



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DE VIABILIDADE DE CATÁLISE ENZIMÁTICA POR LIPASES
PARA A HIDRÓLISE E SÍNTESE DE INTERMEDIÁRIO DA INDÚSTRIA DE
ANTIBIÓTICOS**

ANA PAULA LIMA DA COSTA

São Carlos - SP

2024

ANA PAULA LIMA DA COSTA

**ESTUDO DE VIABILIDADE DE CATÁLISE ENZIMÁTICA POR LIPASES
PARA A HIDRÓLISE E SÍNTESE DE INTERMEDIÁRIO DA INDÚSTRIA DE
ANTIBIÓTICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

São Carlos - SP

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ana Paula Lima da Costa, realizada em 27/05/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli (UFSCar)

Prof. Dr. José Renato Guimarães (UNIFEI)

Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Dedico este trabalho à minha amada mãe, por ser meu exemplo de Ser Humano, por não medir esforços desde a minha infância para o acesso aos estudos, pesquisa e formação profissional, que me permitiu cursar a graduação em engenharia química assim como a pós-graduação na mesma área, sendo esta última além dos limites da nossa terra natal.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código 001.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Vida, Sua eterna misericórdia e Amor, e por ser minha mais segura fortaleza de fé, força, confiança e amadurecimento.

À minha amorosa mãe, Maria do Carmo Marques Lima, pelo devotado investimento de tempo, recursos e carinho para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Ao meu pai, Antônio Rodrigues da Costa (*in memoriam*), pelo ensino de disciplina, bom proceder, dignidade, respeito e busca pelo aperfeiçoamento acadêmico, moldes para o caráter. À nossa matriarca avó, Maria Tereza Marques Lima pelo carinho e valiosos conselhos sobre a Vida. À minha forte irmã Vanessa Marques da Costa, pelo intento amoroso e sincero em todos seus atos que ofereceram auxílio material e emocional. À minha querida Tia, Maria de Belém Lima Weller, pela amizade, ensino e gentil suporte para o progresso dos meus estudos. À minha gentil prima Marcelle Cristina da Silva Lima, pela amizade, apoio e carinho que me trazem alegria desde os anos de infância. À minha melhor amiga de uma vida inteira, amada Lila (*in memoriam*). E aos demais familiares e amigos que ofereceram apoio em todos meus sonhos.

Ao Lorenzo Giovanni Tonetti, pelo sincero amor, companheirismo, produtivo e racionais diálogos que me impulsionaram a uma melhor clareza, além do constante incentivo. Aos meus queridos sogros Valter Tonetti (*in memoriam*) e Sandra Tonetti, pela sua importante amizade além do encorajamento aos meus projetos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao professor Paulo Waldir Tardioli, pela orientação, ensinamentos e gentil paciência importantes para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Enzimática/UFSCar, Nicole Novelli, Laiane Antunes, Leonardo de Souza, Renato Guimarães, Ana Bárbara Moulin e aos membros mais recentes Hatus Borges, Camila do Nascimento e Ana Beatriz Zurlo, pelas construtivas trocas de conhecimento, ótimo convívio, sincera compreensão, incentivo e boas risadas.

Aos colegas de pós-graduação, professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, pelas contribuições que tornam possível o funcionamento deste espaço.

Ao apoio técnico do DEQ UFSCar, em especial à Natalia Gonçalves dos Santos e Thais Corrêa Castral, pela sempre gentil cooperação para fornecimento de materiais e reagentes necessários para a realização dos experimentos, além da hábil orientação sobre as técnicas analíticas de cromatografia.

Finalmente, minha sincera gratidão a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a concretização deste Mestrado.

Have the courage to follow your heart and intuition. They somehow already know what you truly want to become. Everything else is secondary.

— Steve Jobs

RESUMO

Os antibióticos são considerados uma das descobertas de maior sucesso na história da medicina. Contudo, a produção destes fármacos via rota química gera efluentes nocivos. Sendo um intermediário para a síntese enzimática de importantes antibióticos β -lactâmicos, o éster metílico de D-fenilglicina (*Phenylglycine Methyl Ester* -PGME) é produzido com o uso de reagentes altamente tóxicos, com baixa enantiosseletividade do produto. Processos enzimáticos têm surgido como alternativa promissora e sustentável para a síntese de antibióticos e seus intermediários, e as lipases se destacam por catalisar uma variedade de reações. Assim, este trabalho visou o desenvolvimento de uma rota enzimática inédita para a síntese de PMGE a partir da reação de esterificação do aminoácido D-fenilglicina (*Phenylglycine*- PG) com metanol catalisada por lipases comerciais. O estudo inicial avaliou os solventes favoráveis à solubilidade da PG, todavia este mostrou-se pouco solúvel nos solventes testados, demandando-se adição de ácido clorídrico 0,5 M ou líquido iônico para se observar alguma solubilidade. Investigou-se a especificidade de uma gama de lipases frente à atividade de hidrólise do PGME, de forma a verificar que as lipases avaliadas apresentaram bom desempenho na hidrólise, com potencial para catalisar a reação inversa (esterificação), com destaque para a lipase B de *Candida antarctica* que rendeu maior taxa de reação e melhor afinidade pelo substrato com base nos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten. Um novo método de cromatografia gasosa foi implementado para separar e caracterizar o PGME, cuja estratégia é pouco explorada na literatura. Diferentes ensaios de reação de esterificação foram realizados e, somente com o auxílio da técnica de cromatografia líquida acoplada a um espectômetro de massas (LC/MS) pôde-se comprovar a síntese do éster, que apresentou baixas conversões, mesmo assim, mostrando-se inédito na literatura. Há escassas informações sobre a reação via rota enzimática para produção do PGME, assim, o estudo desenvolvido poderá contribuir para um avanço do conhecimento nesta área.

Palavras-chaves: Éster metílico de D-fenilglicina, D-fenilglicina, lipases, esterificação e hidrólise.

ABSTRACT

Antibiotics are considered one of the most successful discoveries in the history of medicine. However, the production of these drugs via chemical route generates harmful effluents. Being an intermediate for the enzymatic synthesis of important β -lactam antibiotics, D-phenylglycine methyl ester (PGME) is produced using highly toxic reagents, with low product enantioselectivity. Enzymatic processes have emerged as a promising and sustainable alternative for the synthesis of antibiotics and their intermediates, and lipases stand out for catalyzing a variety of reactions. Thus, this work aimed to develop an unprecedented enzymatic route for the synthesis of PMGE from the esterification reaction of the amino acid D-phenylglycine (Phenylglycine-PG) with methanol catalyzed by commercial lipases. The initial study evaluated solvents favorable to PG solubility, however it proved to be poorly soluble in the solvents tested, requiring the addition of 0.5 M hydrochloric acid or ionic liquid to observe any solubility. The specificity of a range of lipases in relation to the hydrolysis activity of PGME was investigated, in order to verify that the lipases evaluated showed good performance in hydrolysis, with the potential to catalyze the reverse reaction (esterification), with emphasis on lipase B from *Candida antarctica* which yielded higher reaction rate and better substrate affinity based on Michaelis-Menten kinetic parameters. A new gas chromatography method was implemented to separate and characterize PGME, whose strategy is little explored in the literature. Different esterification reaction tests were carried out and only with the aid of the liquid chromatography technique coupled to a mass spectrometer (LC/MS) it was possible to prove the synthesis of the ester, which showed low conversions, even so, showing itself to be unprecedented in the literature. There is limited information about the reaction via the enzymatic route to produce PGME, therefore, the study developed could contribute to the advancement of knowledge in this area.

Keywords: D-phenylglycine methyl ester, D-phenylglycine, lipases, esterification and hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das principais classes de antibióticos β -lactâmicos, com destaque para o núcleo β -lactâmico em verde. Fonte: (VRANCIANU <i>et al.</i> , 2020).	6
Figura 2 - Estrutura química comum a todas as penicilinas, sendo o anel β -lactâmico indicado em verde e o anel tiazolidina em vermelho, os quais formam o núcleo 6-APA. Fonte: (DEMIRCI <i>et al.</i> , 2014).	7
Figura 3 - Representação bidimensional da estrutura química da ampicilina, com destaque em vermelho para o grupo α -amino. Fonte: Autor	8
Figura 4 - Síntese industrial de ampicilina e amoxicilina via rota química, sendo: (1)- molécula de 6-APA; (2)- produto da reação usando agentes sililantes para a proteção do carboxilato ligado ao 6-APA; (3)- cloreto de amino fenilacetil; (4)- ampicilina pela rota A e amoxicilina pela rota B; (5)- Dane anidrido; (6)- sal de 6-APA trietilamina. Fonte: (ISMALAJ; DE BORGGRAEVE, 2022).	9
Figura 5 - Reações envolvidas na síntese cineticamente controlada de antibióticos β -lactâmicos. Fonte: (MATEO <i>et al.</i> , 2005).	11
Figura 6 - Síntese enzimática da ampicilina. Fonte: (DENG <i>et al.</i> , 2016).	13
Figura 7 - Estrutura química de: (a) fenilglicina, (b) PGME. Fonte: Autor	16
Figura 8 - Reação de Strecker. Fonte: (GRÖGER, 2003).	17
Figura 9 - Síntese de éster metílico de (S)-fenilglicina a partir da adição diastereosseletiva de TMSCN à imina quiral 1. Fonte: (PRASAD; BISAI; SINGH, 2004).	19
Figura 10 - Hidrólise enzimática de DL-5-fenilhidantoína e produção de D(-) fenilglicina. Fonte: (GOKHALE <i>et al.</i> , 1996).	21
Figura 11 - A hidrólise enzimática de D,L-éster metílico de fenilglicina catalisada pela lipase B de <i>Candida antarctica</i> imobilizada (Novozym 435) em um cossolvente líquido iônico (IL-Buffer). Fonte: (LOU <i>et al.</i> , 2006).	23
Figura 12 - Cátions e ânions típicos para preparação de líquidos iônicos. Fonte: (CRUZ; CIACH, 2021)	24
Figura 13 - Diferentes formas do sítio ativo da lipase: A) tipo “túnel” B) tipo “funil” C) tipo “fenda” próxima à superfície. Fonte: (PRAKASAN <i>et al.</i> , 2016).	28

Figura 14 - Mecanismo da reação de hidrólise das ligações ésteres catalisadas pela lipase, onde o aspartato e histidina são mostrados em azul e verde, respectivamente; serina, substrato e água são mostrados em preto; os resíduos da cavidade de oxianion são mostrados em preto; os resíduos da cavidade de oxianion são mostrados em magenta. (a) Ataque nucleofílico da hidroxila serina no carbono carbonílico da ligação éster; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil-enzima, álcool liberado e ataque pela água; (d) enzima livre e produto acil liberado. Fonte: (BORRELLI; TRONO, 2015). . 29

Figura 15 - Representação da reação de hidrólise catalisada pela lipase. Fonte: (JIANG; LOOS, 2016). 32

Figura 16 - Reações de esterificação catalisadas pelas lipases. Fonte: (CASAS-GODOY *et al.*, 2012). 33

Figura 17 - Mecanismo de reação de transesterificação. Fonte: (THANGARASU; ANAND, 2019). 35

Figura 18 - Reações de transesterificação catalisadas pelas lipases. Fonte: (CASAS-GODOY *et al.*, 2012). 36

Figura 19 - (a) espectros de absorção de fenilglicina (PG) e éster metílico de fenilglicina (PGME) na região UV-Vis (200-750 nm), (b) visualização ampliada dos espectros de absorção de PG e PGME na região UV (<400 nm)..... 46

Figura 20 - Perfis de conversão das hidrólises de PGME em PG catalisadas por lipases a 50°C e pH 7,0 em modo batelada. Vermelho: lipase B de *Candida antarctica* (CALB); ciano: lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL); laranja: *Eversa® Transform 2.0* (EV); magenta: lipase de *Pseudomonas Fluorescens* (PFL) e azul: lipase de pâncreas de porco. 48

Figura 21 - Regressões não lineares com ajuste da equação de Michaelis Menten para os dados experimentais de concentração de PGME ao longo da reação de hidrólise catalisada por: (a) CALB, (b) de TLL, (c) EV, (d) PFL e (e) PPL. 49

Figura 22 - Cromatograma do (a) padrão comercial de PGME (em preto) sobreposto pelos cromatogramas das amostras reacionais (demais cores); e (b) visão ampliada do item anterior, com destaque para a região prevista com o respectivo tempo de retenção do éster padrão. 53

Figura 23 - Visualização ampla para a região e tempo de retenção prevista para o éster padrão em preto, e as amostras do ensaio 2 em demais cores.	54
Figura 24 - Cromatograma do padrão comercial de PGME (vermelho) sobreposto pelos cromatogramas das amostras reacionais com líquido iônico (todos em cinza).	58
Figura 25 - Cromatograma de GC: a) Líquido iônico 2-HDEAL em 2-propanol, b) PGME nas concentrações de 0,5 e 1 g/L (preparadas em 2-propanol e 2-HDEAL), em azul e verde respectivamente, c) visualização ampliada das curvas de éster no tempo de retenção de 9,574 minutos.	60
Figura 26 - Cromatograma LC-MS de amostras dos meios reacionais, na ausência de lipase: (a) Branco (Br) de PG em apenas metanol e acetato (AC), (b) Branco de PG em apenas metanol e heptano (H).	63
Figura 27 - Cromatograma LC-MS de amostras dos meios reacionais, na presença de lipase: (a) EV em acetato de metila; b) CALB em acetato de metila; c) TLL em heptano e KOH d) TLL em acetato de metila. Todas submetidas a uma reação a 40°C, sob 250 rpm e sete dias de reação, massa de 10 mg de PG adicionada em 5 mL de solvente.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Solventes ou sistema de solventes avaliados na solubilidade de fenilglicina (PG).	39
Tabela 2 - Solubilidade média da fenilglicina em acetato de metila e metanol (razão molar 24:1) na presença de KOH, líquido iônico prótico (2-HDEAL) ou HCL.	44
Tabela 3 - Atividades hidrolíticas de lipases comerciais a 37°C e pH 7,0 usando tributirina como substrato. As atividades são expressas em unidades de tributirina (TBU) por mililitro (para lipases líquidas) ou por grama (para lipases sólidas).	47
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten da hidrólise do éster PGME catalisada pelas diferentes lipases avaliadas, e o valor do coeficiente de correlação da regressão não linear.	50
Tabela 5 - Lipases e cargas enzimáticas (em TBU) usadas na esterificação de PG (ensaio 1) com metanol (razão molar 1:24) a 30°C, 250 rpm, sete dias de reação, em heptano alcalinizado (120 µL de KOH 5 M). Sendo a massa de 10 mg de PG adicionada em 5 mL de solvente.	52
Tabela 6 - Lipases e cargas enzimáticas (em TBU) usadas na esterificação de PG (ensaio 2) com metanol (razão molar 1:24) a 40°C, 250 rpm, 7 dias de reação, em diferentes solventes. Uma massa de 10 mg de PG era adicionada em 5 mL de solvente.	54
Tabela 7 - Dados de secagem realizada a 30 °C e 24 h no ensaio 3 (etapa I), para avaliação de ocorrência de degradação dos padrões PG e PGME, ou hidrólise indesejada.....	56
Tabela 8 - Dados de secagem realizada a 70 °C e 12 h no ensaio 3 (etapa II), para avaliação de ocorrência de degradação dos padrões PG e PGME, ou hidrólise indesejada.....	57
Tabela 9 - Lipases e cargas enzimáticas (em TBU) usadas na esterificação de PG (ensaio 4) com metanol (razão molar 1:24) a 40 °C, 250 rpm, 7 dias de reação, em diferentes solventes combinado com o cossolvente 2-HDEAL. Uma massa de 10 mg de PG era adicionada em 5 mL de solvente.	58
Tabela 10 - Lipases e cargas enzimáticas (em TBU) usadas na esterificação de PG (ensaio 5) com metanol (razão molar 1:24) a 40°C, 250 rpm, 7 dias de reação, em diferentes	

