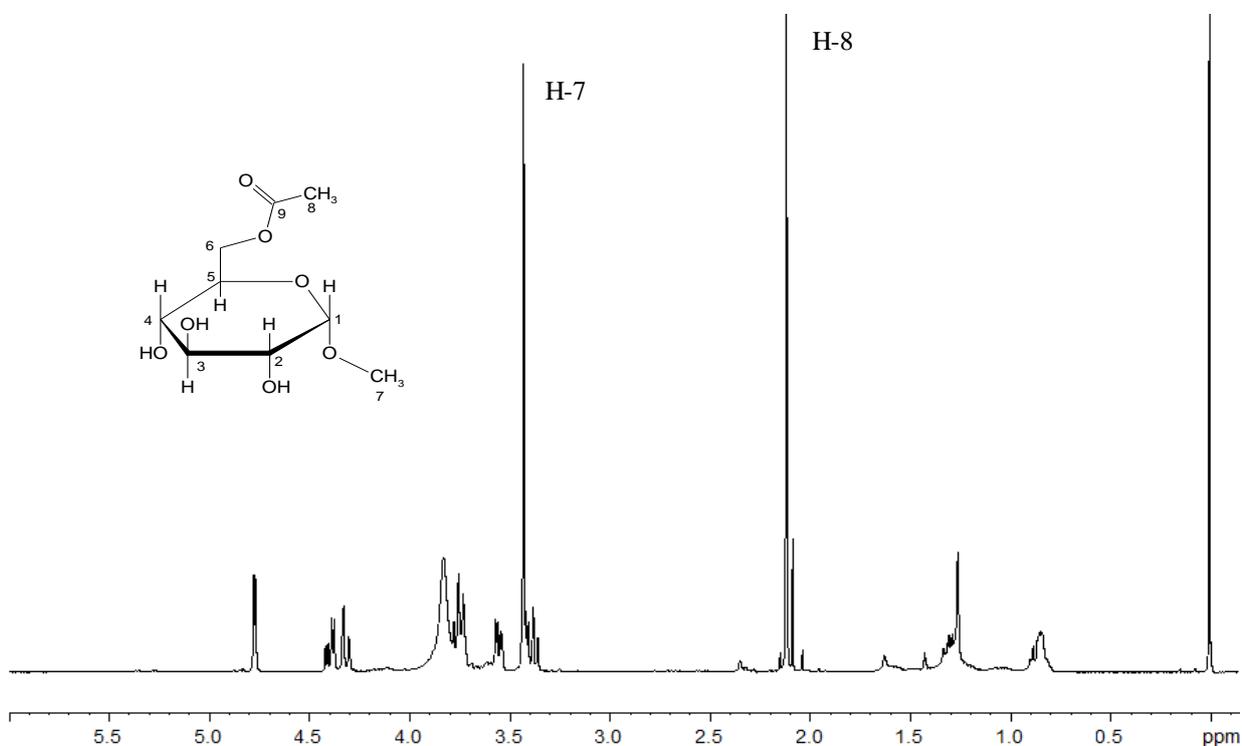


FIGURA 17. ESPECTRO DE RMN DE ¹H DO COMPOSTO MAJORITÁRIO A

Condições da análise: solvente CDCl₃, frequência 400 MHz e TMS como padrão de referência.

Para uma melhor determinação estrutural do composto A, foram também utilizadas técnicas bidimensionais de correlação de desvio heteronuclear HSQC e HMBC (Figura 18 A e B respectivamente). A Figura 18 A indica que o carbono da metila do grupo acetila (C-7) tem um valor de 20,1 ppm e o sinal da carbonila da posição C-9 está em 170,9 ppm.

Também se observa que o carbono C-6, com sinal em 62,7 ppm, é o único que apresenta correlação direta com dois hidrogênios. Além disso, na Figura 18B, H-8 apresenta uma correlação fraca com C-6 e uma forte com C-9; assim, estes sinais confirmaram a posição do grupo acetila no carbono C-6 do carboidrato.

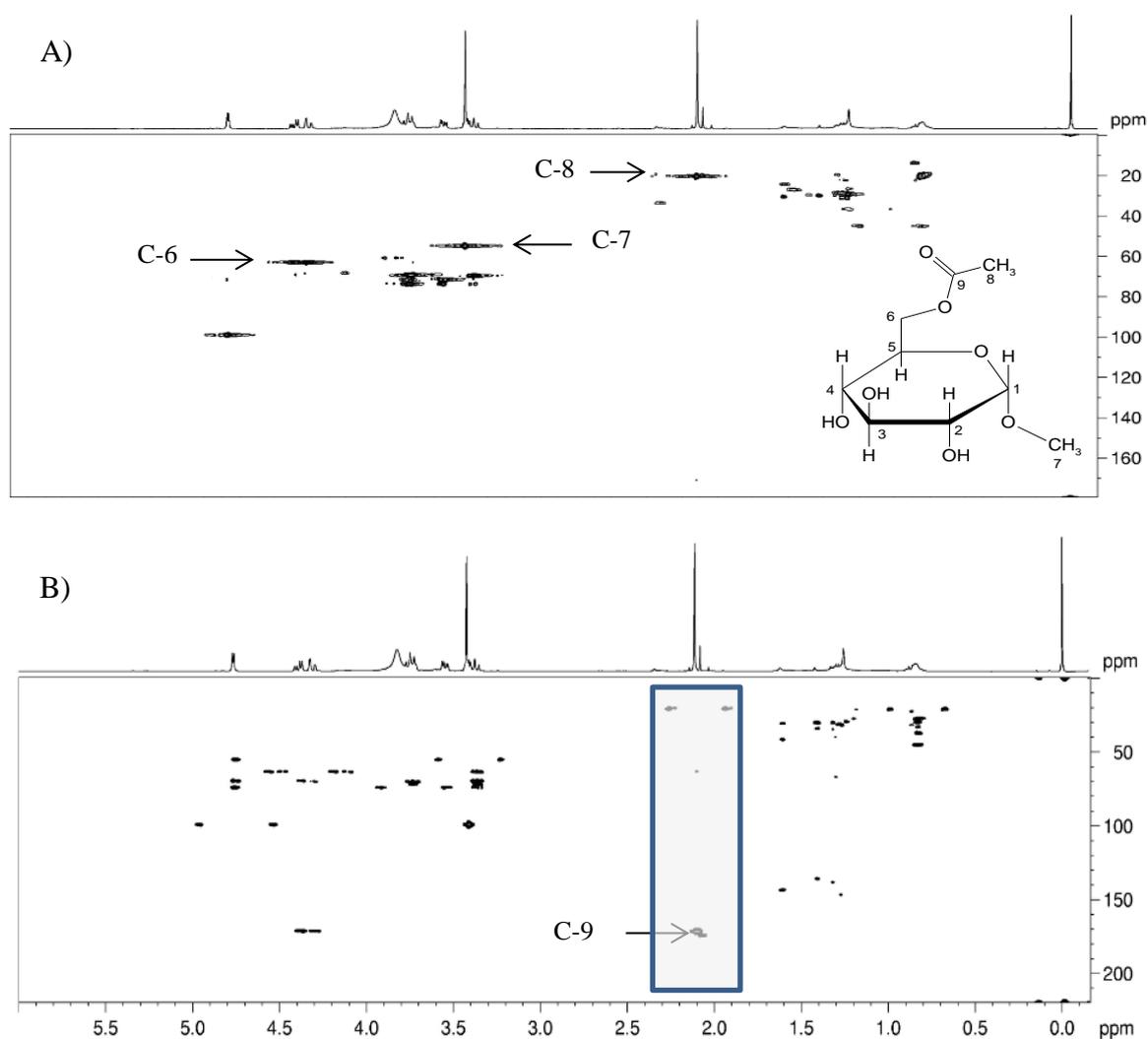


FIGURA 18. ESPECTROS DE CORRELAÇÃO DO COMPOSTO MAJORITÁRIO A) HSQC B) HMBC

Condições da análise: solvente CDCl_3 , frequência 400 MHz e TMS como padrão de referência.

Como foi mencionado anteriormente, existem muitos trabalhos que descrevem a acilação enzimática de monossacarídeos e oligossacarídeos em escala laboratorial utilizando enzimas comerciais (Tabela 1, pag 11), a maioria deles mostrando preferência

da enzima em acetilar o carboidrato no carbono da posição 6. Por exemplo, Park e Kazlauskas (2001) utilizaram a lipase Novozyme SP435 para a acetilação do β -D-glucopiranosídeo com acetato de vinila, gerando como produto majoritário 6-O-acetil- β -D-glucopiranosídeo, independentemente do solvente utilizado no sistema reacional. A mesma preferência foi mostrada na acetilação de metil- α -D-glucopiranosídeo com acetato de vinila, catalisada também por Novozyme SP435 (50 mg), utilizando como solvente THF/piridina (4:1 v/v), obtendo-se o monoéster no carbono da posição 6, com 98% de conversão em 20 h (DANIELI *et al*, 1997).

Esta regioseletividade típica mostrada pelas lipases tem sido atribuída por alguns autores principalmente à acessibilidade do grupo hidroxila primária do carboidrato (no carbono da posição 6, pois esta posição apresenta menor impedimento estérico em comparação com as outras hidroxilas, quando o substrato ataca o segundo intermediário acil-enzima formado durante a catálise (PARK & KAZLAUSKAS, 2001; DANIELI *et al*, 1997; MACMANUS & VULFSON, 1995).

Neste contexto, esta nova estratégia proposta para a síntese de metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo a partir de α -MetGlc com acetato de vinila (Figura 19) é interessante do ponto de vista científico e econômico, por ser catalisada pelo sólido fermentado de *B. contaminans* LTEB11 e utilizar um sistema livre de solvente. Estas duas condições representam vantagens para o desenvolvimento do processo de aumento de escala de produção, porque gera um custo muito menor em relação aos processos propostos utilizando enzimas comerciais em sistemas com solventes.