solventes combinado com o cossolvente 2-HDEAL. Uma massa de 10 mg de PG era adicionada em 5 mL de solvente.	62
Tabela 11 - Concentrações de PGME determinadas pelo LC/MS para as amostras do ensaio 2.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AAs	Aminoácidos
APIs	Líquidos iônicos apróticos (<i>Aprotic Ionic Liquids</i>)
BSA	Albumina de soro bovino
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
KOH	Hidróxido de Potássio
LC/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
LIs	Líquidos iônicos
PG	D-fenilglicina (<i>D-Phenylglycine</i>)
PGME	Éster metílico de D-fenilglicina (<i>D-Phenylglycine Methyl Ester</i>)
PILs	Líquidos iônicos próticos (<i>Protic Ionic Liquids</i>)
Sb	Ensaio de solubilidade da PG
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
2-HDEAL	Lactato de 2-hidroxi dietilamônio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Antibióticos β -lactâmicos	5
3.1.1. Penicilinas.....	6
3.1.1.1. Ampicilina	7
3.2. Síntese química de antibióticos β -lactâmicos	8
3.2.1. Síntese de antibióticos β -lactâmicos via rota enzimática	10
3.2.1.1. Síntese enzimática da ampicilina.....	11
3.3. Aminoácidos.....	13
3.4. D-fenilglicina e éster metílico de fenilglicina	15
3.4.1. Síntese de fenilglicina e éster metílico de fenilglicina via rota química ..	16
3.4.2. Síntese enzimática de fenilglicina	20
3.5. Líquidos Iônicos	23
3.6. Lipases	26
3.6.1. Lipases microbianas	26
3.6.2. Estrutura e mecanismo catalítico das lipases.....	27
3.6.3. Seletividade das lipases	30
3.6.4. Reações catalisadas pelas lipases	31
3.6.4.1. Hidrólise	31
3.6.4.2. Esterificação	32
3.6.4.3. Transesterificação.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37

4.1. Materiais	37
4.2. Atividade enzimática	37
4.3. Avaliação de solubilidade da PG em meios com baixa atividade de água.....	38
4.4. Espectroscopia de varredura na faixa UV-Visível	39
4.5. Esterificação enzimática	39
4.6. Hidrólise enzimática	40
4.7. Secagem.....	40
4.8. Métodos cromatográficos	41
4.8.1. Caracterização e quantificação de PG e PGME por cromatografia líquida	41
4.8.2. Caracterização do éster PGME via cromatografia gasosa.....	41
4.8.3. Identificação de PGME por cromatografia líquida acoplada à	
espectrofotômetro de massas	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Determinação do meio reacional e solubilidade da PG.....	43
5.2. Espectroscopia.....	45
5.3. Atividade de hidrólise de tributirina.....	46
5.4. Hidrólise de PGME	47
5.5. Técnicas cromatográficas usadas na identificação de PGME sintetizado por rota	
enzimática.....	51
5.5.1. Caracterização via cromatografia líquida.....	51
5.5.2. Caracterização via cromatografia gasosa	59
5.5.3. Identificação de PGME por LC/MS	63
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES FUTURAS	67
6.1. Conclusões.....	67
6.2. Sugestões Futuras	69
7. REFERÊNCIAS	70

8. APÊNDICE	89
--------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

O sucesso do uso clínico dos antibióticos contra infecções bacterianas resultou na sua larga produção industrial via rota química (DENG *et al.*, 2016). Por outro lado, a indústria farmacêutica é considerada uma das mais poluidoras gerando uma grande quantidade de efluentes, responsáveis pela significativa poluição da vida aquática (BIELEN *et al.*, 2017).

Em termos gerais, a indústria farmacêutica compreende: (I) as unidades de fabricação de ingredientes farmacêuticos ativos (*active pharmaceutical ingredient* -API) que produzem as matérias-primas e os intermediários da síntese dos antibióticos, e (II) as unidades de fabricação de formulações farmacêuticas acabadas (*formulations or finished pharmaceutical product* - FPP) que combinam os ativos para produzir o produto final (KOTWANI; JOSHI; KALONI, 2021). Nas últimas décadas, os países em desenvolvimento (principalmente Índia e China) emergiram como principais instalações de fabricação de APIs para o setor farmacêutico, escolhidos justamente pelas suas práticas precárias de gerenciamento de efluentes e descarte inadequado (GOTHWAL; THATIKONDA, 2017).

O éster metílico de D-fenilglicina (*Phenylglycine Methyl Ester* -PGME) é um composto de interesse para a indústria farmacêutica, pois desempenha papel crucial como intermediário para a síntese enzimática do antibiótico semissintético ampicilina (MCDONALD; BOMMARIUS; ROUSSEAU, 2017; WANG *et al.*, 2015). A principal via de produção industrial do PGME ocorre por rota química clássica pela reação de *Strecker*, com processos caracterizados por desvantagens como baixa enantiosseletividade, proteção e desproteção de grupos reativos com uso de solventes organoclorados tóxicos, responsáveis por gerar resíduos não recicláveis e prejudiciais ao meio ambiente (PRASAD; BISAI; SINGH, 2004; WU *et al.*, 2014; ZHOU; WU; LI, 2017).

Até o momento, pouco se discute sobre a produção de PGME via rota enzimática, apesar da (PG) ser produzida industrialmente pela rota das hidantoinases (LEUCHTENBERGER; HUTHMACHER; DRAUZ, 2005), e o antibiótico ampicilina pode também ser produzido pela reação catalisada pela enzima Penicilina G acilase (PGA), utilizando-se o PGME como doador acila (PAN *et al.*, 2008).

Deste modo, o PGME permanece como um insumo farmacêutico, da cadeia produtiva citada, cuja rota bioquímica é industrialmente inexistente. Assim, a síntese enzimática do PGME surge como uma rota com potencial produtivo pouco explorado e escassa de informações, associada às vantagens de um processo ambientalmente amigável.

Mediante a progressiva poluição causada por efluentes gerados no processo de fabricação dos intermediários de antibióticos, com enfoque no PGME, torna-se importante a busca por novas rotas biocatalíticas para sua síntese que não gerem efluentes nocivos ao meio ambiente (BIELEN *et al.*, 2017), e neste cenário os processos de catálise enzimáticos se destacam dentre as biotecnologias atuais como alternativas promissoras e sustentáveis devido ao baixo impacto ao meio ambiente (NAGAR; GUPTA, 2021; SHELDON; WOODLEY, 2018).

Produzidas por organismos vivos, as enzimas são proteínas que atuam como catalisadores em inúmeras reações bioquímicas, e cujas principais vantagens de uso estão relacionadas à alta especificidade destes catalisadores, que atuam sob condições brandas de reação (pH, pressão e temperatura) e, além disso, são facilmente biodegradáveis com baixa toxicidade quando atingem o meio ambiente após o seu uso na produção industrial (KATSIMPOURAS; STEPHANOPOULOS, 2021). Dentre as enzimas com aplicação industrial destacam-se as lipases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolase), que pertencem à classe das hidrolases e catalisam a hidrólise de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos na interface orgânico-aquosa. Além disso, catalisam diversas reações, incluindo esterificação, transesterificação (alcoólise), acidólise e aminólise em meio não aquoso (PATEL *et al.*, 2019).

As lipases podem ser extraídas de plantas e animais, contudo, as de origem microbianas representam a classe de enzimas mais utilizadas devido à sua facilidade de manipulação genética, estabilidade em amplas faixas de temperatura e pH, especificidade do substrato e altos rendimentos (KANMANI; ARAVIND; KUMARESAN, 2015). Um dos principais entraves para a aplicação de enzimas livres (solúveis) na produção em larga escala é o alto custo desse biocatalisador, devido à falta de estabilidade operacional e à sua não reutilização. Para superar estes obstáculos, tem-se proposto a imobilização das enzimas que resulta na minimização dos custos do processo pois a forma imobilizada é mais estável na presença de solventes orgânicos e em condições de pH adversos e, além

disso, pode ser recuperada e reutilizada muitos ciclos, retendo-se a atividade por longos períodos (DICOSIMO *et al.*, 2013; THANGARAJ; SOLOMON, 2019).

Assim, diante ao presente cenário de escassa produção na literatura sobre a síntese enzimática do PGME, o presente trabalho tem como proposta a inédita síntese enzimática deste éster catalisada por lipases, e a investigação da viabilidade desta quanto aos rendimentos reacionais. A potencial rota a ser desenvolvida apresenta benefícios ambientais, uma vez que a reação-alvo (esterificação) catalisada pelas lipases por definição ocorre em condições operacionais amenas, gera apenas água como único subproduto, além de permitir uma fácil separação do produto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma rota enzimática para a síntese de PGME a partir do aminoácido não proteínogênico D-fenilglicina catalisada por lipases comerciais e investigar a viabilidade desta.

2.2. Objetivos específicos

- Definir o meio reacional para a síntese do PGME, realizando-se a escolha do solvente orgânico para compor o meio, associado à baixa atividade de água e favorável à solubilidade da D-fenilglicina;
- Avaliar a resposta de solubilidade da D-fenilglicina na presença de cossolventes, tais como, líquido iônico, ácido ou base;
- Selecionar a lipase com maior especificidade pelas reações de hidrólise e síntese do PGME;
- Caracterizar o PGME sintetizado pela rota enzimática, catalisada pelas lipases comerciais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos são agentes quimioterápicos naturais ou sintéticos produzidos para erradicar infecções bacterianas por meio de mecanismos bactericidas, ou restringir a reprodução bacteriana (ou crescimento) pelos processos bacteriostáticos (ZHOU *et al.*, 2022). Com base na fonte dos quais são isolados, os antibióticos são agrupados em: (I) compostos naturais; (II) antibióticos semissintéticos, os quais são produtos naturais estruturalmente modificados; e (III) antibióticos sintéticos. Os antibióticos são comumente classificados conforme suas estruturas moleculares, modo de ação e espectro de atividade, sendo classificados em β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, aminoglicosídeos, sulfonamidas e quinolonas (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016; PANCU *et al.*, 2021).

Dentre os agentes antibacterianos em uso clínico, os β -lactâmicos constituem uma das classes mais antigas e populares de antibióticos. Os β -lactâmicos consistem em todos os agentes antibióticos que apresentam em suas estruturas moleculares o anel β -lactâmico (Figura 1) que atua como grupo farmacofórico, abrangendo os derivados da penicilina, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapemêmicos. Os β -lactâmicos são a classe de antibióticos mais comumente prescritos, têm uma ampla gama terapêutica, raramente são tóxicos e demonstraram forte eficácia clínica usando regimes empíricos com doses fixas (HORN *et al.*, 2020). O mecanismo de ação dos β -lactâmicos está baseado no bloqueio da formação da parede celular bacteriana após a inibição das enzimas transpeptidase, as quais estão envolvidas nos estágios finais de reticulação da camada de peptidoglicano, o que conseqüentemente enfraquece a parede celular e leva a morte da célula bacteriana (BUSH; BRADFORD, 2016).

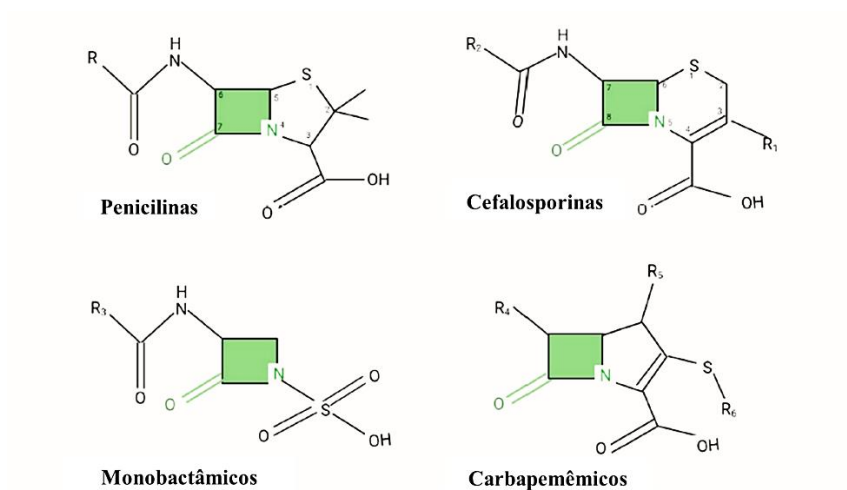


Figura 1 - Estrutura química das principais classes de antibióticos β -lactâmicos, com destaque para o núcleo β -lactâmico em verde. Fonte: (VRANCIANU *et al.*, 2020).

3.1.1. Penicilinas

As penicilinas consistem em um dos mais antigos e importantes grupo de antibióticos utilizado no tratamento de infecções. O primeiro membro desse grupo, a benzilpenicilina, foi descoberto em 1928 pelo bacteriologista escocês Alexander Fleming, o qual observou a inibição do crescimento bacteriano das colônias de *Staphylococcus aureus* em placas de ágar contaminada por um fungo do gênero *Penicillium* (*Penicillium notatum*) e, assim, postulou que o fungo foi capaz de produzir um composto que inibe a bactéria e, em 1929, conseguiu isolar a molécula ativa e a denominou de “penicilina” (UDDIN *et al.*, 2021).

Apesar da busca por agentes antibacterianos, Fleming e sua equipe não conseguiram purificar e produzir quantidades significativas do princípio ativo para testar a substância, chegando-se à conclusão de que a penicilina era instável para ser utilizada clinicamente e, dessa forma, a pesquisa foi interrompida. Em 1939, Ernst Boris Chain e Howard Florey retomaram as pesquisas de Fleming e conseguiram com sucesso o isolamento da penicilina, atingindo-se sua produção em escala industrial em 1940. Em 1941, Edward Abraham realizou a purificação cromatográfica da penicilina fazendo os primeiros experimentos focados na avaliação de seu efeito antimicrobiano. Em 1943, o pesquisador Robert Robinson elucidou a estrutura química da penicilina, a qual forneceu os meios para a síntese futura. Tais descobertas conjuntas concederam a Fleming, Chain e Florey o primeiro Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1945. Somente após a

Segunda Guerra Mundial, em 1946, a penicilina foi introduzida no mercado utilizada no tratamento de infecções bacterianas causadas principalmente por estafilococos, dando início a uma nova era para a medicina, a era dos antibióticos (LIMA et al., 2020; SAMANIDOU; EVAGGELOPOULOU; PAPADOYANNIS, 2006).

Quanto à informação química, as penicilinas consistem em uma classe dos antibióticos β -lactâmicos, cuja estrutura base consiste na fusão do anel tiazolidina e o anel β -lactâmico que dá origem ao núcleo comum entre todas as penicilinas, o ácido 6-amino penicilânico (6-APA) (Figura 2). A integridade das estruturas do anel central, particularmente o anel β -lactâmico, é essencial para a atividade antibacteriana, portanto, qualquer alterações químicas no núcleo 6-APA podem ocasionar a inativação do antibiótico, enquanto que cadeia lateral com dimensões variadas diferenciam as penicilinas umas das outras e, além disso, esta cadeia é responsável pelos espectros de atividade antibacteriana e propriedades farmacológicas específicas dos diferentes tipos de penicilina (DOI; CHAMBERS, 2015).

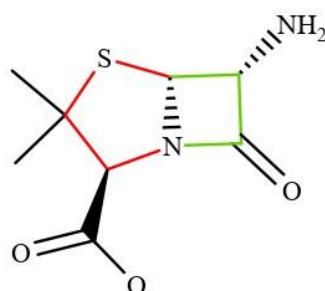


Figura 2 - Estrutura química comum a todas as penicilinas, sendo o anel β -lactâmico indicado em verde e o anel tiazolidina em vermelho, os quais formam o núcleo 6-APA. Fonte: (DEMIRCI *et al.*, 2014).

3.1.1.1. Ampicilina

Preparada pela primeira vez por Doyle et al. (1961), a ampicilina (ácido 6-[2-amino-2-fenilacetamida] penicilina) (Figura 3) foi o primeiro antibiótico β -lactâmico semissintético introduzido no mercado, sendo um derivado da penicilina G a partir da adição de um grupo amino em sua cadeia lateral, que tornou a ampicilina um fármaco com mais amplo espectro de atividade em comparação com as penicilinas iniciais. Atualmente, este fármaco é utilizado para o tratamento de diversas infecções bacterianas

incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas devido ao seu amplo espectro e baixa toxicidade e, além disso, apresenta boa resistência em condições ácidas, possibilitando administração oral eficaz. A atividade e estabilidade da ampicilina se deve sobretudo à presença do grupo amino livre na posição N-acil da cadeia lateral do núcleo da penicilina e, portanto, o grupo α -amino desempenha um papel importante na atividade, devido à capacidade de atravessar as barreiras da parede celular bacteriana (AHMADINEJAD; TALEBI TRAI, 2019; TOLOMELLI *et al.*, 2020).

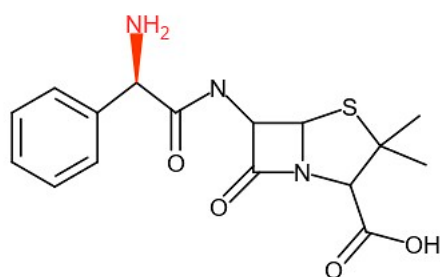


Figura 3 - Representação bidimensional da estrutura química da ampicilina, com destaque em vermelho para o grupo α -amino. Fonte: Autor

3.2. Síntese química de antibióticos β -lactâmicos

A produção de antibióticos β -lactâmicos pode ser realizada por duas rotas: química e enzimática. Atualmente, a produção industrial de ampicilina e de outros antibióticos semissintéticos (amoxicilina, dentre outros) é feita majoritariamente por rota química, devido sobretudo ao alto rendimento de 90% (DENG *et al.*, 2016). Em escala industrial, dois processos químicos têm sido frequentemente aplicados para o acoplamento de cadeias laterais ao grupo amino de 6-APA. A rota do cloreto de acila requer etapas adicionais de proteção do carboxilato ligado ao 6-APA usando agentes sililantes como N, O-bis(trimetilsilil) acetamida (BSA), seguida pela adição do cloreto de acetila correspondente ao meio reacional e, por fim ocorre a hidrólise que gera a ampicilina (Figura 4, Rota A). Uma segunda rota sintética tem sido usada para a síntese de outra penicilina, a amoxicilina, que se baseia na preparação do Dane anidrido, seguido pela adição do sal de 6-APA trietilamina. Esta reação requer baixíssima temperatura de CH_2Cl_2 ($-50\text{ }^\circ\text{C}$) e hidrólise em pH ácido (pH igual a 1) que produz amoxicilina conforme esquematizado na Figura 4 (Rota B) (ISMALAJ; DE BORGGRAEVE, 2022).

Assim, a rota química para a produção de antibióticos β -lactâmicos semissintéticos ocorre em um processo complexo que requer a proteção de grupos reativos sob temperatura muito baixa ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$), e com o uso de reagentes e solventes altamente tóxicos (ERGIN, 2021; OSPINA *et al.*, 1996). Neste sentido, apesar do elevado rendimento alcançado, esses processos químicos têm sido criticados devido ao uso de reagentes tóxicos de difícil manuseio, que geram resíduos não recicláveis e trazem prejuízo ao ser humano e ao meio ambiente, além do alto consumo energético associado (ISMALAJ; DE BORGGRAEVE, 2022). Ademais, a produção industrial de antibióticos β -lactâmicos semissintéticos pela rota química tem sido limitada a países em desenvolvimento, cuja regulamentação ambiental não é rigorosa e onde as práticas de gerenciamento de efluentes são precárias (GOTHWAL; THATIKONDA, 2017).

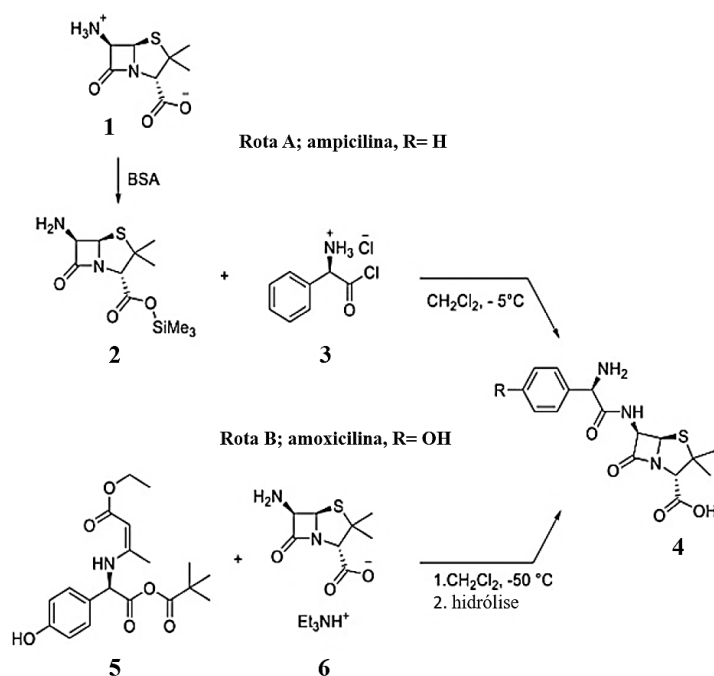


Figura 4 - Síntese industrial de ampicilina e amoxicilina via rota química, sendo: (1)- molécula de 6-APA; (2)- produto da reação usando agentes sililantes para a proteção do carboxilato ligado ao 6-APA; (3)- cloreto de amino fenilacetil; (4)- ampicilina pela rota A e amoxicilina pela rota B; (5)- Dane anidrido; (6)- sal de 6-APA trietilamina. Fonte: (ISMALAJ; DE BORGGRAEVE, 2022).

3.2.1. Síntese de antibióticos β -lactâmicos via rota enzimática

Nas últimas décadas, métodos biocatalíticos têm sido estudados para produção de antibióticos semissintéticos β -lactâmicos devido aos fatores desfavoráveis da rota química convencional anteriormente citados (VOLPATO; C. RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a). A síntese enzimática é um processo que oferece grandes vantagens em relação ao químico devido à sua alta seletividade, especificidade, além de ser uma alternativa “verde” uma vez que o processo opera em condições brandas de reação (meio aquoso, pH neutro e temperaturas moderadas), com menores etapas de processo, utilizando-se solvente ecológicos além da reciclagem e reutilização das enzimas imobilizadas (ERGIN, 2021).

Com base nos tipos de reação, o procedimento de biossíntese de antibióticos semissintéticos β -lactâmicos é dividido em síntese termodinamicamente controlada e síntese cineticamente controlada (COBOS-PUC *et al.*, 2020). A síntese controlada termodinamicamente é um método simples baseado na formação direta da ligação acilamida a partir de um doador acil não ativado (ácido carboxílico livre) e um aminoácido chave (núcleo do antibiótico), em uma reação reversível e inversa ao processo de hidrólise, cujo rendimento dos produtos da síntese direta é determinado pela constante de equilíbrio que depende da temperatura e do pH. Portanto, o rendimento da síntese controlada termodinamicamente não depende das propriedades da enzima que apenas acelera a velocidade da reação, diminuindo a energia de ativação do processo (KUROCHKINA; SKLYARENKO, 2008).

Embora esta abordagem tenha sido aplicada com sucesso na síntese de alguns antibióticos, sua eficiência é extremamente baixa, isso porque esta requer o uso de cosolventes orgânicos a fim reduzir significativamente a concentração de água (produto da hidrólise) para favorecer o equilíbrio no sentido da síntese do antibiótico, assim como a forma ativa e não ionizada do doador de acil que é necessária para deslocar o equilíbrio para a síntese, é geralmente gerada sob condições de alta concentração de cossolvente orgânico e baixo pH, tornando-se assim o meio dificilmente compatível com a atividade e estabilidade da enzima (MATEO *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2022).

O segundo caso (controle cinético) é mais complexo, porém, devido às suas condições mais brandas de reação e rendimentos mais elevados do que o observado no

processo controlado termodinamicamente, tornou-se uma estratégia mais popular. A síntese controlada cineticamente é baseada no uso de um doador de acil ativado (como éster ou amida do ácido carboxílico) para formar um intermediário acil-enzima que pode ser posteriormente desacilado pelo núcleo 6-APA (Figura 5) para produzir o antibiótico desejado. Os rendimentos máximos são fundamentalmente dependentes das propriedades cinéticas da enzima e do meio experimental, ambos mais influentes do que o efeito da termodinâmica do processo (MATEO *et al.*, 2005). Apesar das vantagens mencionadas, duas reações secundárias ocorrem paralelamente à reação principal de síntese do produto antibiótico desejado, sendo estas a hidrólise primária do doador acil ativado e hidrólise secundária do produto formado (Figura 5). Como resultado, os rendimentos máximos alcançados são transitórios e dependem do equilíbrio entre as atividades sintetase, esterase e amidase da Penicilina G acilase (PGA) (VOLPATO; C. RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

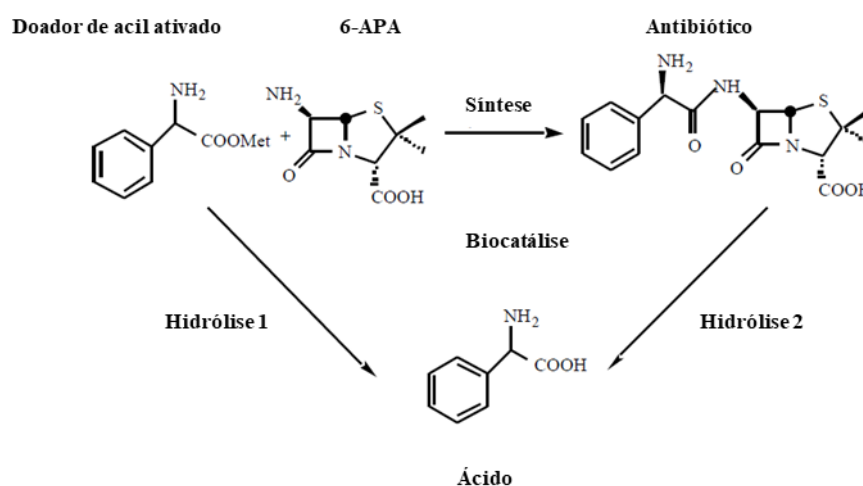


Figura 5 - Reações envolvidas na síntese cineticamente controlada de antibióticos β -lactâmicos. Fonte: (MATEO *et al.*, 2005).

3.2.1.1. Síntese enzimática da ampicilina

A produção de antibióticos β -lactâmicos semissintéticos como a amoxicilina, ampicilina e cefalexina já foi inicialmente um processo exclusivamente químico, exigindo-se a utilização de solventes organoclorados e produzindo-se grandes quantidades de resíduos contaminantes e, mediante a demanda por um processo ambientalmente correto, a síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos semissintéticos

surge como uma “rota verde”, que é principalmente catalisada pela Penicilina G acilase (PGA) (MCDONALD; BOMMARIUS; ROUSSEAU, 2017; WEGMAN *et al.*, 2001). Assim, a síntese de ampicilina via rota enzimática (Figura 6) ocorre a partir da condensação do núcleo 6-APA com PGME catalisada pela PGA de *Escherichia coli*, cuja reação foi relatada pela primeira vez em 1963 (WEGMAN *et al.*, 2001). Nas últimas décadas, a estratégia de controle cinético demonstrou ser eficiente na síntese enzimática de ampicilina, onde utiliza-se doador de acil ativo, como derivados éster ou amida de fenilglicina. No decorrer da reação biocatalítica, o reagente PGME e a enzima PGA formam primeiramente um complexo acil-enzima intermediário e, subsequentemente, a ampicilina é produzida pelo ataque nucleofílico do 6-APA ao intermediário, enquanto a fenilglicina é obtida pelo ataque realizado pela água. Ou seja, a água atua como nucleófilo concorrente ao intermediário acil-enzima, de modo que a hidrólise é um problema inevitável (PAN *et al.*, 2008). A redução da atividade de água no meio de reação é favorável para a reação de síntese, assim, para impedir a atividade da água são utilizados na literatura cossolventes orgânicos como o metanol (KIM; LEE, 1996) e etileno glicol (WEI; YANG, 2003). Dessa forma, duas outras reações indesejadas também são catalisadas pela PGA e estão envolvidas na síntese de ampicilina: hidrólise do PGME pela PGA na presença de água para formar fenilglicina (PG) e metanol; hidrólise da ampicilina, sintetizada pela reação principal, pela PGA na presença de água para produzir PG e 6-APA (FERREIRA; GIORDANO; GIORDANO, 2007). Embora a síntese enzimática da ampicilina tenha sido relatada desde 1963, o seu rendimento relativamente baixo (40-60 %), altos custos de processo (matéria-prima e catalisador) e complicado processamento *downstream*, impedem que os processos enzimáticos cheguem a escala de produção comercial (DENG *et al.*, 2016; OSPINA *et al.*, 1996).