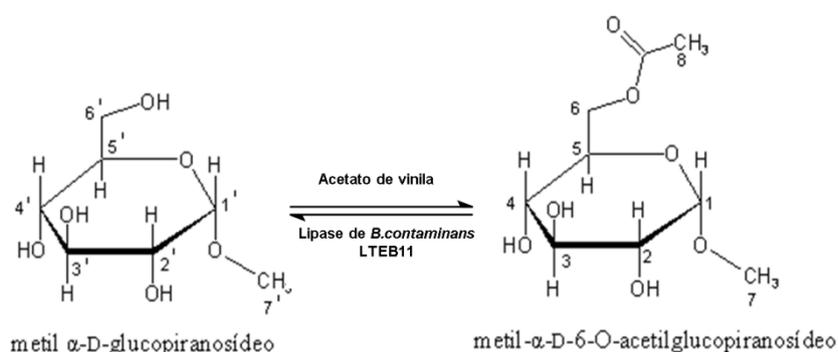


FIGURA 19. ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO LIPASES DE *Burkholderia contaminans* LTEB11

Outros fatores também influenciam na regioseletividade das reações de acilação enzimática, como o tamanho, hidrofobicidade e a configuração dos substituintes na posição anomérica e também a natureza do solvente orgânico utilizado (MACMANUS & VULFSON, 1995). No entanto, ainda não existe um modelo que descreva a regioseletividade as lipases.

5.4 OTIMIZAÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA A ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA

5.4.1 Síntese química do metil- α -D-glucopiranosídeo

O material de partida utilizado para a síntese enzimática foi o α -MetGlc, que foi sintetizado quimicamente a partir da α -D-glucose e MeOH com resina catiônica (Figura 10, pag 20), sendo purificado com contínuos processos de recristalização. Esta metodologia reporta um rendimento experimental de 20% e é comumente utilizada para a preparação de glicosídeos protegidos com um grupo metila no carbono anomérico, o qual representa o centro mais reativo do carboidrato. Esta proteção é necessária para que, posteriormente, este carbono não seja esterificado durante a síntese enzimática (DA SILVA, 2011; BOLLENBACK, 1963).

O material cristalizado foi analisado por CLAE e o cromatograma (Anexo 1a) mostrou um pico majoritário no tempo de retenção de 11,718 min e uma pureza de 95%, calculada pela ferramenta do mesmo software Chem Station Open Lab LC[®]. Conhecendo as características do analito nas condições cromatográficas utilizadas, foi preparada uma curva de calibração para quantificar posteriormente a solubilidade do α -MetGlc nos diferentes sistemas reacionais (5.4.2). A curva de calibração apresentou um valor de coeficiente de correlação de 1,00, indicando uma correlação perfeita entre a concentração do analito e a resposta do detector (Anexo 1b).

5.4.2 Determinação da solubilidade do metil- α -D-glucopiranosídeo em diferentes sistemas reacionais

A capacidade dos solventes polares próticos de solubilizar glucopiranosídeos é bem conhecida, porém, a solubilidade deles em outro tipo de solvente orgânico é restringida.

Uma metodologia ideal de acilação enzimática de carboidratos deveria utilizar um meio reacional onde tanto o substrato polar (α -MetGlc) quanto o agente acilante pouco polar (acetato de vinila) tenham o máximo de solubilidade, para facilitar a ocorrência da reação. Processos deste tipo têm sido tradicionalmente estudados em solventes orgânicos polares como DMF e piridina, que conseguem solubilizar quase por completo os carboidratos. Posteriormente, têm sido utilizados solventes como álcoois terciários e cetonas, capazes de solubilizá-los apenas parcialmente (TSAVAS *et al*, 2002).

Considerando a solubilidade do substrato como um fator importante, esta etapa do trabalho teve como objetivo selecionar o solvente que apresentasse a maior capacidade de solubilizar o α -MetGlc. Desta maneira, foi testada a solubilidade deste substrato em diferentes sistemas reacionais, sendo utilizados solventes orgânicos como acetato de vinila, DMF e acetona, e o LI [emim][MeSO₃]. Estes foram escolhidos por serem os solventes reportados por Fisher et al (2013) como os melhores para a reação de acilação da maltose com ácido linoleico empregando a lipase Novozyme 435, após estes avaliarem o efeito de diferentes meios reacionais utilizando solventes orgânicos puros, líquidos iônicos puros e misturas deles.

Na Tabela 4 são mostrados os valores de solubilidade do α -MetGlc determinados em cada sistema reacional e seus respectivos log P (previamente calculados mediante a equação 1, pag 28).

TABELA 4. SOLUBILIDADE DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO EM DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS

Sistema reacional	Solubilidade ³ ($\pm 0,06$ mmol L ⁻¹)	log P do sistema reacional
Acetato de vinila	0,15	0,73
Acetato de vinila/Acetona ¹	2,42	0,25
Acetato de vinila/DMF ¹	7,23	-0,15
Acetato de vinila/LI ²	6,65	-0,14

Condições: 30 mg de α -MetGlc (0,08 mmol, pureza 95%), 1,6 g dos diferentes sólidos fermentados em 20 mL de acetato de vinila (218 mmol), incubados a 40 °C e 250 rpm por 72 h. ¹10 mL de acetato de vinila e 10 mL de cada solvente. ²10 mL de acetato de vinila e 10 mL de uma solução de [emim][MeSO₃] 10% (v/v) em DMF. ³Concentrações determinadas por CLAE. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata.

O sistema reacional que apresentou maior capacidade para solubilizar o substrato foi aquele composto por acetato de vinila/DMF com $\log P = -0,15$, solubilizando 92% do material inicial, enquanto que para o sistema reacional acetato de vinila/LI com $\log P = -0,14$, a solubilização foi de 84%.

Distintos autores têm reportado melhores conversões quando os substratos apresentam alta solubilidade no meio reacional, o que acontece ao se utilizar solventes polares ($\log P < 2,5$), porque um sistema homogêneo aumenta as interações do substrato com o sítio ativo (FISCHER *et al*, 2013; PARK & KAZLAUSKAS, 2003; ARCOS *et al*, 1998). Esta tendência é refletida nos resultados obtidos, já que os sistemas de reação que apresentam os menores valores de $\log P$, mostraram maior capacidade para solubilizar o substrato α -MetGlc. De acordo com estes resultados, os sistemas escolhidos para as etapas posteriores do trabalho foram: (a) livre de solvente, (b) acetato de vinila/DMF e (c) acetato de vinila/LI.

5.4.3 Efeito do solvente na estabilidade da atividade do sólido fermentado

Geralmente, as reações catalisadas por lipases que empregam substratos polares, como os carboidratos, são ineficientes em solventes orgânicos. Isto se deve ao fato que os solventes orgânicos apolares não solubilizam completamente este tipo de substratos, enquanto que, em solventes orgânicos polares, as lipases podem ser inativadas. Devido à importância do sistema reacional, avaliou-se a estabilidade de SFS3 durante 24 h tanto no sistema livre de solvente quanto nos sistemas reacionais acetato de vinila/DMF e acetato de vinila/LI, selecionados por apresentarem a maior capacidade para solubilizar α -MetGlc (5.4.2).

Na Figura 20 é mostrada a atividade de hidrólise residual de SFS3 após incubação em cada sistema reacional em diferentes intervalos de tempo. Observa-se que, no solvente com maior hidrofobicidade, o acetato de vinila ($\log P = 0,73$) SFS3 manteve sua atividade de hidrólise inicial após 24 h de incubação. Quando foram utilizados solventes polares no sistema reacional, a atividade de hidrólise de SFS3 apresentou um decréscimo ao longo do período de incubação. Observou-se que, após 2 h de incubação, no sistema acetato de vinila/LI, a atividade enzimática sofre uma queda de 71%, enquanto que no mesmo intervalo de tempo no sistema com acetato de vinila/DMF, a redução da atividade de

hidrólise foi de 47%. Isto evidencia que o sistema acetato de vinila/LI desnaturou as lipases mais rapidamente que o sistema com acetato de vinila/DMF.

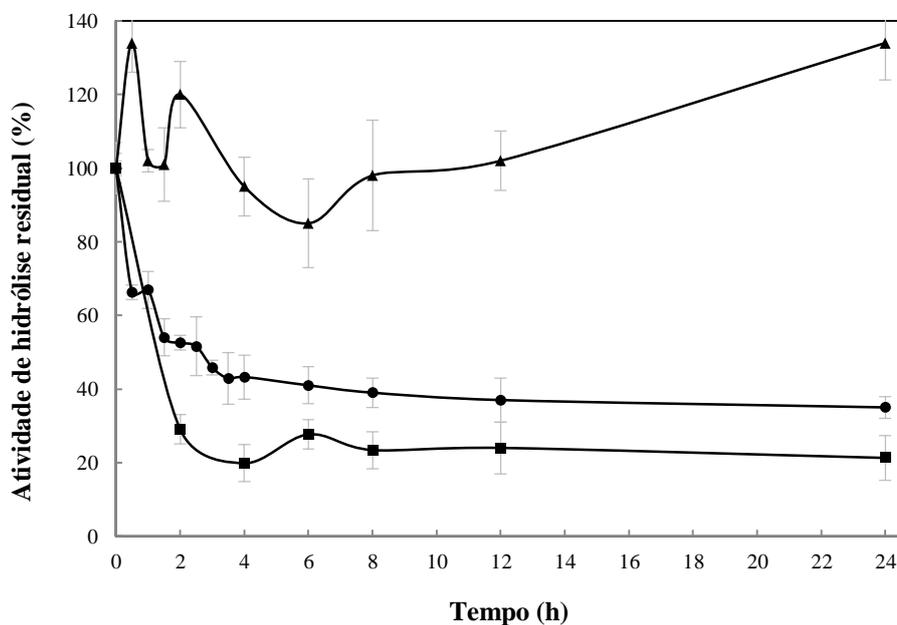


FIGURA 20. ATIVIDADE DE HIDRÓLISE RESIDUAL APÓS INCUBAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO EM DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS

(▲) Acetato de vinila; (●) sistema acetato de vinila/DMF (1:1); (■) sistema acetato de vinila/[emim][MeSO₃] 10% (v/v) em DMF (1:1). Condições do ensaio: 4,5 mg de α -MetGlc (pureza 95%), 210 mg de SFS3 em 4 mL de meio reacional, incubados a 40 °C e 250 rpm por 72 h. Dosagem de atividade hidrólise: - método titulométrico frente ao azeite de oliva, a 40 °C e pH 7,0. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata \pm o erro padrão da média.

Em geral, para sistemas biocatalíticos que empregam lipases, é recomendada a utilização de solventes apolares ($\log P > 4,0$). Solventes polares ($\log P < 2,5$) não são os mais adequados para estes sistemas, pois podem remover a microcamada aquosa que envolve a estrutura da enzima, desnaturando-a (KLIBANOV, 2001; LAANE *et al*, 1987).

A estabilidade apresentada no solvente acetato de vinila, com o maior valor de $\log P$, em relação aos sistemas reacionais testados, pode ser explicada por duas hipóteses. Primeiro, estes solventes não são capazes de retirar a água de solvatação da estrutura proteica, o que mantém a estrutura conformacional da enzima e previne a sua desnaturação. Segundo, as moléculas do solvente podem interagir com os resíduos hidrofóbicos dos aminoácidos que cobrem o sítio ativo da estrutura proteica (tampa hidrofóbica), garantindo que a enzima esteja na sua conformação aberta e exercendo então

efeitos ativadores ou estabilizadores da atividade enzimática (PENCREACH & BARATTI, 1997).

A estabilidade das lipases imobilizadas produzidas por *B. cepacia* em solventes orgânicos de polaridades diferentes têm sido descrita por vários autores (SALUM *et al*, 2010; LIU *et al*, 2010; PAN *et al*, 2010; FERNANDES *et al*, 2007; LIMA *et al*, 2004). Lima *et al* (2004) reportaram que o extrato lipolítico produzido por *B. cepacia* (erroneamente classificado como *Bacillus megaterium* CCOC-P2637) era notavelmente estável em solventes orgânicos puros tanto hidrofílicos (BuOH, acetona, EtOH, isopropanol) quanto hidrofóbicos (tolueno, *n*-heptano e *n*-hexano), após 1 h de incubação a 29 °C. Nos solventes hidrofóbicos, observou-se uma ativação da enzima, obtendo-se até um aumento na atividade enzimática de 21% com *n*-heptano (log P= 4,0). Com a utilização dos solventes hidrofílicos houve uma queda da atividade enzimática com a diminuição do log P do solvente, com a diminuição de até 79% com acetona (log P= -0,23).

Soares *et al* (2013) estudaram a estabilidade das lipases presentes no sólido fermentado de *B. cepacia* (SFS1), obtendo uma atividade residual de 72% em EtOH puro após 48 h de incubação e maior do que 100% em *n*-hexano, após 8 h de incubação. Porém, o efeito da mistura de co-solventes, incluindo solventes orgânicos convencionais e líquidos iônicos na atividade enzimática do sólido fermentado ainda não foi relatado na literatura.

A baixa estabilidade da lipase nos solventes hidrofílicos testados poderia representar um problema para o uso de SFS3 na reação acetilação do α -MetGlc estudada neste trabalho. A escolha do solvente do sistema reacional é uma variável importante para a reação enzimática, e dado que o estudo da estabilidade não é suficiente para prever qual sistema reacional seria o mais adequado, a etapa seguinte deste trabalho foi a avaliação o efeito destes três sistemas reacionais na acetilação enzimática do α -MetGlc.

5.4.4 Efeito do solvente na acetilação do metil- α -D-glucopiranosídeo

Solventes orgânicos têm sido utilizados como meios reacionais para biotransformações enzimáticas em inúmeros processos de síntese orgânica. Está demonstrado que a seletividade apresentada pelas enzimas, seja enantio, regio e quimiosseletividade, é alterada pelos diferentes solventes presentes no meio reacional, fato que geralmente é atribuído às mudanças conformacionais das estruturas proteicas causadas

pelos diferentes tipos de interações enzima-solvente (GHAFFARI-MOGHADDAM *et al*, 2015).

O propósito deste experimento foi comparar o efeito do solvente adicionado ao sistema reacional na conversão após 4 e 72 h de reação. Os sistemas reacionais utilizados foram os mesmos para os quais foi realizada a estabilidade enzimática de SFS3 (4.5.2). Além destes sistemas, também foi testado o sistema acetato de vinila/THF, que poderia ser interessante por apresentar um valor de log P (0,49) intermediário em comparação ao sistema livre de solvente e ao sistema acetato de vinila/DMF, e, também, porque facilitaria a recuperação do produto ao final da reação, considerando que o ponto de ebulição do THF (66 °C) é muito menor do que do DMF (153 °C).

Os resultados mostrados na Tabela 5 indicam que o solvente utilizado no sistema reacional afeta fortemente a conversão do α -MetGlc. Após 4 h de reação, o sistema que proporcionou maior conversão (45%) foi acetato de vinila/DMF, seguido pelo sistema com acetato de vinila/THF (12%) e no sistema livre de solvente não foi detectado nenhum produto. Além disso, no sistema acetato de vinila/LI não foi detectada a formação de quaisquer produtos, mesmo após 72 h de reação.

TABELA 5. CONVERSÕES DA ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA, CATALISADA POR SÓLIDO FERMENTADO, EM DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS

Sistema reacional	Conversões (%)		Produtividade [mg _{ester} (gSS·h) ⁻¹]
	4 h	72 h	
Acetato de vinila	N.Det	65	0,2
Acetato de vinila/DMF ¹	45	6	2,8
Acetato de vinila/LI ²	N.D	N.Det	N.D
Acetato de vinila/THF ¹	12	53	0,1

Condições da síntese enzimática: 4,5 mg de α -MetGlc (0,02 mmol, pureza 95%), 200 mg de SFS3 em 4 mL do meio reacional, incubação a 40 °C e 250 rpm por 72 h. ¹ 1,5 mL de acetato de vinila e 1,5 mL de cada solvente. ² 1,5 mL de acetato de vinila e 1,5 mL de uma solução de [emim][MeSO₃] 10% (v/v) em DMF Conversões determinadas por CLAE. ND: não determinado. N.Det: não detectável

Posteriormente, após 72 h de reação para o caso do sistema acetato de vinila/THF e do sistema livre de solvente, a conversão foi aumentada a 53 e 65%, respectivamente, enquanto que no sistema acetato de vinila/DMF houve uma diminuição da conversão de 45% (obtidos em 4 h) para 6% em 72 h. Correlacionando-se as porcentagens de conversão com os valores de log P dos sistemas reacionais, é possível observar um aumento da conversão na reação com o aumento dos valores de log P, tendência que corrobora os resultados do estudo da estabilidade de SFS3 mostrados anteriormente (5.4.3).

Possivelmente, a reação enzimática no sistema acetato de vinila/DMF atingiu a maior conversão em 4 h (45%) em relação aos outros sistemas, devido à sua maior capacidade para solubilizar o substrato, como demonstrado previamente na seção 5.4.2. Porém, neste sistema, a conversão diminuiu a 6% em 72 h, provavelmente causada por reações secundárias de esterificação ocorridas durante o período de incubação verificadas na CCD (Figura 14, pag 39).

Fischer et al (2013) utilizaram lipase Novozyme 435 (9000 TBU) para a biotransformação da maltose com ácido linoleico, comparando a conversão entre os seguintes sistemas de reação: solventes orgânicos puros, líquidos iônicos puros e em sistemas binários deles. Foram escolhidos solventes orgânicos com diferentes polaridades: tolueno, hexano, *t*-BuOH, dioxano, DMSO, acetonitrila, acetona, DMF e THF. Os autores concluíram que o melhor solvente orgânico para essa reação enzimática era a DMF, atingindo uma conversão de 39,7% em 72 h.

O estudo do efeito dos sistemas compostos por misturas de solventes orgânicos e líquidos iônicos nas conversões de reações enzimáticas empregando sólidos fermentados contendo lipases de *B. contaminans* LTEB11 não está descrito na literatura. Porém, este efeito tem sido estudado para síntese de ésteres de carboidratos utilizando várias lipases comerciais. Têm sido avaliados diferentes solventes orgânicos polares como CH₃CN, THF, CHCl₃, DMF e piridina com o objetivo de aumentar a solubilidade do substrato e tem sido demonstrado que várias lipases apresentam bons rendimentos experimentais na presença destes solventes (FISCHER *et al*, 2013; LIU *et al*, 2010; DOUKYU & OGINO, 2010; KIM *et al*, 2003; DANIELI *et al*, 1997; SOEDJAK & SPRADLIN, 1994; CHINN *et al*, 1992). Park e Kazlauskas (2001) avaliaram o efeito dos solventes THF e acetona na acetilação do β-D-glucopiranosídeo (0,5 mmol) com acetato de vinila (1 mmol), utilizando a lipase Novozyme SP435 (30 mg). A reação produziu majoritariamente o monoéster

acetilado no carbono da posição 6, e a maior conversão (54% em 36 h) foi obtida com acetona (1 mL).

A atividade enzimática em ambientes não-aquosos como solventes orgânicos (meios aquo-restritos) parece ser diretamente controlada por quatro fatores: (1) a estabilização do estado fundamental do substrato e/ou produto e da enzima (considerações termodinâmicas); (2) controle do teor de água no sítio ativo (flexibilidade/polaridade); (3) a conservação da camada de hidratação da enzima para evitar alterar o equilíbrio de forças não covalentes que mantêm a estrutura nativa/ativa da enzima; e (4) a perturbação induzida pelo solvente diretamente na enzima (DORDICK, 1992).

A atividade das enzimas em sistemas não convencionais como solventes orgânicos e LIs, não depende somente do valor de log P, mas também de outros fatores tais como os grupos funcionais, a constituição molecular e as propriedades físico-químicas também são importantes (LIU *et al*, 2010). Por exemplo, com relação aos LIs, está relatado na literatura que a atividade enzimática diminui conforme aumenta o caráter nucleofílico do ânion presente neles, porque são capazes de interagir fortemente com os resíduos de aminoácidos com carga positiva, causando mudanças conformacionais na estrutura e, conseqüentemente, inativação da enzima (KAAR *et al* (2003). O LI utilizado neste estudo, [emim][MeSO₃], tinha sido reportado por Fisher *et al* (2013) como o melhor LI para a acetilação da maltose com acetato de vinila catalisada pela lipase *Pseudomonas cepacia*, após avaliar vários tipos de LI. O [emim][MeSO₃] está classificado como um LI hidrofílico, o que provavelmente causou a desnaturação da lipase do sólido fermentado, uma vez que alguns estudos têm demonstrado que este tipo de LIs, têm maior capacidade de interagir com a camada de hidratação das enzimas (ZHAO, 2005; LAU *et al*, 2004).