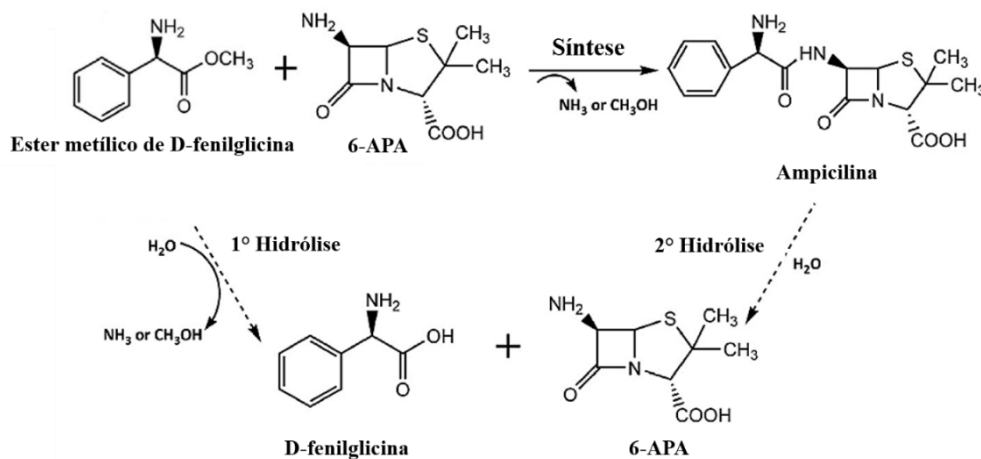


Figura 6 - Síntese enzimática da ampicilina. Fonte: (DENG *et al.*, 2016).

3.3. Aminoácidos

Aminoácidos (AAs) são substâncias orgânicas que contêm grupos amino ($-\text{NH}_2$) e ácidos em sua estrutura molecular, que dá origem ao seu nome. O grupo ácido mais conhecido consiste no ácido carboxílico ($-\text{COOH}$; presente na glicina, por exemplo), porém esse radical pode incluir outras variedades de ácidos, como o sulfônico ($-\text{SO}_3\text{H}$, presente na taurina), fosfórico ($-\text{PO}_4\text{H}_2$, presente na fosfoetanolamina) ou ácido fosfônico ($-\text{PO}_3\text{H}_2$, por exemplo o grupo 2-aminoetilfosfonato). Os AAs incorporados às proteínas durante a tradução do mRNA são chamados de proteínogênicos, dentre os quais existem 21 geneticamente codificados na natureza que ocorrem em humanos e outros animais, bem como em vírus e bactérias. Os AAs não utilizados como blocos de construção das proteínas são conhecidos como não proteínogênicos (por exemplo, taurina, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, β -alanina, citrulina, ornitina e homocisteína) e podem ocorrer em certas proteínas, desde que haja modificações pós-traducionais (WU, 2021). Os diferentes átomos de carbono presente nos AAs são nomeados em sequência de acordo com o alfabeto grego. Se o grupo amino estiver ligado ao carbono α , o AA é designado como α -AA. O átomo de hidrogênio que está ligado ao carbono α é chamado de α -hidrogênio. Da mesma forma, se o grupo amino estiver ligado ao grupo β -, γ -, δ -, ou ϵ -carbono, o AA é designado β -, γ -, δ - ou ϵ -AA, respectivamente (LEE; PENG; WU, 2013; WU, 2021).

A capacidade de uma solução aquosa de um AA exibir atividade óptica e girar no plano da luz polarizada foi observada pela primeira vez por L. Pasteur em 1851. Exceto

pela glicina (o AA mais simples da natureza com uma única cadeia lateral de hidrogênio), todos os demais AAs podem apresentar formas de isômeros D e L, isto é, quando um feixe de luz polarizada passa através da solução de um isômero óptico, a luz será girada para a direita (*Dextrogiro*-D) ou para a esquerda (*Levogiro*-L). Os L-AAs são geralmente os isômeros fisiológicos mais abundantes e representam > 99,9% do total de AAs em animais (BISCHOFF R; SCHLÜTER H, 2012). Quanto aos D-AAs, foi relatado que alguns destes estão presentes tanto na forma livre quanto na forma ligada a peptídeos no reino animal, sendo que os D-AAs representam <0,02% do total de AAs no corpo de mamíferos e aves e podem exceder 1% do total de AAs em certos moluscos marinhos (ABE *et al.*, 2005). Condições padrões ácida, alcalina ou ainda hidrólise enzimática de proteínas não afetam a configuração do isômero preexistente de AAs. No entanto, as formas L- ou D-AAs podem perder sua atividade óptica (conhecida como racemização) em soluções altamente ácidas ou alcalinas em temperaturas elevadas (por exemplo, T >110°C) (GREENSTEIN; WINITZ, 1961).

Ademais, todos os AAs formam sais intramoleculares tanto no estado cristalino quanto em solução aquosa, pois estes são eletrólitos anfotéricos que podem atuar como uma base ou um ácido, aceptores ou doadores de um íon hidrogênio, respectivamente. A essa estrutura, na qual uma molécula possui cargas elétricas positivas e negativas coexistentes, é dado o nome de íon dipolar ou *zwitterion*. O termo “Zwitterion” é derivado da palavra alemã para “duplo” (*zwitter*) e da palavra “íon”. Em uma solução aquosa, os grupos carboxila e amino de um AA dissociam-se de maneira dependente do pH e, portanto, os AA's possuem suas duas respectivas constantes de dissociação (pKa), a constante pKa1 para o grupo ácido e pKa2 para o grupo amino. O pKa é o log negativo da constante de dissociação ácida (Ka) e uma medida da tendência de um grupo perder um próton (H⁺) ou a força de um ácido. Um valor de pKa mais baixo indica um ácido mais forte, e pKa mais alto indica um ácido fraco, uma base. De forma relacionada, os valores do ponto isoelétrico (pI) dos AAs em soluções são baseados nas constantes de dissociação de seu ácido e grupo amino. Logo, para um AA sem cadeia lateral ionizável, $pI = (pKa1 + pKa2)/2$ (GREENSTEIN; WINITZ, 1961; WU, 2021).

Quanto à solubilidade, os AA's geralmente se tornam mais solúveis em soluções ácidas ou alcalinas e com temperaturas elevadas, pois o pH de uma solução afeta sua dissociação em formas iônicas, ligados aos valores de pKa do AA. Por exemplo, em comparação com uma faixa de pH 3–8,5, um pH inferior a 3 ou superior a 8,5 pode

aumentar a solubilidade da asparagina e da glutamina, bem como da tirosina, do ácido aspártico e do ácido glutâmico (NEEDHAM; PARUTA; GERRAUGHTY, 1971; WU, 2021).

3.4. D-fenilglicina e éster metílico de fenilglicina

Os L- e D-enantiômeros são α -aminoácidos opticamente ativos utilizados como blocos de construção quirais pelas indústrias farmacêutica, agroquímica e química para a produção de antibióticos semissintéticos, pesticidas, aditivos alimentares, adoçantes e outros peptídeos biologicamente ativos (CLEMENTE-JIMÉNEZ *et al.*, 2008; HÖHNE; BORNSCHEUER, 2009). Uma classe de α -aminoácidos não proteínogênicos (aminoácidos não codificados pelo DNA, também denominados como não naturais) importante consiste nas acilglicinas, sendo a fenilglicina, a 4-hidroxifenilglicina e a 3,5-diidroxifenilglicina os representantes mais importantes desta classe, uma vez que são encontradas mais comumente em produtos naturais biologicamente ativos, como formadina, ramoplanina, vancomicina e teicoplanina e contribuem significativamente para a atividade biológica desses produtos naturais (FUSE *et al.*, 2016). Dessa forma, a L-fenilglicina é um aminoácido raro e não proteínogênico, que ocorre apenas em alguns compostos como os antibióticos estreptogramina pristinamicina PI de *Streptomyces pristinaespiralis* (MAST *et al.*, 2011) e virginamicina S de *Streptomyces virginiae* (NINGSIH *et al.*, 2011). Além da sua forma L, o enantiômero D-fenilglicina (Figura 7a) se destaca na indústria química fina uma vez que desempenha importante papel como precursor na produção de antibióticos β -lactâmicos semissintéticos: penicilinas (ampicilina, apalcilina, mezlocilina, pivampicilina, etc.) (STEVENAZZI *et al.*, 2014) e cefalosporinas (SCHMID *et al.*, 2001).

O PGME (Figura 7b) é um composto derivado da fenilglicina, o qual é oxidável, facilmente polimerizável, apresenta baixa estabilidade e é de difícil conservação. Tais problemáticas são solucionadas com a formulação de éster metílico de D-fenilglicina, que é a forma do éster mais comercialmente utilizada (SIGMAALDRICH, 2023) devido à sua alta estabilidade, possibilidade de existir na forma sólida e preservação a longo prazo que facilitam o seu uso. Neste sentido, o (R)-(-)-2-cloridrato de éster metílico de fenilglicina é caracterizado como um pó cristalino branco ou quase branco,

que pode se apresentar na forma amarelada ou cinza ao ser misturado com impurezas ou mediante absorção de umidade (HUA, S; BAOSHU, L; KAI, R; ZHANG, J; WANG, Y; XUEJUN, 2015).

O PGME atua como um importante intermediário na síntese bioquímica da penicilina semissintética ampicilina (MCDONALD; BOMMARIUS; ROUSSEAU, 2017), além dos antibióticos semissintéticos cefalosporinas cefaclor (ZHANG *et al.*, 2007) e cefalexina (BRUGGINK; ROOS; DE VROOM, 1998) e outros antibióticos β -lactâmicos (SUN *et al.*, 2016). Além disso, este composto também desempenha papel essencial na produção de fenilglicina opticamente ativa (LOU *et al.*, 2006a), tem sido usado como aditivo alimentar intermediário de um adoçante artificial (éster metílico de aspartil- α -fenilglicina) em várias indústrias de alimentos (PIAO *et al.*, 2008), é utilizado para determinação de configuração absoluta de vários ácidos carboxílicos quirais (YABUUCHI; KUSUMI, 2000), tem sido relatado na síntese de novos compostos antifúngicos (YÖRÜR-GÖRECI *et al.*, 2021) entre outras diversas aplicações. Tendo em vista a crescente necessidade de D-fenilglicina enantiopura e seus derivados, a exemplo do PGME, há uma constante busca por novos métodos para produção desses compostos (LOU *et al.*, 2006a).

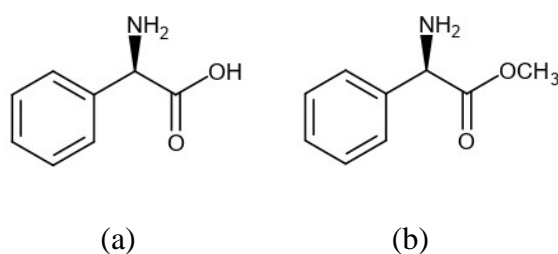


Figura 7 - Estrutura química de: (a) fenilglicina, (b) PGME. Fonte: Autor

3.4.1. Síntese de fenilglicina e éster metílico de fenilglicina via rota química

Segundo Williams e Hendrix (1990), as arilglicinas são um exemplo de uma classe de α -aminoácidos difíceis de sintetizar na forma opticamente pura devido à facilidade com que o próton da α -metetina pode sofrer racemização base-catalisada, e como resultado as arilglicinas em sua maioria são sintetizadas na forma racêmica, havendo a necessidade de aplicar a etapa posterior de resolução para separar os enantiômeros. A síntese de arilglicinas racêmicas é datada há mais de 100 anos, sendo em 1878 relatada a

síntese de fenilglicina por aquecimento do ácido α -bromofenilacético com excesso de hidróxido de amônio a 100-110 ° C, e em 1885 houve um dos primeiros preparos de fenilglicina pela redução do ácido benzoilformico fenil-hidrazona com amálgama de sódio em hidróxido de sódio diluído. Foi somente a partir de partir de 1880 que vários grupos começaram a utilizar a síntese de *Strecker* para produzir α -aminofenilacetonitrila, a qual foi hidrolisada à fenilglicina em ácido clorídrico. Ao longo dos anos, a síntese de *Strecker* tem sido o método mais amplamente utilizado para a síntese de arilglicinas (WILLIAMS; HENDRIX, 1990).

Documentada pela primeira vez pelo químico Adolph *Strecker* em 1850, a reação de *Strecker* consiste na síntese de α -aminoácidos multicomponente mais antiga, cuja reação compreende uma condensação de uma fonte de aldeído, amônia e cianeto, seguida de hidrólise subsequente do α -amino nitrila resultante (Figura 8) (GRÖGER, 2003). A reação de *Strecker* é um método muito comum na indústria devido à viabilidade econômica dos substratos utilizados no processo e à facilidade de obtenção dos α -aminoácidos, no entanto, este processo convencional apresenta como desvantagem o uso de reagentes altamente tóxicos como o cianeto e solventes orgânicos que geram resíduos prejudiciais ao meio ambiente, e além disso, a enantiosseletividade do produto obtido é relativamente baixa, o que é indesejável para produção sustentável de aminoácidos enantiopuros (GRÖGER, 2003; ZHU; YUAN, 2022). A reação de *Strecker* assimétrica tem sido relatada para a síntese de α -aminoácidos enantiopuros de iminas N-substituídas sem a etapa de resolução, porém, requer complicadas e caras etapas de proteção/desproteção de componentes químicos, além da baixa eficiência (ZHOU; WU; LI, 2017).