Porém, até agora não existe uma metodologia universal ou alguma correlação direta para a seleção de um solvente ou sistemas de solventes para proporcionar a máxima conversão para cada tipo de reação enzimática, já que cada sistema é único e, que, portanto, comporta-se de maneira distinta. Devido ao fato que os sistemas reacionais estudados neste trabalho apresentaram diferenças significativas nas conversões após 4 e 72 h de reação enzimática, foi necessário avaliar a cinética das reações em cada sistema reacional para determinar o tempo de reação necessário para atingir-se a máxima conversão.

5.4.5 Cinética da acetilação do metil- α -D-glucopiranosídeo com acetato de vinila em diferentes sistemas reacionais

Os resultados obtidos tanto no estudo da estabilidade de SFS3 (5.4.3) quanto na avaliação do efeito do solvente na acetilação enzimática do α -MetGlc (Tabela 5) mostraram que a catálise enzimática foi possível nos sistemas livre de solvente (somente com acetato de vinila) e acetato de vinila/DMF, sendo estes selecionados para esta etapa do trabalho.

Para comparação, nos estudos cinéticos utilizou-se também a lipase comercial Novozyme 435 (CALB), que produziu a maior conversão (99%) em 48 h de reação. A produtividade proporcionada por CALB superou 250 vezes a obtida com SFS3, fato que pode ser atribuído à maior atividade específica de CALB, cuja atividade de esterificação foi de $340,6 \pm 0,5 \text{ U g}^{-1}$ em comparação a apenas $7,5 \pm 0,8 \text{ U g}^{-1}$ SS para SFS3.

Observou-se que, tanto o solvente utilizado e o tempo de reação, como o tipo de enzima afetaram a conversão da acetilação do α -MetGlc (Figura 21). Para SFS3, o sistema livre de solvente apresentou um aumento de conversão com o tempo de reação, proporcionando o valor máximo de 65%, após 72 h.

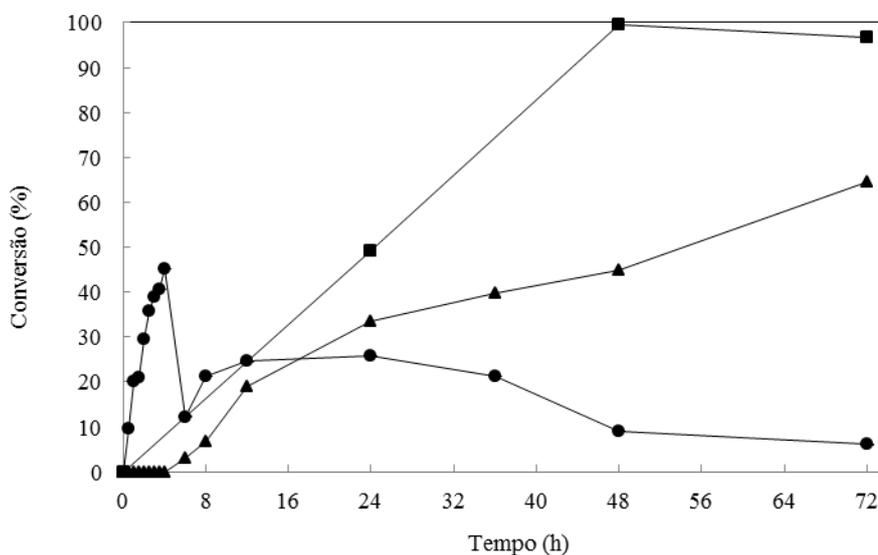


FIGURA 21. EFEITO DO SISTEMA REACIONAL NA CINÉTICA DA ACETILAÇÃO ENZIMÁTICA DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA

(\blacktriangle) SFS3, em sistema livre de solvente¹; (\bullet) SFS3, sistema acetato de vinila/DMF¹; (\blacksquare) CALB, em sistema livre de solvente². ¹Condições da reação: 4,5 mg de α -MetGlc (0,02 mmol, pureza 95%), 200 mg de SFS3 em 4 mL do meio reacional. ²Condições da reação: 4,5 mg de α -MetGlc (0,02 mmol, pureza 95%), 2,27 mg do CALB em 4 mL do acetato de vinila. Todas incubadas a 40 °C e 250 rpm por 72 h. Conversões determinadas por CLAE. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata \pm o erro padrão da média.

No sistema acetato de vinila/DMF, a conversão aumentou até 4 h de reação, atingindo um máximo de 45%, provavelmente devido à maior capacidade de solubilizar o α -MetGlc. Neste caso, a conversão em 72 h de reação diminuiu para 6%, o que foi provavelmente causado pelo consumo do produto majoritário, metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo, utilizado como substrato para formar outros produtos acetilados (ZHENG *et al*, 2012; PLOU *et al*, 2002). Isto pode ser corroborado pela existência de um segundo produto de reação (R_f 0,7), conforme verificado na seção 5.3.1 pela análise por CCD do meio reacional (Figura 14, pag 39).

Os resultados indicaram que o sistema livre de solvente, com acetato de vinila puro, foi o mais eficiente para a reação enzimática. A possibilidade de desnaturação das enzimas pela ação deste solvente é menor do que no sistema acetato de vinila/DMF, por apresentar maior hidrofobicidade (maior valor de log P), conforme mostrado anteriormente nos experimentos de estabilidade do sólido fermentado neste sistema, onde não houve perda significativa da atividade de hidrólise após 24 h de incubação (Figura 20).

Resultados similares foram obtidos no estudo do efeito da adição de DMSO na cinética da reação da acetilação da sacarose com laurato de vinila, utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Neste trabalho, foi adicionado DMSO em 2-metil-2-butanol numa porcentagem de 5 e 20% (v/v). No meio reacional com menor proporção de DMSO, formou-se maior quantidade de produto dilaurato (não identificado pelos autores), enquanto que, na porcentagem de 20%, o produto majoritário foi o monolaurato no carbono da posição 6. Além da mudança na regiosseletividade da reação, no meio reacional com 5% de DMSO, observou-se uma queda na conversão do monoéster a partir de 5 h, decrescendo de 60% a 6% em 24 h. Isto mostra que tanto a escolha do solvente quanto a concentração dele no meio reacional deste tipo de reações permitem controlar a seletividade das enzimas (PLOU *et al*, 2002).

Analisando os resultados obtidos nesta etapa do trabalho, o sistema livre de solvente, com acetato de vinila puro foi escolhido como aquele que fornece o melhor rendimento na reação, facilita a purificação do produto de interesse, tem menor custo de produção e representa uma metodologia mais branda, ao apresentar menor toxicidade em relação à utilização de o sistema acetato de vinila/DMF.

A Tabela 6 mostra uma seleção de estudos similares ao presente trabalho, com relação ao substrato e ao agente acilante empregado. Todos eles foram realizados em pequena escala onde o maior volume de meio reacional utilizado é 5 mL, utilizando solventes

orgânicos no meio reacional e empregaram lipases comerciais. A aplicação de sólidos fermentados contendo lipases naturalmente imobilizadas para acilação de carboidratos ainda não está relatada na literatura.

Por exemplo, a acetilação de α -MetGlc (100 mg) com acetato de vinila (1 mL) catalisada por Novozyme 435 (50 mg) produziu como produto majoritário metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo, utilizando como solvente uma mistura de THF/piridina (5 mL, 4:1 v/v), obtendo-se 98% (98 mg) de conversão após 20 h e produtividade de $97,6 \text{ mg}_{\text{ester}} (\text{g}_{\text{lipase}} \cdot \text{h})^{-1}$ (DANIELI *et al*, 1997).

Park e Kazlauskas (2001) utilizaram a lipase Novozyme SP435 (30 mg) para catalisar a acetilação do β -D-glucopiranosídeo (90 mg) com acetato de vinila (1 mmol) em presença de acetona (1 mL). Foi obtido como produto majoritário um monoéster acetilado no carbono da posição 6, atingindo-se uma conversão de 54% (60 mg) após 36 h de reação, correspondendo a uma produtividade de $59,9 \text{ mg}_{\text{ester}} (\text{g}_{\text{biocatalisador}} \cdot \text{h})^{-1}$.

Os trabalhos citados acima utilizam solventes orgânicos no sistema reacional. Ressalta-se que, ao utilizar piridina, um solvente polar não-prótico, a solubilização do substrato é maior e, conseqüentemente, a produtividade da reação é maior; já com a utilização de um solvente menos polar, como a acetona, a produtividade da acetilação é menor. Esta tendência foi observada no presente trabalho, pois houve uma baixa produtividade obtida no sistema livre de solvente $0,2 \text{ mg}_{\text{ester}} (\text{g}_{\text{SS}} \cdot \text{h})^{-1}$, em relação à obtida no sistema acetato de vinila/DMF de $2,8 \text{ mg}_{\text{ester}} (\text{g}_{\text{SS}} \cdot \text{h})^{-1}$.

Com relação à acetilação de carboidratos em sistema livres de solvente, em 1995 MacManus & Vulfson avaliaram a reação de metil-6-O-tritil- α -D-glucopiranosídeo (100 mg) com acetato de vinila (3 mL), catalisada pela lipase *Pseudomonas cepacia* (250 mg). Estes autores reportaram a formação de um monoéster acetilado no carbono da posição 2, atingindo uma conversão máxima de 75% (75 mg) após 24 h e uma produtividade de $12,5 \text{ mg}_{\text{ester}} (\text{g}_{\text{catalisador}} \cdot \text{h})^{-1}$. Este resultado mostra que a produtividade obtida nos sistemas livres de solventes para este tipo de reações enzimáticas é muito baixa em comparação aqueles sistemas que utilizam solventes orgânicos no meio reacional, porém os valores das conversões não seguem essa tendência.