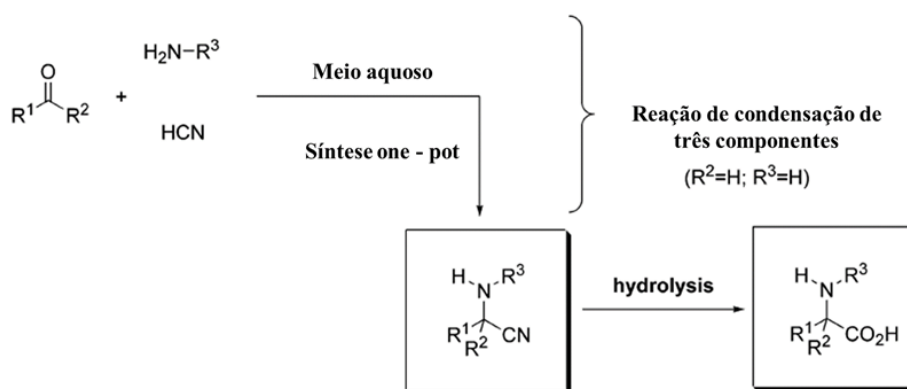


Figura 8 - Reação de Strecker. Fonte: (GRÖGER, 2003).

Ambas L e D-fenilglicina são industrialmente sintetizadas por meio da resolução química clássica de uma mistura racêmica (WEGMAN *et al.*, 2001), cujo processo de produção é baseado em matérias-primas petroquímicas (MOOSMANN *et al.*, 2020). A produção de D-fenilglicina enantio-pura foi desenvolvida pela empresa DSM Chemicals na década de 1970 e é utilizada até o momento atual, em um processo de cristalização dos sais diastereoméricos via o racemato, sendo este último obtido a partir de uma reação de *Strecker* em benzaldeído com cianeto, seguida de hidrólise do nitrilo, com o uso do ácido (+) -cânfora-8-sulfônico opticamente puro em meio aquoso como agente de resolução, sendo o rendimento do processo igual a 68%. A L-fenilglicina é racemizada em uma etapa separada e posteriormente reciclada (WEGMAN *et al.*, 2001).

O método proposto por Prasad *et al.* (2004) para a síntese química de éster metílico de (S)- fenilglicina também consiste em uma reação de *Strecker*, a qual ocorre pela adição de cianeto de trimetilsilila (TMSCN) a uma variedade de arilaldiminas na presença de LiClO_4 ou $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ em acetonitrila. Segundo os autores, A N-tosil fenilaldimina é tratada com TMSCN na presença LiClO_4 ou $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ em acetonitrila, dando início à reação de *Strecker*. A reação descrita é avaliada pela síntese de um α -aminoácido quiral, e dessa forma, a imina quiral **1** (Figura 9) é preparada pela condensação de (S) -(+) -1-(4-metoxifenil) etilamina e benzaldeído na presença de Na_2SO_4 anidro em metano. O tratamento de **1** com TMSCN à temperatura ambiente na presença de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ou LiClO_4 fornece uma mistura dos diastereômeros **2** e **3** em uma proporção de 4:1 e com 97% de rendimento. Os compostos **2** e **3** são facilmente separáveis, onde o principal (S, S) -diastereoisômero **2** é tratado com 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) em tampão diclorometano (DCM) -fosfato ou nitrato de amônio (CAN) em $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (4:1) para remover o auxiliar quiral e, dessa forma, aminonitrilo quiral **4** é obtido com 91% de rendimento. O quiral **4** é tratado com metanol para fornecer éster metílico de (S)-fenilglicina com alta enantiopureza e rendimento global de 62% (PRASAD; BISAI; SINGH, 2004).

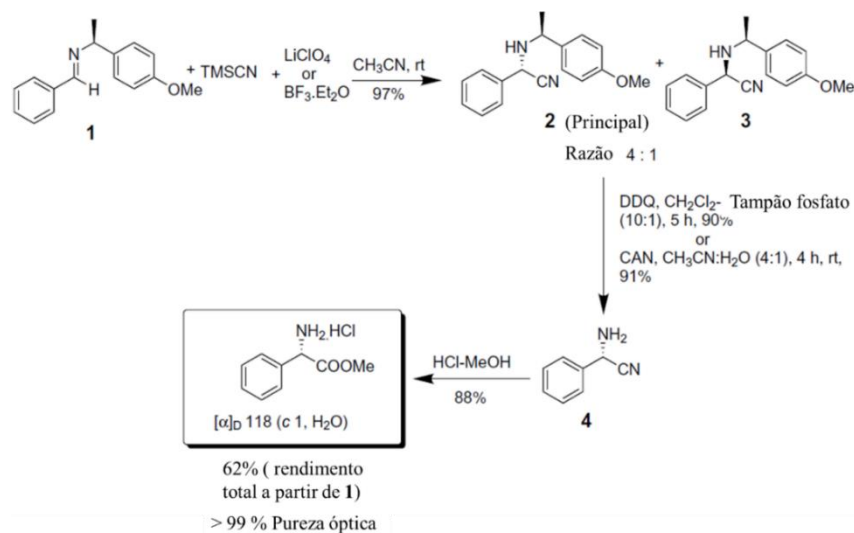


Figura 9 - Síntese de éster metílico de (S)-fenilglicina a partir da adição diastereosseletiva de TMSCN à imina quiral 1. Fonte: (PRASAD; BISAI; SINGH, 2004).

Moody (2011), na patente US 8.039.662, forneceu um novo processo para a síntese de ésteres metílicos de D-fenilglicina por meio da esterificação catalisada por ácido sulfúrico. Para efeito de contextualização, a partir da patente US Pat. nº 4.680.403 tornou-se conhecido um método de esterificação de aminoácidos com ácido sulfúrico como catalisador, cujo processo envolve o aquecimento do aminoácido em um álcool na presença do ácido. Contudo, este processo apresenta rendimentos consideravelmente baixos e, portanto, outros pesquisadores propuseram otimizações, como ocorreu na patente EP-A-0544205, onde a maior parte do álcool é adicionada na forma líquida ou gasosa à mistura reacional, enquanto, a mesma quantidade de álcool é destilada da mistura de reação. Apesar do alto rendimento a patente EP-A-0544205 é caracterizada pelo alto consumo de álcool que torna o processo economicamente pouco atrativo (MOODY, 2011).

Mediante a essas problemáticas, Moody (2011) propôs uma síntese de ésteres metílicos de aminoácidos que seja econômica e de baixo consumo de álcool. Segundo este método, uma massa de D-fenilglicina foi suspensa em metanol, seguida pela adição de ácido sulfúrico concentrado, cuja mistura foi mantida em refluxo. No reator equipado com unidade de refluxo/destilação com derivação, o metanol seco foi dosado a uma velocidade de dosagem de 110 g/h, sendo o nível dentro do reator mantido constante por destilação na mesma taxa. O autor notou que o rendimento de PGME de 91% aumenta

proporcionalmente com a maior adição de metanol, atingindo 94,7 %. Em um segundo ensaio uma nova massa de D-fenilglicina foi suspensa em metanol e adicionou-se ácido sulfúrico concentrado, sendo a mistura então mantida sob refluxo a pressão reduzida de atmosférica para 20 mBar usando uma bomba de vácuo. Uma segunda porção de metanol foi adicionada e a mistura foi mantida em refluxo por 1 hora e novamente concentrada a pressão reduzida à vácuo. O procedimento foi repetido por mais três vezes (adição de metanol, refluxo e concentração). Finalmente, adicionou-se metanol e a solução foi submetida a refluxo durante mais uma hora e arrefecida até à temperatura ambiente. Ao final, o rendimento de PGME foi 99,2%, e com este dado o autor pôde afirmar que o segundo método fornece um rendimento superior e consome muito menos metanol para a mesma proporção.

3.4.2. Síntese enzimática de fenilglicina

Até o presente momento não há nenhum registro da síntese enzimática de PGME reportado na literatura, apesar deste apresentar papel fundamental em processos enzimáticos como doador de acil para a produção dos antibióticos: cefalosporina semissintética de segunda geração cefaclor (HUANG *et al.*, 2018), cefalexina (FAN; LI; LIU, 2021) e a penicilina semissintética ampicilina (MCDONALD; BOMMARIUS; ROUSSEAU, 2017), assim como é utilizado na hidrólise enzimática para produção de D-fenilglicina enantiopura.

Por outro lado, muitas estratégias enzimáticas têm sido desenvolvidas para produzir α -aminoácidos quirais não naturais, especialmente a D-fenilglicina, visto que os processos biocatalíticos são realizados em condições menos severas como temperatura ambiente e pressão atmosférica e, além disso, os seus produtos quirais apresentam excelente enantiosseletividade (ZHU; YUAN, 2022).

Uma rota enzimática para D- fenilglicina proposta por Gokhale et al. (1996) também tem sido empregada industrialmente (Figura 10), na qual o reagente DL-5-fenilhidantoína é assimetricamente hidrolisado a D(-) N-Carbamoilfenilglicina utilizando-se a enzima D-hidantoinase como catalizador. Posteriormente, uma segunda etapa é aplicada para converter quimicamente a D(-) N-Carbamoilfenilglicina em D(-) fenilglicina na presença de NaNO_2 , ou o mesmo processo pode ser catalisado

enzimaticamente utilizando-se N-Carbamoil-Amidohidrolase de *Agrobacterium* (GOKHALE *et al.*, 1996). Atualmente, a D-fenilglicina e a D-4-hidroxfenilglicina produzidas industrialmente também são obtidas por um processo que utiliza as duas enzimas hidantoinase e a carbamoilase (LEUCHTENBERGER; HUTHMACHER; DRAUZ, 2005b). A rota enzimática de hidantoinase usada para a síntese de aminoácidos opticamente puros é um processo econômico, ambientalmente amigável e eficiente termos de consumo de energia quando comparado com outros métodos químicos/quimioenzimáticos (ENGINEER *et al.*, 2020).

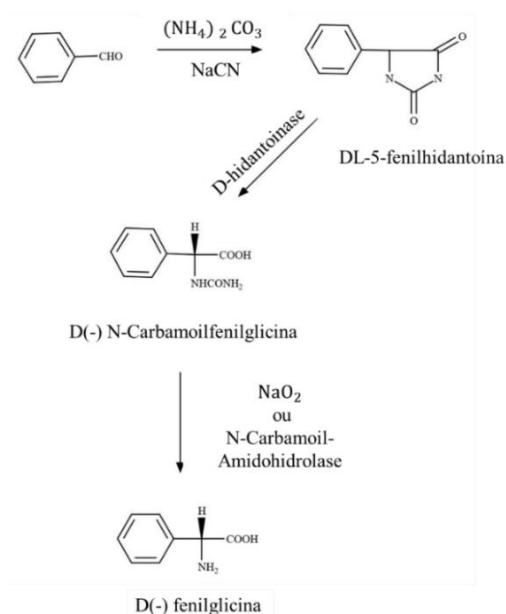


Figura 10 - Hidrólise enzimática de DL-5-fenilhidantoina e produção de D(-) fenilglicina. Fonte: (GOKHALE *et al.*, 1996).

Outra estratégia de biossíntese consiste na transaminação estereoinvertida reversível catalisada pela D-fenilglicina aminotransferase (D-PhgAT) de *Pseudomonas stutzeri* ST-201, usando L-glutamato como substrato doador de amino em uma única etapa para síntese de D-fenilglicina e D-4-hidroxfenilglicina. Apesar de ser possível sintetizar enzimaticamente em etapa única usando uma D-aminoácido aminotransferase, o uso desta e outras D-aminoácidos aminotransferases conhecidas apresentam como desvantagem a baixa atividade de transaminação para formação de D-fenilglicina, assim como tais enzimas aceitam apenas D-aminoácidos como doadores de grupos amino, e devido ao alto custo dos D-aminoácidos sua aplicação é economicamente impraticável (JARIYACHAWALID *et al.*, 2012).

Uma rota enzimática alternativa para síntese de (S)-fenilglicina é baseada na via biossintética de alguns peptídeos naturais encontrados em diferentes estreptomicetos, cujos genes que codificam a síntese de (S)-fenilglicina são clonados a partir dos genomas de cepas de *Streptomyces* (EPPINGER; GRÖNING; STOLZ, 2022). Um conjunto de genes designados como pglA, pglB, pglC, pglD e pglE de biossíntese de pristinamicina de *Streptomyces pristinaespiralis* apresentam alta identidade de aminoácidos com enzimas envolvidas na biossíntese de aminoácidos não proteinogênicos como 4-hidroxifenilglicina e 3,5-di-hidroxifenilglicina (AL TOMA *et al.*, 2015; MAST *et al.*, 2011).

Os genes pgl são responsáveis pela formação de L-fenilglicina a partir de fenilpiruvato, um composto da via metabólica primária do *shikimate*, sendo o fenilpiruvato convertido em fenilacetil-CoA por pglB e pglC (MAST *et al.*, 2011). Com base nas altas semelhanças dos produtos obtidos a partir dos genes pglB e pglC com as subunidades α e β de piruvato desidrogenase de *Mycobacterium avium* inferiu-se que ambos os genes trabalhem em conjunto como um complexo semelhante a esta desidrogenase. Posteriormente, o gene pglA converte fenilacetil-CoA em benzoilformil-CoA, sendo este último convertido em benzoilformato pelo gene pglD e, por fim, obtém-se L-fenilglicina a partir de benzoilformato pelo gene PglE (AL TOMA *et al.*, 2015). Com base em estudos de mutagênese de inserção de genes em pgl mutantes de *Streptomyces pristinaespiralis*, (MAST *et al.*, 2011) demonstraram que o produto formado pelo gene pglD apresenta similaridade em 53% com uma tioesterase tipo II de *Amycolatopsis mediterranei*, sugerindo assim que pglD apresenta a função da tioesterase hidrolítica liberando fenilglioilato e CoA a partir de benzoilformil-CoA. Além disso, o gene pglE foi investigado sobretudo devido à sua similaridade de produto em 67% com a fenilglicina aminotransferase de *Amycolatopsis balhimicina*, o que possibilita a conversão de benzoilformato em fenilglicina (AL TOMA *et al.*, 2015).

Mediante ao significativo valor agregado da L-fenilglicina e às vantagens já citadas dos processos enzimáticos, a biossíntese de L-fenilglicina a partir de ácido D-mandélico tem sido relatada na literatura (FAN *et al.*, 2015; RESCH; FABIAN; KROUTIL, 2010; TANG *et al.*, 2020). No estudo proposto por Tang *et al.*, (2020), uma cepa recombinante de *E. coli.*, que expressa a produção em cascata enzimática e se apresenta carregada com enzimas e genes codificantes, foi estabelecida para conversão de ácido D-mandélico em ácido fenilglioilato catalisada pela D-mandelato

desidrogenase (DMDH), e subsequentemente o ácido fenilgloxílico foi enantiosseletivamente transformado em L-fenilglicina pela enzima leucina desidrogenase utilizando-se formiato de sódio como co-substrato (TANG *et al.*, 2020).

Como uma extensão de pesquisa sobre catálise enzimática em Líquidos Iônicos, (LOU *et al.*, 2006a) descrevem a hidrólise enantiosseletiva eficiente de D,L-éster metílico de fenilglicina racêmico em D-fenilglicina enantipura catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435) imobilizada, a qual exibiu excelente atividade e enantiosseletividade no sistema contendo o Líquido Iônico BMI-BF₄ em comparação com vários solventes orgânicos típicos testados (Figura 11).