TABELA 6. COMPARAÇÃO DOS ESTUDOS DE ACILAÇÃO DE CARBOIDRATOS CATALISADAS COM LIPASES

Lipase	Substratos		Condições	Posição do grupo acila	Conversão (%)	Produtividade [mg _{éster} (g _{enzima} ·h) ⁻¹]	Referências
	Carboidrato	Agente acilante	Solvente				
<i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11 (SFS3)	Metil- α -D-glucopiranosídeo (4,5 mg)	Acetato de vinila (4 mL)	Livre	6	71 (72 h)	0,2	Este trabalho
Novozyme 435	Metil- α -D-glucopiranosídeo (4,5 mg)	Acetato de vinila (4 mL)	Livre	6	99 (48 h)	50,2	Este trabalho
<i>Pseudomonas cepacia</i> (Amano)	Metil-6-O-tritil- α -D-glucopiranosídeo (100 mg)	Acetato de vinila (3 mL)	Livre	2	75 (24 h)	12,5	MacManus & Vulfson (1995)
Novozyme 435	Metil- α -D-glucopiranosídeo (100 mg)	Acetato de vinila (5 mL)	THF/piridina (4:1 v/v)	6	98 (20 h)	97,6	Danieli <i>et al</i> (1997)
Novozyme SP 435	β -D-glucopiranosídeo (90 mg)	Acetato de vinila (92 μ L)	Acetona	6	54 (36 h)	59,9	Park & Kazlauskas (2001)

5.5 ESCALONAMENTO DA ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA

Considerando os resultados de estabilidade de SFS3 e do efeito do solvente na conversão da reação enzimática, o sistema livre de solvente foi selecionado para realizar o aumento de escala da produção do metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo, em termos de gramas. Este composto é interessante por ser uma molécula protegida, sendo classificado como um produto de química fina. Tem potencial aplicação como bloco estrutural para síntese de moléculas biologicamente ativas, sendo utilizado pelas grandes indústrias farmacêuticas como a BAYER, ARKEMA, LONZA e SOLVAY, entre outras, nos processos de pesquisa direcionados à formulação de novos fármacos. Por esta razão, por exemplo, metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo atualmente é sintetizado por empresas farmacêuticas especializadas na síntese de intermediários orgânicos avançados e blocos estruturais. A empresa produz metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo, entre outros derivados de carboidratos, de acordo com as especificações requeridas pelo cliente, como quantidade e análises para determinação da pureza. Dessa maneira, o preço deste composto específico varia de acordo aos requerimentos citados, mas pode ser estimado em US\$ 430 g⁻¹ (Chemwill, Asia, co., Ltd, Xuzhou, Jiangsu, China. <http://www.chemwill.com>).

Embora a acetilação do α -MetGlc tenha sido mais produtiva com CALB do que com SFS3 (Tabela 6, pag 54), não foi interessante utilizar esta enzima comercial nos experimentos de aumento de escala da síntese enzimática, devido ao fato que sua aplicação industrial está restringida pelo seu alto custo, estimado em US\$ 1000 kg⁻¹ (Fjerbaek *et al*, 2009), o qual supera em 435 vezes o custo da matéria-prima para a produção do sólido fermentado SFS3, calculado em aproximadamente US\$2,3 kg⁻¹, de acordo aos preços dos reagentes fornecidos pelo site Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil. (<http://www.labsynth.com.br>), e do bagaço de cana fornecido pelo site da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, FAO (<http://www.fao.org/docrep/003/s8850e/s8850e03.htm>).

Assim sendo, foram realizados experimentos, iniciando com a escala analítica em vials contendo 4 mL de meio reacional (volume e condições utilizadas até aqui), seguindo-se dois aumentos de escala, correspondentes a 20 e 1000 mL (Tabela 7). A massa de SFS3 adicionada aumentou proporcionalmente ao volume total do meio reacional, sendo 47% (m/m) em relação à massa do substrato α -MetGlc em todos os experimentos. Observou-se

que as conversões nos diferentes volumes tiveram uma variação na faixa de 5%, obtendo-se a conversão máxima de 76% no experimento realizado com 1000 mL de meio reacional após 72 h de incubação.

TABELA 7. ESCALONAMENTO DA REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA CATALISADA COM SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO LIPASES DE *Burkholderia contaminans* LTEB11 EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

Volume do meio reacional (mL)	Massa de α -MetGlc ($\pm 0,01$ mg)	Massa de SFS3 ($\pm 0,01$ g)	Massa de metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo ($\pm 0,01$ mg)	Conversão (%)
4	4,50	0,48	3,2	65 \pm 0,3
20	30,00	1,60	12,4	71 \pm 0,5
1000	1125,20	52,52	1047	76 \pm 0,1

Condições de reação: Sistema livre de solvente, incubado a 40 °C e 250 rpm por 72 h. Conversões determinadas por CLAE. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata \pm o erro padrão da média.

Com a finalidade de confirmar o tempo de reação ótimo da acetilação do α -MetGlc, avaliou-se sua cinética de produção durante 12 dias (Figura 22). Os resultados confirmaram que o melhor tempo de reação é o de 72 h, obtendo-se o mesmo valor da Tabela 7 (76%), Observou-se também uma queda de 10% após 12 dias de reação, mostrando que o tempo para o máximo de conversão não foi afetado pelo aumento de escala. Neste processo, que foi aumentado em 250 vezes em relação as sínteses enzimáticas feitas para otimizar o meio reacional, foi possível sintetizar 1,047 g de produto com uma pureza de 90% (4.8.5), que corresponde a máxima massa produzida de metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo reportada na literatura.

Estes resultados indicam que o processo de síntese proposto neste trabalho apresenta um grande potencial para aplicação em escalas maiores de produção, pois, mantendo-se as condições reacionais, o tempo e os valores de máxima conversão são mantidos (ao nível de variação de 5%).

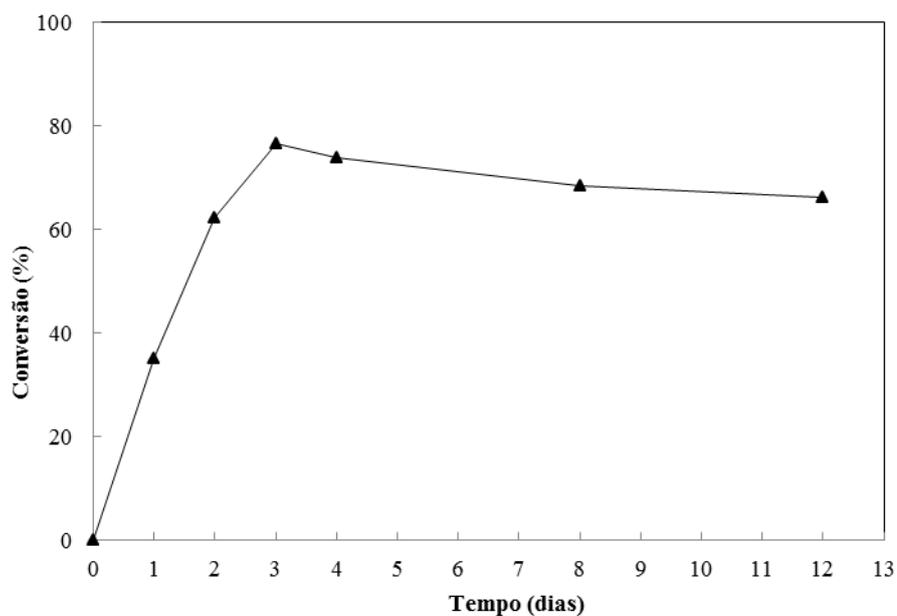


FIGURA 22. CINÉTICA DA REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM ACETATO DE VINILA CATALISADA COM SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO LIPASES DE *Burkholderia contaminans* LTEB11 EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

(▲) SFS3, 1,125 g de α -MetGlc (5,8 mmol, pureza 95%), 52,5 g de SFS3 em 1 L de acetato de vinila. Incubação a 40 °C, 250 rpm por 12 dias. Conversões determinadas por CLAE. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata \pm o erro padrão da média.

Neste contexto, o escalamento da produção enzimática do metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo utilizando sólido fermentado contendo lipases de *B. contaminans* LTEB11 é um processo inovador que utiliza condições brandas e é economicamente viável, em relação as outras metodologias até agora utilizadas para a produção e ésteres de D-glucose, que empregam solventes de ponto de ebulição elevado e com características tóxicas, tais como piridina e DMF (PAN *et al*, 2010).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

1. Foi possível aumentar a atividade lipolítica do sólido fermentado produzido nas condições padrão (SFS1) mediante variações do seu meio de cultivo. Para o novo sólido fermentado, foi utilizada uma solução de minerais e oligoelementos como umedecedora, e adição de óleo de soja (20% m/m), apresentando uma atividade máxima de hidrólise de 160 U g⁻¹SS e de esterificação de 7,5 g⁻¹SS. Estes valores superam as atividades de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado produzido nas condições padrão em 46% e 15%, respectivamente. Além disso, este sólido fermentado também apresentou a maior conversão na síntese de ésteres de α -D-glucose preliminar, produzindo uma conversão de 71% em 72 h, no sistema livre de solvente.
2. O sistema reacional que mostrou o menor efeito negativo na estabilidade de hidrólise das lipases presentes no sólido fermentando foi o sistema livre de solvente. Os sistemas reacionais acetato de vinila/DMF e acetato de vinila/LI apresentaram efeitos negativos na estabilidade das lipases, diminuindo em 47 e 71% sua atividade de hidrólise inicial.
3. Foi comprovada a regioselectividade da síntese de ésteres de α -D-glucose catalisada pelo sólido fermentado de *B. contaminans* LTEB11, identificando-se como produto majoritário o metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo, confirmando a preferência das lipases por catalisar a acetilação dos carboidratos no carbono da posição 6.
4. Em pequena escala (4 mL), as melhores condições da reação de síntese de ésteres de α -D-glucose catalisada pelo sólido fermentado de *Burkholderia contaminans* LTEB 11 foram: sistema reacional sistema livre de solvente, 72 h de reação, 40 °C e 250 rpm. Nestas condições, foi obtido 65% de conversão.

5. Com relação aumento de escala de produção enzimática de ésteres de α -D-glucose catalisada pelo sólido fermentado de *B. contaminans* LTEB11, utilizou-se 1 L de meio reacional, atingindo-se uma conversão máxima de 76% após 72 h, possibilitando a produção de 1,047 g de metil- α -D-6-O-acetilglucopiranosídeo.

6. A utilização de sólidos fermentados para a síntese de ésteres de carboidratos mostrada neste trabalho pode auxiliar na viabilização econômica do processo industrial. As vantagens relacionadas com este processo são baseadas em alguns pontos chave: primeiramente, o biocatalisador foi produzido por fermentação no estado sólido, a partir de bagaço de cana, o que representa uma técnica simples e barata. Em segundo lugar, a produção do sólido fermentado aproveita um resíduo agroindustrial, o que é desejável ambientalmente. Em terceiro lugar, o custo dos substratos da reação de síntese e sua disponibilidade, aliados à utilização de um sistema livre de solventes podem tornar o processo economicamente viável.

7. PERSPECTIVAS

O presente trabalho é pioneiro e inovador na aplicação do sólido fermentado de *Burkholderia contaminans* LTEB11 em reações regioseletivas para a síntese de derivados de carboidratos, e, portanto, abre novas ideias para futuros estudos, como por exemplo:

1. Identificar e caracterizar o produto secundário da conversão de metil- α -D-glucopiranosídeo.
2. Otimizar a síntese enzimática de ésteres de metil- α -D-glucopiranosídeo em relação aos seguintes parâmetros: razão molar (substrato/agente acilante), quantidade e reutilização do biocatalisador. Também é interessante avaliar outros tipos de solventes orgânicos e líquidos iônicos, uma vez que foi demonstrado que estes podem afetar a regioseletividade da reação, a solubilidade do substrato e a conversão de metil- α -D-glucopiranosídeo.
3. Otimizar o processo em biorreator de leito empacotado.
4. Determinar a atividade de água (a_w) nos diferentes sistemas reacionais e avaliar a influência desse parâmetro tanto na regioseletividade, quanto na conversão de metil- α -D-glucopiranosídeo.
5. Avaliar o grau de regioseletividade durante o curso da reação da síntese enzimática de ésteres de metil- α -D-glucopiranosídeo e identificar os produtos secundários formados, por técnicas espectroscópicas.
6. Estudar a síntese enzimática com distintos tipos de carboidratos e agentes acilantes, visando a formação de produtos de química fina, biosurfactantes ou derivados de produtos naturais com aplicação em diferentes áreas.
7. Verificar e analisar as possíveis mudanças conformacionais que sofrem as enzimas do sólido fermentado de *Burkholderia contaminans* LTEB11, para justificar a perda de atividade frente a alguns sistemas reacionais.

8. REFERÊNCIAS

ADA, G and ISAACS, D. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 9. p. 79-85. 2003.

ADIBEKIAN, A; TIMMER, M.S; STALLFORTH, P; VAN RIJN, J; WERZ, D.B; SEEBERGER, P.H. Stereocontrolled synthesis of fully functionalized D-glucosamine monosaccharides via a domino nitro-Michael/Henry reaction. **Chem. Commun.** v. 30. p. 3549-3555. 2008.

ANISH, C; SCHUMANN, B; LEBEV, C; SEEBERGER, P. Chemical biology approaches to designing defined carbohydrate vaccines. **Chem. Biol.** v. 21. n. 1. p. 38-50. 2014.

ARCOS, J.A; BERNABÉ, M; OTERO, C. Quantitative enzymatic production of 6-O-acylglucose esters. **Biotechnol. Bioeng.** v. 57. n. 5. 1998.

APWEILER, R; HERMJAKOB, H; SHARON, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1473. p. 4-8. 1999.

BERMUDEZ, J; DAVIES, C; SIMONAZZI, A; REAL, J.P; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta. Trop.** 156. 1-16. 2016.

BHARDWAJ, V and GARG, N. Importance of exploration of microbial biodiversity. ISCA. **J. Biosci.** v. 1. n. 3. p. 78-83. 2012.

BOLLENBACK, G. N. **Glycosidation. In: Methods in Carbohydrate Chemistry.** New York: Academic Press. v. 2. p. 326-327. 1963.

BOTTON, V. **Síntese enzimática de monoésteres etílicos (biodiesel) catalisada por sólido fermentado contendo atividade lipolítica.** Curitiba, 2014. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

BRADY, L; BRZOZOWSKI, A.M; DEREWENDA, Z. S; DODSON, E; DODSON, G; TOLLEY, S; TURKENBURG, J.P; CHRISTIANSEN, L; HUGE-JENSEN, B; NORSKOV, L; THIM, L; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. **Nature**. v. 343. p. 767-770. 1990.

CAMPBELL, M. K. **Biochemistry**. 2nd Edition, Saunders College Publishing. 1995.

CHEN, Z-G; D-N and HAN Y-B. Lipase-catalyzed acylation of lily polysaccharide in ionic liquid-containing systems. **Process. Biochem.** v. 48. p. 620-624. 2013.

CHINN, M. J; IACAZIO, G; SPACKMAN, D. G; TURNER, N. J; ROBERTS, S. M. J. Regioselective enzymatic acetylation of methyl 4,6-O-benzylidene- α - and β -D-glucopyranoside. **Chem. Soc.** v. 1. p. 661. 1992.

CHOJNACKA, A; OBARA, R; WAWRZENCZY, C. Kinetic resolution of racemic secondary aliphatic allylic alcohols in lipase-catalyzed transesterification. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 18, p 101-107, 2007.

CIPOLLA, L; PERI, F; AIROLDI, C. Glycoconjugates in cancer therapy. Anticancer. Agents. **Med. Chem.** v. 8. p. 92-121. 2008.

DAGOSTIN, J.L.A; MAFRA, M.R; RAMOS, L.P; CORAZZA, M.L. Liquid-liquid phase equilibrium measurements and modeling for systems involving {soybean oil + ethyl esters + (ethanol + water)}. **Fuel**. v. 141. p. 164-172. 2015.

DA SILVA, C. O. Efeito Anomérico em Carboidratos: Fatos e Hipóteses. **Rev. Virtual. Quim.** v. 3. n. 4. p. 235-246. 2011.

DANIELI, B; LUISETTI, M; SAMPOGNARO, G; CARREA, G; RIVA, S. Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida Antarctica* lipase B (Novozyme 435) in organic solvents. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v. 3. p. 193-201. 1997.

DEREWENDA, Z.S. Structure and function of lipases. **Adv. Protein. Chem.** v. 45. p. 1-52. 1994.

DIAZ, J. C. M.; RODRIGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F; BARATTI, J. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme. Microb. Technol.** v. 39. n. 5. p. 1042-1050. 2006.

DORDICK, J.S. Understanding how these factors control enzyme structure and function in nonaqueous media provides a framework for proposing methods to improve enzyme function in organic media. Designing Enzymes for Use in Organic Solvents. **Biotechnol. Prog.** v. 8. p. 259-267. 1992.

DOUKYU, N and OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochem. Eng. J.** v. 48. n. 3. p. 270-282. 2010.

FERNANDES, M. L. M; SAAD, E. B; MEIRA, J. A; RAMOS, L. P; MITCHELL, D. A; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v. 44. p. 8-13. 2007.

FISCHER, F; HAPPE, M; EMERY, J; FORNAGE, A; SCHÜTZ, R. Enzymatic synthesis of 6- and 6'-*O*-linoleyl- α -D-maltose: From solvent-free to binary ionic liquid reaction media. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v. 90. p. 98-106. 2013.

FJERBAEK, L; CHRISTENSEN, K.V; NORDDAHL, B. A. Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. **Biotechnol. Bioeng.** v. 102. n. 5. 2009.

GHAFFARI-MOGHADDAM, M; ESLAHI, H; AYDIN, Y.A; SALOGLU, D. Enzymatic processes in alternative reaction media: a mini review. **J. Biol. Methods.** v. 2. n. 3. 2015. DOI: 10.14440/jbm.2015.60.

GILBERT, E.J; DROZD, J. W; JONES, C. W. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. **J. Gen. Microbiol.** v. 137. p. 2215-2221. 1991.

GONÇALVES, P. M. L; ROBERTS, S.M; WAN, P. W. H. Regioselective acylation of carbohydrate derivatives using lipases leading to a facile two-step procedure for the separation of some α - and β -glucopyranosides and galactopyranosides. **Tetrahedron.** v. 60. p. 927-932. 2004.

GUPTA, R; GUPTA, N; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 64. p. 763-781. 2004.

HANISH, F.G. O-glycosylation of mucin type. **Biol. Chem.** v. 382. p. 143-149. 2001.

HECHT, M. L; STALLFORTH, P; SILVA, D. V; ADIBEKIAN, A; SEEBERGER, P. H. Recent advances in carbohydrate-based vaccines. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 13. p. 354-359. 2009.

HORROBIN, TINA; HAO TRAN, C; CROUT, D. Esterase-catalysed regioselective 6-deacylation of hexopyranose per-acetates, acid-catalysed rearrangement to the 4-deprotected products and conversions of these into hexose 4- and 6-sulfates. **J. Chem. Soc.** v. 1. p. 1069-1081. 1998.

HOWARD, G.C and BROWN, W.E. **Modern Protein Chemistry: Practical Aspects.** CRC Press. Florida. 2002.

HUDAK, J.E and BERTOZZI, C.R. Glycotherapy: New Advances Inspire a Reemergence of Glycans in Medicine. **Chem. Biol Rev.** 2012.

JAEGER, K.E and EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 13. p. 390-397. 2002.

JAEGER, K. E and REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.** v. 16. p. 396-403. 1998.

JU, T; OTTO,V.I and CUMMINGS, R.D. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. **Angew. Chem.** Int. Ed. Engl. v. 50. p. 1770-1791. 2011.

KAAR, J.L; JESIONOWSKI , A.M; BERBERICH, J. A; MOULTON, R; RUSSELL, A. J. Impact of Ionic Liquid Physical Properties on Lipase Activity and Stability. **J. Am. Chem. Soc.** v. 125. n. 14. p. 4125-4131. 2003.

KADEMI, A; LEE, B; HOUDE, A. Production of heterologous microbial lipases by yeast. **Ind. J. Biotechnol.** v. 2. p. 346-355. 2003.

KALLENIUS, G; PAWLOWSKI, A; HAMASUR, B; SVENSON, S.B. Mycobacterial glycoconjugates as vaccine candidates against tuberculosis. **Trends Microbiol.** v. 16. n. 10. p. 456-462. 2008.

KIM, M.J; CHOI, M.Y; LEE, J.K; AHN, Y. Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v. 26. p. 115-118. 2003.

KLIBANOV, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature.** v. 409. p. 241-246. 2001.