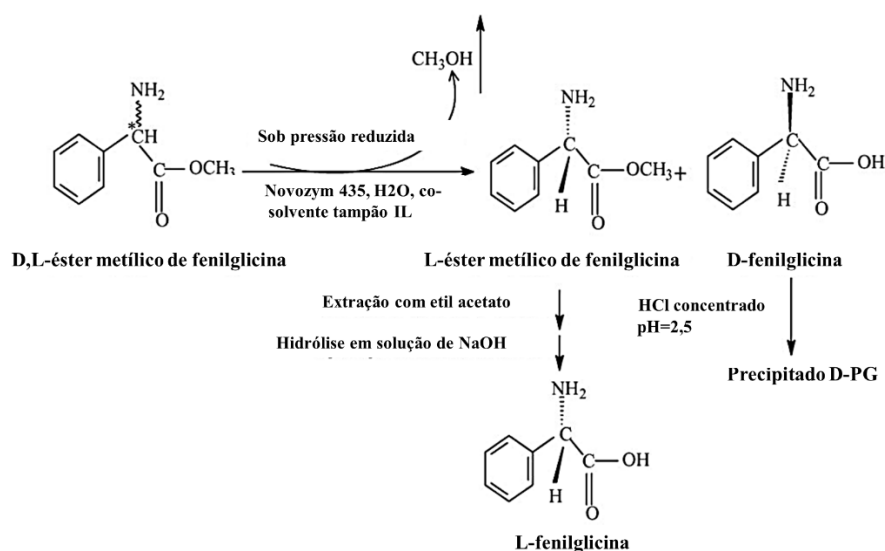


Figura 11 - A hidrólise enzimática de D,L-éster metílico de fenilglicina catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym 435) em um co-solvente líquido iônico (IL-Buffer). Fonte: (LOU *et al.*, 2006).

3.5. Líquidos Iônicos

Compreendidos como uma classe de novos solventes, os LIs são sais orgânicos encontrados na fase líquida a temperaturas abaixo de 100°C, que tem se destacado como alternativas “verdes” frente aos solventes orgânicos voláteis convencionais, visto que os LIs não são inflamáveis, assim como não voláteis ou tóxicos e além de facilmente recicláveis. Além disso, são considerados favoráveis candidatos para compor sínteses

químicas devido às suas propriedades notáveis como potencial de solvência, estabilidade térmica e suas propriedades físico-químicas de interesse (solubilidade, densidade, viscosidade e hidrofobicidade) que podem ser ajustadas pela seleção de diferentes combinações de cátions e ânions e dos grupos substituintes (GHANDI, 2013).

O primeiro LI (nitrato de etilamônio) foi relatado em 1914 por Paul Walden, que marcou o ponto de partida para a primeira geração de LIs, que é caracterizada pelo uso de cátions de grandes volumes como 1,3-dialquil-imidazólio ou 1-alkilpiridínio, ao passo que os ânions são baseados principalmente em aluminato de halogênio (Al^{+3}). Esta geração, porém, apresentada desvantagens pela instabilidade em relação ao ar e à água. O intuito da geração seguinte foi então obter ILs estáveis à base do cátion 1-etil-3-metilimidazólio, e os ânions alternativos $[CH_3CO_2]^-$, $[NO_3]^-$ e $[BF_4]^-$, e cujos LIs resultantes foram mais fáceis de manipular e despertaram atenção científica devido às suas propriedades particulares. Mais aperfeiçoada, a terceira geração de ILs (mais usuais) exibe propriedades químicas e físicas ajustáveis, dependendo das aplicações desejadas (FEDOROV; KORNYSHEV, 2014). Normalmente, a estrutura dos ILs combina cátions orgânicos com ânions que podem ser orgânicos ou ainda inorgânicos, sendo apresentados na Figura 12 alguns destes cátions e ânions mais comuns a serem utilizados para obter ILs (CRUZ; CIACH, 2021).

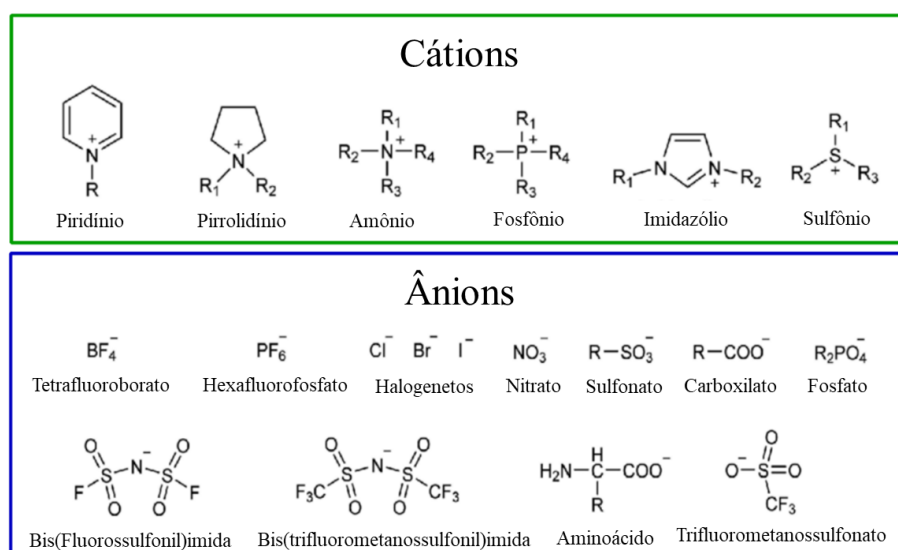


Figura 12 - Cátions e ânions típicos para preparação de líquidos iônicos. Fonte: (CRUZ; CIACH, 2021)

De acordo com sua rota de síntese, os ILS são geralmente classificados como líquidos iônicos apróticos (*Aprotic Ionic Liquids*- APILs) e líquidos iônicos próticos (*Protic Ionic Liquids*- PILs). De maneira geral, os PILs são obtidos através da transferência de prótons de um ácido de Brønsted para uma base de Brønsted enquanto os APILs são normalmente formados através de reações do tipo Menshutkin (MARKUSSON *et al.*, 2007). Em comparação com os APILs, os PILs geralmente apresentam maior condutividade e fluidez, menores pontos de fusão, são mais econômicos e de mais fácil preparo pois sua síntese não envolve a formação de subprodutos. No entanto, há relatos na literatura sobre a capacidade dos PILs em formar uma rede de ligações de hidrogênio o que a depender do caso pode limitar a ionicidade dos PILs em comparação com os APILs (GHANDI, 2013).

No cenário de desenvolvimento de novos líquidos iônicos, Camargo et al. (2016) relatam a síntese do líquido iônico nomeado lactato de 2-hidroxi dietilamônio (2-HDEAL), pertencente a uma família recém-projetada de PILs, que inclui aminas substituídas como cátions e ácidos orgânicos desprotonados como ânions. Ambas as estruturas iônicas no LI são de natureza orgânica e reúnem uma massa molar relativamente baixa, sem estruturas complexas ou grupos moleculares de perigo potencial. Este LI é característico pelo seu caráter polar, capaz de dissolver solventes polares e sais inorgânicos, todos apresentando alta tolerância a meios hidroxílicos. Quanto à sua compreensão reológica, os autores verificaram que o 2-HDEAL é um fluido não newtoniano cuja fluidez é influenciada pela tensão e pela temperatura, com afinamento mediante cisalhamento. Apesar da sua relevância e do crescente número de artigos científicos relacionados, existe uma escassez de informação do seu uso em diferentes reações, fundamentais para explorar seu potencial em novos processos envolvendo líquidos iônicos (BARROS; ANDRADE; IGLESIAS, 2018).

Ademais, como bons solventes, os LIs podem dissolver muitos compostos orgânicos, inorgânicos, metálicos e poliméricos, etc. Devido às suas notáveis propriedades físico-químicas, especialmente a boa solubilidade, os LIs, sendo um novo tipo de solvente, têm sido utilizados na comunidade química para química verde, como solventes, surfactantes, soluções, etc (TIAN *et al.*, 2017).

O número de trabalhos na literatura que determinam solubilidades de aminoácidos em LIs puros é muito escasso (SOUTO-MONTERO; RODIL; SOTO, 2024). Por outro lado, existem vários estudos com enfoque no efeito destes sais iônicos na solubilidade de aminoácidos em água. Por exemplo Vasantha et al. (2013) estudaram a solubilidade seis aminoácidos (alanina, valina, leucina, histidina, triptofano e tirosina) em formulações aquosas de LIs de amônio e os resultados mostraram que os sais atuaram como estabilizadores dos aminoácidos para sua solubilização. Souto-Monteiro et al. (2024) investigaram a solubilidade de vários aminoácidos constituintes da proteína colágeno em dois diferentes líquidos iônicos e com mistura dos mesmos em água, e observaram que a prolina apresenta alta solubilidade nos sistemas testados, devido sobretudo ao anel de pirrolidina em sua estrutura. No entanto, o aminoácido glicina (mais abundante na proteína estudada) apresenta solubilidade relativamente baixa no LI acetato justamente por não conter cadeia hidrofóbica.

3.6. Lipases

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolase, EC 3.1.1.3) pertencem à família das hidrolases que atuam nas ligações éster carboxílico, cuja função natural consiste em catalisar a hidrólise de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol na interface água-lipídio (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004). Além disso, essas enzimas enantio e regioseletivamente realizam reações de síntese: esterificação e reações de transesterificação em condições não aquosas (VANLEEUEW *et al.*, 2019).

3.6.1. Lipases microbianas

As lipases são amplamente encontradas na natureza, sendo produzidas por plantas, animais e diversos microrganismos, onde estão envolvidas no indispensável metabolismo de lipídios (PATEL *et al.*, 2019). Todavia, as lipases de origem microbianas são comumente as mais utilizadas nos processos de biotecnologia devido à sua estabilidade em amplas faixas de temperatura e pH, altos rendimentos, especificidade do substrato, quimiosseletividade, menores custos de produção e facilidade de manipulação genética. Além disso, o cultivo de microrganismos é vantajoso devido à produção em massa da enzima em um período curto de tempo (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021). Muitos microrganismos são conhecidos como potenciais produtores de lipases, incluindo

bactérias, fungos e leveduras (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019). Dentre as principais bactérias produtoras de lipases tem-se principalmente os gêneros *Acinetobacter* (GURURAJ *et al.*, 2016), *Arthrobacter* (SHARMA; BARDHAN; PATEL, 2009), *Bacillus* (ISIAKA ADETUNJI; OLUFOLAHAN OLANIRAN, 2018), *Microbacterium* (TRIPATHI *et al.*, 2014) e *Pseudomonas* (FAISAL *et al.*, 2014). A maioria dos fungos produtores de lipase comercialmente importante pertence ao gênero *Aspergillus sp.* (RAJAN; KUMAR; NAIR, 2011), *Geotrichum sp.* (MALDONADO *et al.*, 2016), *Mucor sp.* (ÜLKER; KARAOĞLU, 2012), *Penicillium sp.* (PANDEY *et al.*, 2016) e *Rhizopus sp.* (RIYADI *et al.*, 2017). Ademais, as leveduras incluindo os gêneros *Candida* (OLIVEIRA; FERNANDES; MARIANO, 2014), *Cryptococcus* (THIRUNAVUKARASU *et al.*, 2008), *Trichosporon* (KUMAR *et al.*, 2009), *Aureobasidium* (LIU *et al.*, 2008), e *Rhodotorula* (TASKIN *et al.*, 2016) destacam-se na literatura por seu potencial de produção de lipases.

3.6.2. Estrutura e mecanismo catalítico das lipases

Estudos da estrutura tridimensional das lipases por cristalografia de raios-X mostraram a presença de uma dobra α/β -hidrolase conservada, que também é observada em muitas outras hidrolases como as esterases, proteases, entre outras (CASAS-GODOY *et al.*, 2012). A dobra da α/β hidrolase é caracterizada pela presença de uma folha β central contendo oito fitas β paralelas, com exceção da β_2 que é antiparalela em relação às demais, enquanto as fitas paralelas β_3 a β_8 são conectadas por α -hélices. A folha β central possui uma torção super-helicoidal à esquerda, gerando um ângulo de aproximadamente 90° entre a primeira e a última fita (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). A bolsa de ligação das lipases está presente nesta folha β central, caracterizada pelo sítio de ligação hidrofóbico semelhante a uma “fenda” que pode estar localizado próximo à superfície da proteína ou ainda sob a forma de “funil” ou “túnel” (Figura 13) (SARMAH *et al.*, 2018). O sítio ativo das α/β hidrolases consiste em uma tríade catalítica altamente conservada formada por uma serina nucleofílica, aspartato/ácido glutâmico e histidina, de forma que o resíduo de serina está inserido na sequência Glicina-X-Serina-X-Glicina (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004).

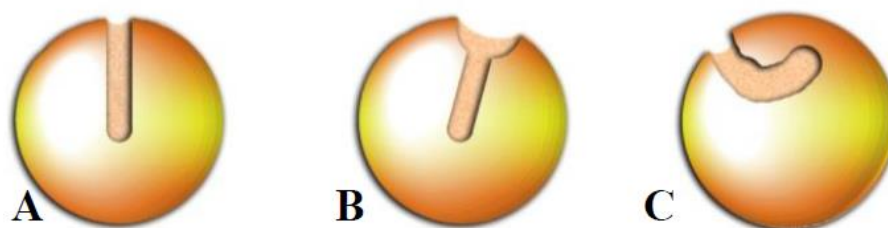


Figura 13 - Diferentes formas do sítio ativo da lipase: A) tipo “túnel” B) tipo “funil” C) tipo “fenda” próxima à superfície. Fonte: (PRAKASAN *et al.*, 2016).

A tríade catalítica (Ser-Asp/Glu-His) é semelhante à observada em serinas proteases e, portanto, a catálise das lipases segue um mecanismo catalítico semelhante destas enzimas. A hidrólise do substrato inicia com a ligação lipídica e o ataque catalítico da serina ao carbono da ligação éster (Figura 14a), o que gera um intermediário tetraédrico caracterizado pela formação de uma carga negativa no átomo de oxigênio da carbonila e pela ligação de quatro átomos ao carbono da carbonila rearranjado como um tetraedro (Figura 14b). O intermediário é estabilizado por duas ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio carbonil carregado negativamente e os grupos -NH da cadeia principal dos dois resíduos de aminoácidos pertencentes ao *hole* oxiânion. A nucleofilicidade do resíduo de serina é aumentada pela histidina catalítica, a qual um próton do grupo hidroxila da serina é transferido e essa transferência é facilitada pelo próprio resíduo catalítico, que orienta o anel imidazol da histidina de forma a neutralizar a carga que é gerada sobre ele. Subsequentemente, o próton é doado ao átomo de oxigênio da ligação éster, que é assim clivada, com a consequente liberação de álcool, enquanto a cadeia acila é esterificada à serina nucleofílica (Figura 14c). O próximo passo é a desacilação, na qual uma molécula de água hidrolisa a ligação covalente, com a consequente liberação do produto acil e a regeneração da enzima (Figura 14d) (BORRELLI; TRONO, 2015; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

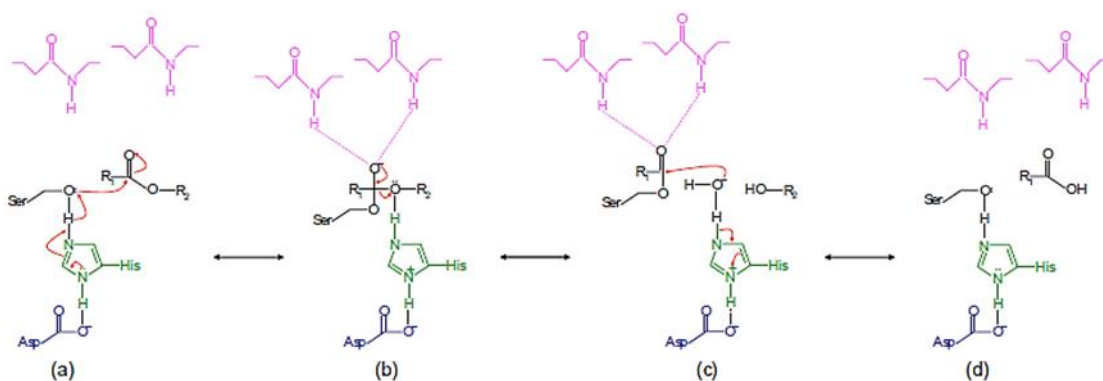


Figura 14 - Mecanismo da reação de hidrólise das ligações ésteres catalisadas pela lipase, onde o aspartato e histidina são mostrados em azul e verde, respectivamente; serina, substrato e água são mostrados em preto; os resíduos da cavidade de oxianion são mostrados em preto; os resíduos da cavidade de oxianion são mostrados em magenta. (a) Ataque nucleofílico da hidroxila serina no carbono carbonílico da ligação éster; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil-enzima, álcool liberado e ataque pela água; (d) enzima livre e produto acil liberado. Fonte: (BORRELLI; TRONO, 2015).

Muitas lipases exibem um domínio móvel denominado “tampa” (*lid*), que controla o acesso do substrato ao sítio catalítico, e cuja estrutura é composta por uma ou mais α -hélices de comprimento variável com dois segmentos flexíveis em ambas as extremidades que ligam à estrutura matriz da lipase (SARMAH *et al.*, 2018). Estudos de cristalografia de Raio-x mostraram que este domínio é capaz de adotar duas conformações: fechado e aberto, sendo o estado fechado caracterizado pelo não acesso do sítio ativo ao solvente que em consequência torna a superfície da enzima principalmente hidrofílica, inativando a lipase; no estado aberto, a “tampa” afasta-se pela presença do substrato revelando uma grande superfície hidrofóbica (sítio ativo) acessível ao substrato que torna a enzima funcional (ANOBOM *et al.*, 2014; PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998). A este fenômeno denomina-se ativação interfacial, o qual é exclusivo das lipases e inicialmente foi considerado como uma característica essencial e típica de todas lipases (NAGARAJAN, 2012). Todavia, lipases de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* e *Bacillus licheniformis*, não possuem o subdomínio *lid* e, portanto, têm baixos pesos moleculares e não apresentam ativação interfacial, demonstrando que a presença de uma “tampa”

hidrofóbica não está necessariamente correlacionada com a ativação ou catálise da lipase (BORRELLI; TRONO, 2015; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

3.6.3. Seletividade das lipases

Durante a hidrólise enzimática dos triacilgliceróis, as lipases podem apresentar especificidade que pode ser dividida em tiposeletividade, regioseletividade e enantioespecificidade. A especificidade e a seletividade destas enzimas em catalisar diferentes substratos podem ser determinadas pela complementaridade entre o substrato e a enzima, bem como pelas interações particulares entre o substrato e os resíduos enzimáticos (ALBAYATI *et al.*, 2020). A especificidade aos diferentes comprimentos de cadeia de ácidos graxos (cadeia curta, média ou longa), e o grau de instauração ou saturação refere-se à tiposeletividade. Neste sentido, a lipase de *Rhizomucor miehei* apresenta atividade máxima para tricaprilina que apresenta cadeia média (C₈), e baixa atividade para triacilgliceróis insaturados, ao passo que a lipase de *Humicola lanuginosa* mostrou uma atividade máxima para triacilgliceróis também de cadeia média (C₁₀) (BERGER; SCHNEIDER, 1991).

Além disso, consiste em regioseletividade a capacidade das lipases em distinguir as posições acil de triacilgliceróis de forma a hidrolisar grupos éster carboxílico primário em sn-1 e sn-3 (lipases 1,3- específicas) ou mais raramente o grupo éster carboxílico secundário em sn-2 (lipases 2- específicas). Neste sentido, as lipases podem ser agrupadas em lipases sn-1,3-regiosseletivas, lipases sn-2-regiosseletivas e por fim lipases não seletivas (POPPE *et al.*, 2018; TONG; BUSK; LANGE, 2016). A maioria das lipases microbianas hidrolisa as posições sn-1 e sn-3 dos triglicerídeos, e apenas algumas são capazes de hidrolisar a posição sn-2 (CASAS-GODOY *et al.*, 2012). Por exemplo, as lipases de *Pseudomonas sp.* e *Pseudomonas Aeruginosa*, *Rhizopus miehei* e *Candida rugosa* hidrolisam o substrato trioctanoína preferencialmente em sn-1, enquanto a lipase B de *Candida antarctica* mostra preferência sn-3 (KAPOOR; GUPTA, 2012). As lipases de *Rhizopus oryzae* (BEN SALAH *et al.*, 2001) apresentam uma melhor especificidade para hidrólise de ácidos graxos em sn-3 como também estão habilitadas a hidrolisar ácidos graxos em sn-1, da mesma forma que as lipases de *Aspergillus niger* (LI *et al.*, 2018), *Thermomyces lanuginosus* (CAO *et al.*, 2016), *Penicillium crustosum* (HASNAOUI *et al.*, 2022) apresentam regioseletividade sn-1,3. Poucas lipases

apresentam qualquer preferência por acilglicerol na posição sn-2, a qual é observada somente para as lipases de *Geotrichum candidum* e *Staphylococcus* (HORCHANI *et al.*, 2012). Por fim, as chamadas lipases não regioespecíficas consistem em algumas enzimas consideradas robustas e geralmente muito mais rápidas que atuam em quaisquer posições acil de triacilgliceróis e que produzem 1,2 (2,3)-sn-diacilgliceróis, bem como 1,3-sn-diacilgliceróis como intermediários de reação, resultando na quebra completa de triacilgliceróis em gliceróis (PARK; PARK, 2022). Os principais exemplos de lipases não específicas são: *Staphylococcus aureus*, *Candida viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus glumae* e *Bacillus cepacia* (CASAS-GODOY *et al.*, 2012).

Ademais, a última especificidade a ser abordada consiste na enantioseletividade, a qual ocorre quando as lipases demonstram preferência a um determinado enantiômero R ou S de uma molécula quiral em uma mistura de ambos racematos (MITCHELL *et al.*, 2008). As lipases têm sido amplamente utilizadas para a resolução de álcoois e ácidos carboxílicos através de hidrólises assimétricas dos ésteres correspondentes (KIRCHNER; SCOLLAR; KLIBANOV, 1985). A título de exemplo, as lipases de *Pseudomonas cepacia* imobilizadas em celite foram relatadas por (RASALKAR; POTDAR; SALUNKHE, 2004) como catalizadores eficientes para a resolução de álcool em líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [bmim]PF₆. Outra importante lipase destacada na literatura compreende a lipase de *Thermomyces lanuginosus* que tem sido descrita como a melhor enzima nas resoluções cinéticas de (Z)-4-trifenilmetoxi-2,3-epoxibutan-1-ol, um bloco de construção quiral sinteticamente útil, e outra atuação interessante desta enzima está na resolução de uma di-hidropirimidona ativada por N3-acetoximetil, um precursor do agente anti-hipertensivo de di-hidropirimidona (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

3.6.4. Reações catalisadas pelas lipases

3.6.4.1. Hidrólise

Conforme visto anteriormente, as lipases são hidrolases que atuam nas ligações éster carboxílico presentes no substrato padrão (triglicerol) para liberar diglicerol, monoglicerol, glicerol e ácidos graxos ilustrado na Figura 15. As lipases são únicas devido à sua natureza interfacial, ou seja, os substratos (lipídios) são insolúveis em água, enquanto as enzimas são solúveis e, portanto, catalisam as reações na interface lipídio-

água envolvendo adsorção interfacial e subsequente catálise. No geral, as lipases não requerem cofatores para sua atividade catalítica (NAGARAJAN, 2012).

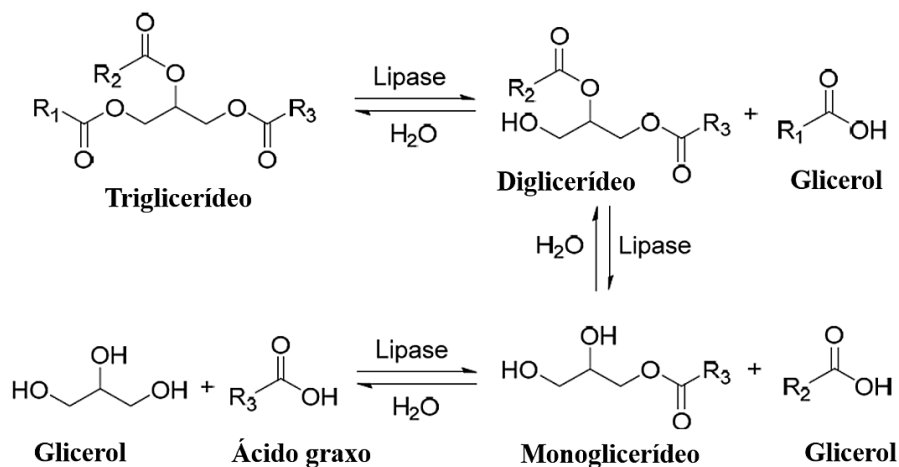


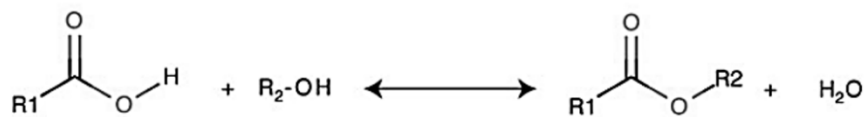
Figura 15 - Representação da reação de hidrólise catalisada pela lipase. Fonte: (JIANG; LOOS, 2016).

3.6.4.2. Esterificação

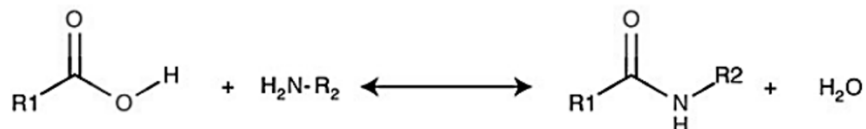
Sob condições termodinâmicas favoráveis (baixa atividade de água), as lipases catalisam uma variedade de reações de síntese que podem ser classificados em dois tipos principais: reações de esterificação e transesterificação. A esterificação, de maneira geral, é um processo de síntese termodinamicamente controlada que envolve o duplo deslocamento entre o ácido carboxílico livre (doador acil) e álcool (receptor acil) para formação de éster e água, como apresentado na Figura 16 (PARIKH; LANJEKAR; RATHOD, 2019; VILAS BÔAS; DE CASTRO, 2022). A tioesterificação e a amidação são reações semelhantes, que apresentam os respectivos tiol e amina como substratos (CASAS-GODOY *et al.*, 2012).

Esterificação

Esterificação



Amidação



Tioesterificação

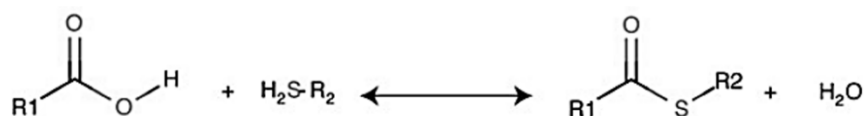


Figura 16 - Reações de esterificação catalisadas pelas lipases. Fonte: (CASAS-GODOY *et al.*, 2012).

O mecanismo de esterificação catalisada por lipases também é semelhante ao das serina proteases, sendo ambos caracterizados por dois intermediários tetraédricos, onde o primeiro intermediário tetraédrico é formado pelo ataque nucleofílico do resíduo serina da tríade catalítica ao ácido carboxílico livre (doador acil). Este intermediário perde uma molécula de água para formar um complexo acil-enzima e posteriormente a molécula de álcool (receptor acil) ataca o complexo (ataque nucleofílico) para dar origem ao segundo intermediário tetraédrico, que, por fim, este perde uma molécula de éster e a enzima retorna à sua forma nativa. Ambos os intermediários tetraédricos possuem um oxianion que é estabilizado por ligações de hidrogênio aos átomos da proteína provenientes do *hole* oxianion (GANDHI *et al.*, 2000).

Termodinamicamente, a reação direta de síntese de éster é favorecida no início da reação quando há alta concentração dos reagentes, com a posição de equilíbrio deslocada para a direita, no entanto, à medida que as moléculas de água se acumulam no sistema reacional, o equilíbrio é deslocado para o sentido inverso (esquerda), favorecendo a hidrólise do éster (ONOJA *et al.*, 2018). Nesse sentido, o uso de peneiras moleculares para controlar o excesso de água na reação tem sido relatado como uma poderosa ferramenta para melhorar o desempenho da reação enzimática uma vez que os rendimentos de éster podem ser aumentados removendo o subproduto, ou seja, a água, a

fim de deslocar o equilíbrio químico para a formação do produto (FALLAVENA *et al.*, 2014; PARIKH; LANJEKAR; RATHOD, 2019). A reação de esterificação pode ocorrer em sistemas com baixo teor de água, com uso de solventes, ou mesmo em meios sem solvente.