LAANE, C; BOEREN, S; VOS, K; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.** v. 30(1). p. 81-87. 1987.

LAU, R.M; SORGEDRAGER, M.J; CARREA, G; VAN RANTWIJK, F; SECUNDO, F; SHELDON, R.A. Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity. **Green. Chem.** v. 6.p. 483-487. 2004.

LIMA, V; KRIEGER, N; MITCHELL, D.A; BARATTIC, J.C; FILIPPISD, I; FONTANA, J.D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v. 31. p. 53-61. 2004.

LIU, Y; LI, C; MENG, X; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalysed by fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel. Process Technol.** v. 106. p. 303-309. 2013.

LIU, X; SIEGRIST, S; AMACKER, M; ZURBRIGGEN, R; PLUSCHKE, G; SEEBERGER, P.H. Enhancement of the immunogenicity of synthetic carbohydrates by conjugation to virosomes: a leishmaniasis vaccine candidate. **ACS Chem. Biol.** v. 1. p. 161-164. 2006.

LIU, Y; TAN, H; ZHANG, X; YAN, Y; HAMMED, B.H. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. **Process. Biochem.** v. 45. p. 1175-1180. 2010

LOTTI, M; MONTICELLI, S; MONTESINOS, L. J; BROCCA, S; VALERO, F; LAFUENTE, J. Physiological control on the expression and secretion of *Candida Rugosa* lipase. **Chem. Phys. Lipids.** v. 93. p. 143-148. 1998.

LOWRY, R. R and TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 53. p. 470-472. 1976.

MACMANUS, D.A and VULFSON, E.N. Substituent effects on the regioselectivity of enzymatic acylation of 6-O-alkylglycopyranosides using *Pseudomonas cepacia* lipase. **Carbohydr. Res.** v. 279. p. 281-291. 1995.

MAHADIK, N.D; PUNTAMBEKAR, U.S; BASTAWDE, K.B; KHIRE, J.M; GOKHALE, C.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid fermentation. **Process. Biochem.** v. 38. p. 715-721. 2002.

MASTIHUBOVÁ, M and MASTIHUBA, V. Donor specificity and regioselectivity in Lipolase mediated acylations of methyl α -D-glucopyranoside by vinyl esters of phenolic acids and their analogues. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 23. p. 5389-5392. 2013.

MITCHELL, D.A; BEROVIC, M; NOPHARATANA, M; KRIEGER, N. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena.** In : MITCHELL, D.A; KRIEGER, N; BEROVIC, M. Ed. Springer. p. 13-32. Heidelberg. 2006.

MORELLI, L; POLETTI, L; LAY, L. Carbohydrates and Immunology: Synthetic Oligosaccharide Antigens for Vaccine Formulation. **Eur. J. Org. Chem.** v. 201. p. 5723-5777. 2011.

MUTSCHLER, J; RAUSIS, T; BOURGEOIS, J-M; BASTIAN, C; ZUFFEREY; MOHRENZ, I. V. Ionic liquid-coated immobilized lipase for the synthesis of methylglucose fatty acid esters. **Green Chem.** v. 11. p. 1793-1800. 2009.

NOBLE, M. E. M; CLEASBY, A; JOHNSON, L.N; EGMONDB, M.R; FRENKENB, L.G.J. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas ghnæ* reveals a partially redundant catalytic aspartate. **FEBS.** v. 331. p. 123-128. 1993.

OLLIS, D.L; CHEAH, E; CYGLER, M; DIJKSTRA, B; FROLOW, F; FRANKEN, S.M; HAREL, S.M; REMINGTON, S.J; VERSCHUEREN, K.H.G; GOLDMAN, A. The α , β -hydrolase fold. **Protein. Eng.** v. 5. p. 197-21. 1992.

OUERFELLI, O; WARREN, J.D; WILSON, R.M; DANISHEFSKY, S.J. Synthetic carbohydrate-based antitumor vaccines: challenges and opportunities. **Expert. Rev. Vaccines.** v. 4. p. 677-685. 2005.

PAN, S; LIU, X; XIE, Y; YUYIN, Y; LI,C; YAN,Y; LIU, Y. Esterification activity and conformation studies of *Burkholderia cepacia* lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media. **Bioresour. Technol.** v. 101. p. 9822-9824. 2010.

- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **J. Biochem. Eng.** v. 13. p. 81-84. 2003.
- PARK, S and KAZLAUSKAS, R.J. Improved Preparation and Use of Room-Temperature Ionic Liquids in Lipase-Catalyzed Enantio- and Regioselective Acylations. **J. Org. Chem.** v. 66. p. 8395-8401. 2001.
- PENCREACH, G and BARATTI, J. C. Activity of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 47. p. 630-635. 1997.
- PLOU, F.J; CRUCES, M.A; FERRER, M; FUENTES, G. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: Choosing the appropriate enzyme, support and solvent. **J. Biotechnol.** v. 96. p. 55-66. 2002.
- POOLMAN, J and BORROW, R. **Expert. Rev. Vaccines.** v. 10. n. 3. p. 307-322. 2011.
- POZSGAY, V. Recent developments in synthetic oligosaccharide-based bacterial vaccines. **Curr. Top. Med. Chem.** v. 8. p. 126-140. 2008.
- RADEMACHER, T.W; PAREKH, R.B; DWEK, R.A. Glycobiology. **Annu. Rev. Biochem.** v. 57. p. 785. 1988.
- RANI, R and GHOSH, S. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresour. Technol.** v. 102. p. 10641-10649. 2011.
- RASERA, K; OSÓRIO, N.M; MITCHELL, D.A; KRIEGER, N; FERREIRA-DIAS, S. Interesterification of fat blends using a fermented solid with lipolytic activity. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v. 76. p. 75-81. 2012.
- RATHER, M.Y and MISHRA, S. β -Glycosidases: An alternative enzyme based method for synthesis of alkyl-glycosides. **Sustain. Chem. Proc.** v.1. p. 1-5. 2013.

RODRIGUEZ, J. A; MATEOS, J. C; NUNGARAY, J; GONZÁLEZ, V; BHAGNAGAR, T; ROUSSOS, S; CORDOVA, J; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process. Biochem.** v. 41. p. 2264-2269. 2006.

SABAINI, M. B; ZINNI, M. A; MOHORCIC, M; FRIEDRICH, J; IRIBARREN, A. M; IGLESIAS, L. E. Enzymatic regioselective and complete deacetylation of two arabinonucleosides. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v. 62. p. 225-229. 2010.

SALUM, T. F. C; VILLENEUVE, P; BAREA, B; YAMAMOTO, C. I; COCCO, L. C; MITCHELL, D. A; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process. Biochem.** v. 45. p. 1348-1354. 2010.

SEEBERGER, P.H and WERZ, D.B. Synthesis and medical applications of oligosaccharides. **Nature.** v. 446. p. 1046-1051. 2007.

SCHOFIELD, L; HEWITT, M.C; EVANS, K; SIOMOS, M. A; SEEBERGER, P. H. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. **Nature.** v. 418. p. 785-789. 2002.

SCHRAG, J; LI, Y; CYGLER, M; LANG, D; BURGDORF, T; HECHT, H. J.; SCHMID, R; SCHOMBURG, D; RYDEL, T. J; OLIVER, J. D; STRICKLAND, L. C; DUNAWAY, C. M; LARSON, S. B; DAY, J; McPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure.** v. 5. p. 187-202. 1997.

SILVA, W. O. B; MITIDIERI, S; SCHARANK, A; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process. Biochem.** v. 40. p. 321-326. 2005.

SOARES, D; FERREIRA, A. P; GONÇALVES, A. G; MITCHELL, D. A; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochem. Eng. J.** v. 81. p. 15-23. 2013.

SOEDJAK, H. S and SPRADLIN, J. E. Enzymatic transesterification of sugars in anhydrous pyridine. **Biocatalysis.** v. 11. p. 241-248. 1994.

SOMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 22. p. 53-78. 2006.

SONG, C; SUN, S; HUO, C; LI, Q; ZHENG, X; TAI, G; ZHOU, Y; YE, X. Synthesis and immunological evaluation of N-acyl modified Tn analogues as anticancer vaccine candidates. **Bioorg. Med. Chem.** Article in press. 2016. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.015>.

STAHL, E. **THIN LAYER CHROMATOGRAPHY.** New York: Academic Press. 1965.

SUN, S. Y and XU, Y. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. **Bioresour. Technol.** v. 100. p. 1336-1342. 2009.

TISS, A; CARRIERE, F; VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. **Anal. Biochem.** v. 294. p. 36-43. 2001.

TUDO BOM, MARITZA ARAUJO. **Utilização do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM na resolução de álcoois secundários: identificação de enantiopreferência anti-Kazlaukas.** Curitiba, 2014. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

TREICHEL, H; DE OLIVEIRA, D; MAZUTTI, M.A; DI LUCCIO M; OLIVEIRA, J.V.
A review on microbial lipases in biotechnology. **Food Bioproc. Technol.** v. 3. p. 182-196. 2010.

TSAVAS, P; POLYDOROU, S; FAFLIA, I; VOUSAS, E; TASSIOS, D; FLORES, M.V; NARAGHI, K; HALLING, P. J; CHAMOULEAU, F; GHOUL, M; ENGASSER, J; FERRER, M; PLOU, F.J. Solubility of Glucose in Mixtures Containing 2-Methyl-2-butanol, Dimethyl Sulfoxide, Acids, Esters and Water. **J. Chem. Eng. Data.** v. 47. p. 807-810. 2002.

VANLAERE, E; BALDWIN, A; GEVERS, D; HENRY, D; DE BRANDT, E; LIPUMA, J. J; MAHENTHIRALINGAM, E; SPEERT, D. P; DOWSON, C; VANDAMME, P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex comprises at least two novel species: *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia contaminans* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** Reading. v. 59, p. 102-111. 2009.

VEREZ-BENCOMO, V; FERNANDEZ-SANTANA, V; HARDY, E; TOLEDO, M. E; RODRIGUEZ, M. C, HEYNNINGNEZZ, L; RODRIGUEZ, A; BALY, A; HERRERA L; IZQUIERDO, M *et al.* A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. **Science.** v. 305. n. 5683. p. 522-525. 2004.

WANG, L.-X. Toward oligosaccharide-and glycopeptide-based HIV vaccines. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.** v. 9. p. 194-206. 2006.

WENNEKES, T; VAN DEN BERG, R.J.B.H.N; BOOT, R.R; VANDER MAREL, G.A; OVERKLEEF, H.S and AERTS, J.M.F.G. Glycosphingolipids-Nature Function, and Pharmacological Modulation. **Angew. Chem.** Int. Ed. 48. p. 8848-8869. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of DT-based Combined Vaccines. (Geneva: World Health Organization). 2012.

WORLD HEALTH STATISTICS, 2015. Part II. Global Health Indicators.
http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/EN_WHS2015_Part2.pdf

ZAGO, E; BOTTON, V; ALBERTON, D; CÓRDOVA, J; ITSUO, C; CÔCCO, L; MITCHELL, D. A; KRIEGER, N. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. **Energ. Fuel.** v. 28. p. 5197-5203. 2014.

ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** n. 37. p. 16-25. 2005.

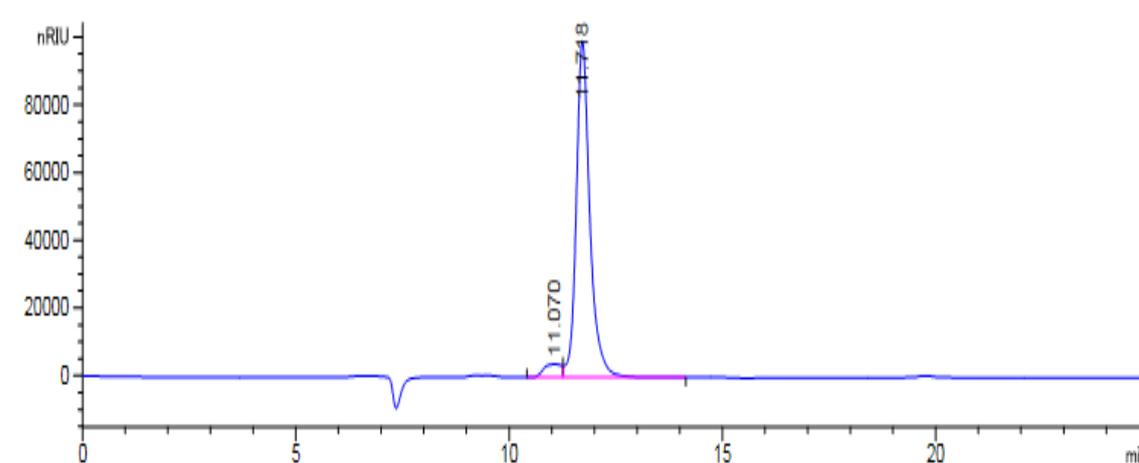
ZHENG, Q. Research on Production Method of Sugar Alcohol Based on Enzyme Method Synthesis. **Int. Proceed. Comput. Science & Inf. Tech.** v. 25. p. 162. 2012.

ZHANG, D-N; GUO, X-Y; YANG, Q-H; CHEN, Z-G; TAO, L-J. A efficient modification of cordycepin in ionic liquids under ultrasonic irradiation. **Ultrasonics Sonochem.** Article in press. 2014. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.02.023>

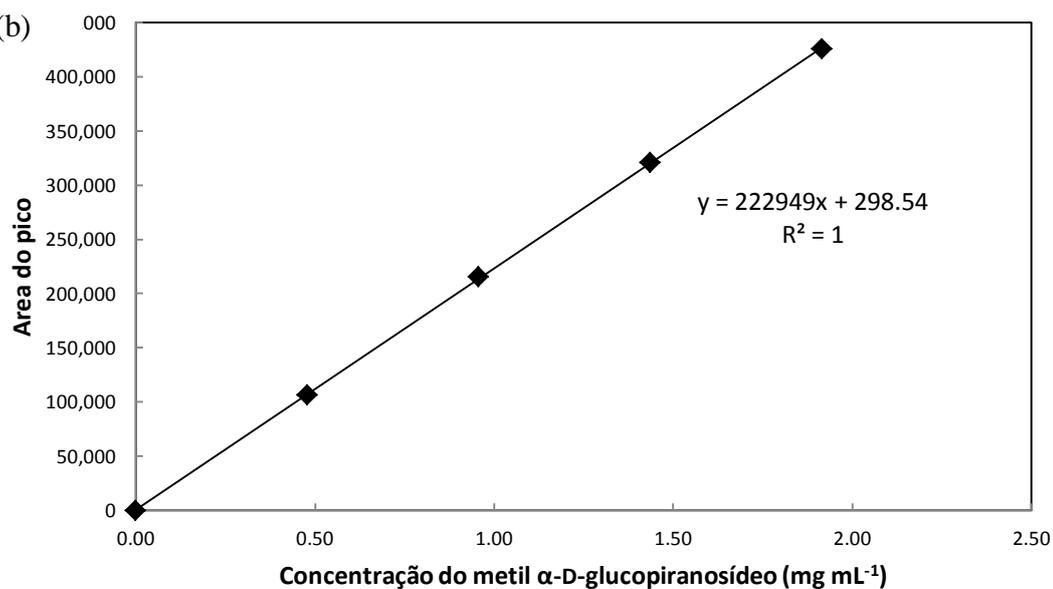
9. ANEXOS

ANEXO 1

(a)



(b)

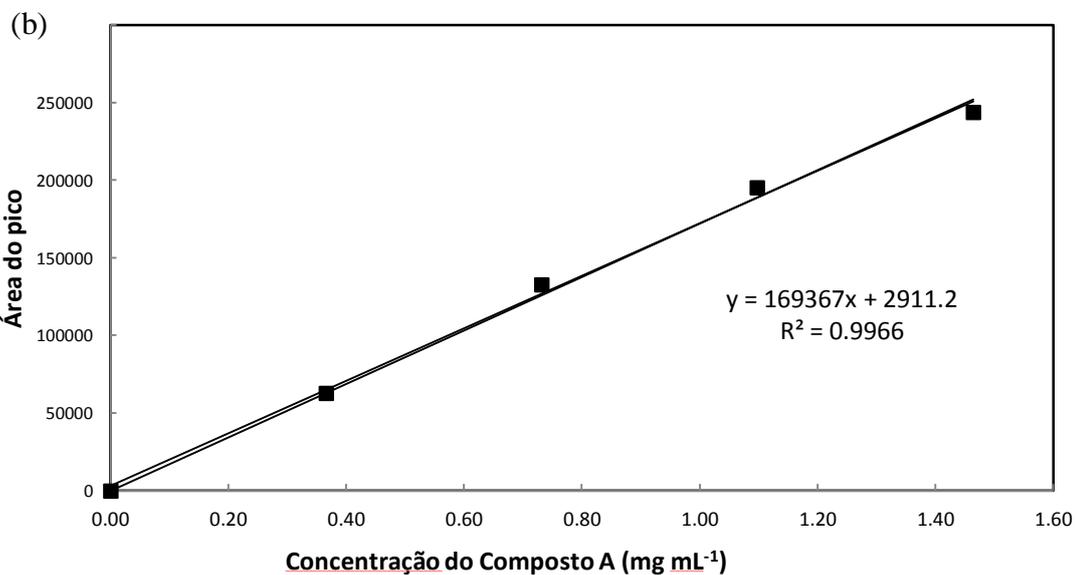
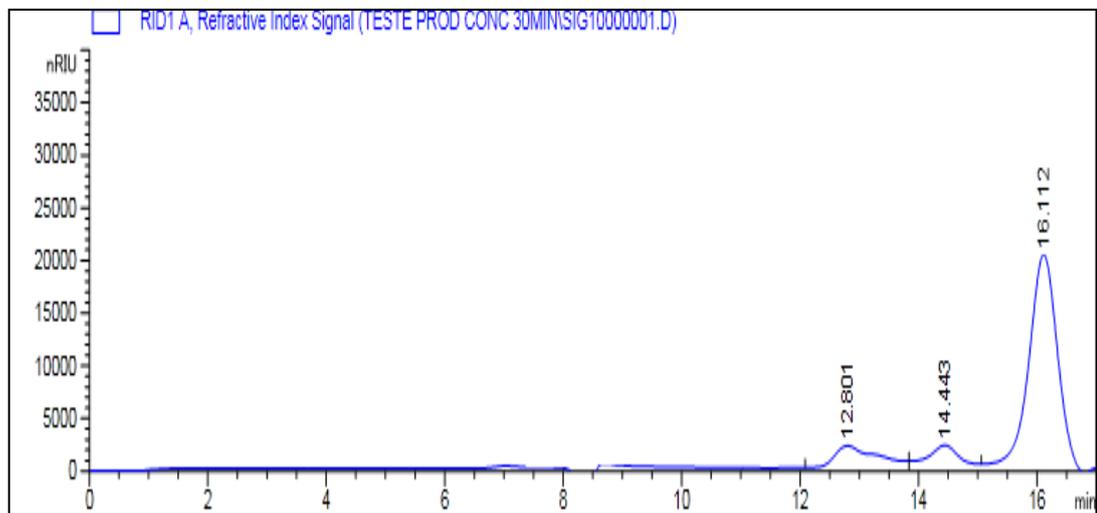


CROMATOGRAMA E CURVA DE CALIBRAÇÃO DO METIL- α -D-GLUCOPIRANOSÍDEO.

Condições CLAE: fase móvel H_2SO_4 5 mmol L^{-1} em água ultrapura, vazão 0,6 mL min^{-1} , volume de injeção 20 μL , coluna iônica Hi-plex Ca (Agilent) operada a 65 $^\circ\text{C}$. Tempo da análise 25 min com detetor DIR a 40 $^\circ\text{C}$. Dados analisados com o software Chem Station Open Lab LC[®].

ANEXO 2

(a)



CROMATOGRAMA E CURVA DE CALIBRAÇÃO DO COMPOSTO MAJORITÁRIO

A.

Condições CLAE: fase móvel H₂SO₄ 5 mmol L⁻¹ em água ultrapura, vazão 0,5 mL min⁻¹, volume de injeção 20 µL, coluna iônica Hi-plex Ca (Agilent) operada a 65 °C. Tempo da análise 25 min com detetor DIR a 40 °C. Dados analisados com o software Chem Station Open Lab LC[®].