No processo químico convencional, ácidos como ácido clorídrico e ácido sulfúrico são frequentemente utilizados como catalisadores da reação de esterificação, embora existam desvantagens da síntese de ésteres realizada quimicamente devido ao custo energético associado às altas condições operacionais de temperatura e pressão, além da baixa especificidade destes catalisadores, caracterizadores pela degradação parcial dos produtos e formação de subprodutos indesejados que requerem outras etapas de purificação (VILAS BÔAS; DE CASTRO, 2022). A esterificação catalisada por lipases tem recebido importância no campo da produção de ésteres, visto que este é um processo ambientalmente atraente que apresenta apenas água como o único subproduto resultante e, além disso, não envolve o uso de solventes perigosos ao ser humano e ao meio ambiente em contraste com os processos convencionais de síntese química (SARMAH *et al.*, 2018). Além disso, entre os fatores importantes que influenciam o rendimento de éster tem-se as concentrações de enzimas e substratos, razão molar, o valor de pH da reação e temperatura, as taxas de mistura e o teor de água (STERGIOU *et al.*, 2013).

3.6.4.3. Transesterificação

O segundo tipo principal de reação catalisada pelas lipases consiste na transesterificação, também chamada de alcoólise, a qual é uma reação reversível em que ocorre uma troca de um radical acila do grupo éster presente em triglicerídeos (TAG) com o grupo alquila de um álcool (Figura 17) semelhante à hidrólise para resultar na formação de ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol bruto, em um processo de três etapas onde os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos, seguido por monoglicerídeos (KANDASAMY *et al.*, 2020; TAJUDDIN; LEE; WILSON, 2016). Entre os álcoois que podem ser usados no processo de transesterificação tem-se o metanol, etanol, propanol, butanol, álcool amílico etc, todavia, o metanol e o etanol são os álcoois mais utilizados devido ao seu baixo custo e às vantagens químicas (álcool polar e de cadeia mais curta) (HANH *et al.*, 2009).

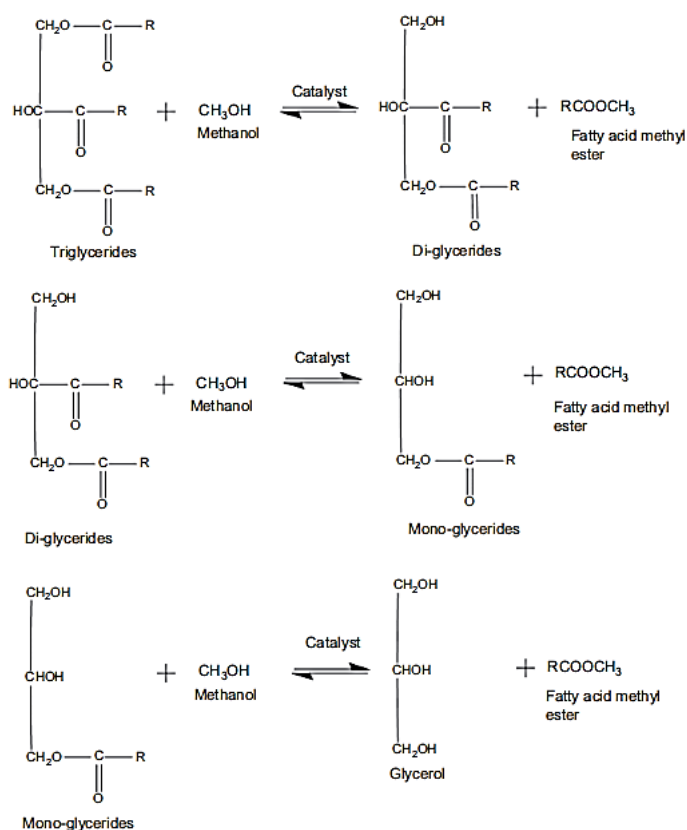


Figura 17 - Mecanismo de reação de transesterificação. Fonte: (THANGARASU; ANAND, 2019).

Em termos gerais, o termo transesterificação refere-se à troca de grupos entre um éster e um álcool (alcoólise), ou ainda entre um éster e um ácido (acidólise), entre um éster e um uma amina (aminólise), ou entre dois ésteres (interesterificação) (Figura 18) (BORRELLI; TRONO, 2015).

Nesse contexto, de escassa produção científica sobre a síntese enzimática do PGME, o presente trabalho tem como proposta a inédita síntese enzimática deste éster catalisada por lipases, as quais não têm sido empregadas com este intuito apesar da alta eficiência em catalisar uma ampla gama de reações, incluindo-se a esterificação. A investigação da solubilidade da PG em solventes orgânicos é um ponto crucial e tem a contribuir diante o cenário limitado de solventes aquosos abordados na literatura. Além disso, o 2-HDEAL como um novo LI prático desenvolvido nos últimos anos é uma alternativa promissora para a melhora da solubilidade do AA não proteínogênico PG, devido às propriedades físico-químicas deste cossolvente. Sabendo-se da importância dos antibióticos para a saúde e qualidade de vida, é crucial desenvolver pesquisas com o enfoque em novas alternativas de síntese de seus intermediários que aliem uma boa

produção e processo sustentável em todas suas etapas, utilizando um biocatalizador biodegradável por exemplo.

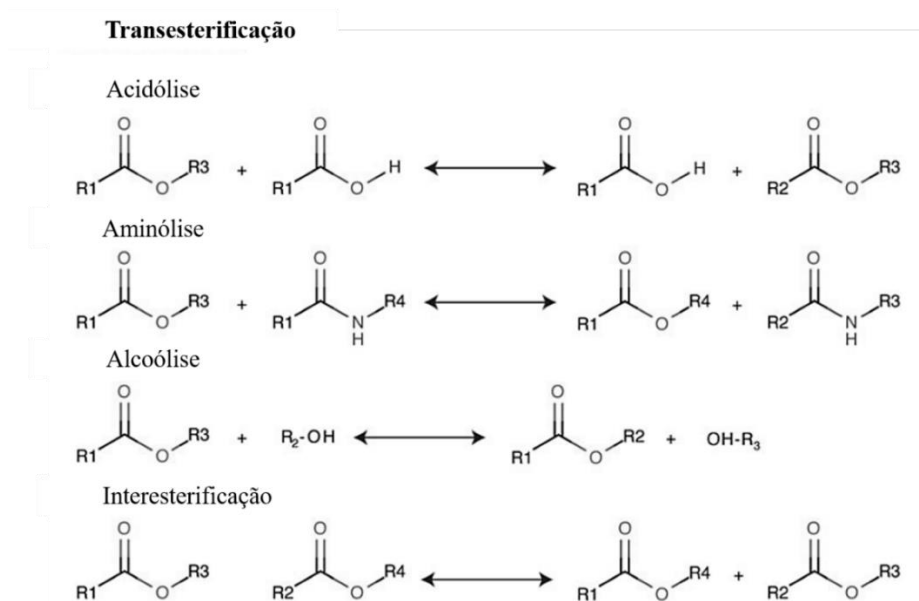


Figura 18 - Reações de transesterificação catalisadas pelas lipases. Fonte: (CASAS-GODOY *et al.*, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Lipases B de *Candida antarctica* na forma livre (CALB Liv) e imobilizada (CALB IM, Novozym 435), lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre (TLL Liv) e *Eversa*® *Transform 2.0* (EV Liv), lipase *Pseudomonas Fluorescens* (PFL liv) e de pâncreas de porco (PPL Liv) todas produzidas pela Novozymes, foram adquiridas da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA), lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em *Immobead 150* (TLL IM) foi adquirida da ChiralVision B.V. (Den Hoorn, Holanda). A tributirina 97% e reagente Bradford foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Reagentes (R)-(-)-2-fenilglicina 99% (*D-Phenylglycine* - PG) e (R)-(-)-2-éster metílico de D-fenilglicina 97% (*D-Phenylglycine Methyl Ester* -PGME) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Lactato de 2-hidroxi dietilamônio (2-HDEAL) foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia. Os reagentes utilizados em grau analítico foram: metanol (álcool metílico PA.ACS Iso), ácido clorídrico PA.ACS 36,5%, heptano PA 99,5 %, todos produzidos pela Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil), acetato de metila PA.ACS da Dinâmica Ltda (São Paulo, SP, Brasil), metanol e 2-propanol grau HPLC da Supelco® (St. Louis, MO, EUA), hidróxido de potássio em lentilhas 85 % da Neon Reagentes Analíticos (Suzano, SP, Brasil), fosfato de potássio monobásico e bibásico anidro P.A da Synth® (Diadema, SP, Brasil).

4.2. Atividade enzimática

A atividade hidrolítica das lipases estudadas foi baseada na metodologia descrita por Beisson et al. (2000), com adaptações. O método consiste em adicionar um volume de 25 µL da solução enzimática a um meio reacional contendo uma mistura de 1,5 mL de tributirina, 6 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,4 e 16,5 mL de água destilada, condicionados em um reator encamisado de vidro borossilicato acoplado a um Banho Ultratermostatizado Digital com cuba soldada (SL-152/18, SOLAB) (Piracicaba, SP, Brasil). A reação foi realizada a 37 °C durante 5 minutos aplicando-se uma agitação de 650 rpm à mistura reacional. A atividade hidrolítica foi calculada a partir do consumo de KOH 0,02 M necessário para neutralizar o ácido butírico liberado na reação,

monitorado por titulometria em um titulador Tritando 907 Metrohm (Herisau, Suíça) A atividade enzimática foi expressa em TBU (unidade de hidrólise de tributirina), definida pela quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido butírico por minuto nas condições de ensaio.

4.3. Avaliação de solubilidade da PG em meios com baixa atividade de água

Os ensaios de solubilidade da PG (Sb), nos solventes selecionados com baixa atividade de água, foram conduzidos com base na metodologia de Jauregi et al. (2001) e Monteiro et al. (2021), com adaptações. Assim, massas com aproximadamente 10 mg de PG foram medidas em Balança Semi-micro Analítica (HPBG2285-ion, BEL) (Monza, Itália), distribuídas em frascos de vidro âmbar com tampa e capacidade de 60 mL. Um volume de 10 mL do solvente (heptano ou acetato de metila) (Tabela 1) foi adicionado aos frascos para as diferentes condições avaliadas: presença de ácido (17 μL de HCl 0,5 M), base (120 μL de KOH 5 M) ou líquido iônico prótico 2-hidroxi lactato de dietilamônio (2-HDEAL) (100 μL), ou ainda nenhum destes. Os recipientes foram mantidos em uma Incubadora Shaker (SL-222/125, SOLAB) (Piracicaba, SP, Brasil), com agitação de 250 rpm e aquecimento de 40 °C durante aproximadamente 20 horas para favorecer a possível dissolução do material. Após o período descrito, a agitação foi interrompida e as soluções foram mantidas em repouso por 15 minutos a fim de aguardar a precipitação do material não solúvel. Após intervalo de repouso, alíquotas em duplicatas de 1 mL da fase líquida (sobrenadante das suspensões) foram coletadas e transferidas para eppendorfs de 2 mL, aquecidos a 50 °C em agitador magnético com aquecimento (C-MAG HS 7, IKA) (IKA® KS, Staufen, Alemanha), e sob exaustão por 10h para remoção dos solventes. Após a secagem completa, 2 mL de uma solução de metanol/água 1:1 (v/v) foram adicionados em cada eppendorf para solubilização completa do conteúdo, seguida por agitação intermediária em agitador mini vortex (CRV-45X) CappRondo (Capp, Nordhausen, Alemanha) e posterior filtração em seringa com filtro membrana PES 0,22 μm 30 mm Kasvi (São José dos Pinhais, Pr, Brasil). Posteriormente, as soluções foram condicionadas em vials de vidros para quantificação de PG por cromatografia líquida.

Tabela 1 - Solventes ou sistema de solventes avaliados na solubilidade de fenilglicina (PG).

Ensaio	Solvente (10 mL)	Base (KOH 5M)	Líquido Iônico (100 µL)	Ácido (HCl 0,5 M)
Sb 1	Heptano	*	*	*
Sb 2	Heptano	120 uL	*	*
Sb 3	Heptano	*	2-HDEAL	*
Sb 4	AC de metila	*	*	*
Sb 5	AC de metila	120 µL	*	*
Sb 6	AC de metila	*	2-HDEAL	*
Sb 7	AC de metila	*	*	17 µL

AC de metila: Acetato de metila; 2-HDEAL: Líquido iônico 2-hidroxi lactato de dietilamônio.

4.4. Espectroscopia de varredura na faixa UV-Visível

Para a espectroscopia de varredura na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), realizou-se o cálculo da intensidade de luz absorvida pelas amostras, a partir da irradiação em uma ampla faixa de comprimentos de onda. Neste sentido, os espectros para a PG e PGME foram obtidos em um espectômetro UV-vis Thermo Scientific, modelo Genesys 10S da Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA) com faixa de varredura de 200 a 1000 nm, utilizando-se o *Software* Optional VISION lite 5. As soluções dos compostos foram preparadas nas concentrações de 10 mM em tampão fosfato (70%) e metanol (30%).

4.5. Esterificação enzimática

Um estudo foi conduzido a fim de obter-se PGME por esterificação enzimática de PG catalisada por lipases, na presença de metanol e em solventes com baixa atividade de água. As reações de esterificação foram conduzidas em batelada em frascos de vidro âmbar, iniciadas pela adição de lipase comercial (diferentes cargas de enzima, em TBU/g de PG) em uma mistura contendo solvente (heptano ou acetato de metila), metanol e PG em uma proporção molar de 24:1 e KOH 5M (120 µL) ou HCl 0,5 M (17 µL) ou líquido iônico não comercial 2-HDEAL, a depender da estratégia adotada em cada ensaio. A

reação foi mantida sob agitação de 250 rpm em incubadora Shaker (SL-222/125, SOLAB) em temperaturas na faixa de 30 a 50° C, por 3 a 7 dias, dependendo do ensaio.

4.6. Hidrólise enzimática

As reações de hidrólise foram realizadas a fim de avaliar a especificidade das lipases em catalisar a hidrólise do PGME em PG. A reação foi realizada em frascos de vidro âmbar com capacidade de 100 mL, contendo 50 mL de fosfato de sódio 20 mM, pH 7, e lipases B de *Candida antarctica* (CALB), lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre (TLL) e *Eversa® Transform 2.0* (EV), lipase *Pseudomonas Fluorescens* (PFL) e de pâncreas de porco (PPL) livres na razão de 50000 TBU/ 0,1 g PGME, condicionados a 50 °C com agitação de 250 rpm por 96 horas em Incubadora Shaker (SL-222/125, SOLAB). Durante a reação, foram coletadas amostras em intervalos de tempo definidos (5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 1 h, 1 h e 10 min, 1 h e 20 min, 1 h e 40 min, 2 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h, 28 h, 48 h, 52 h, 72 h, 76 h e 96 h) para acompanhar a quantidade de PGME e PG no meio. As amostras coletadas eram aquecidas a 90 °C por 5 minutos em banho termostático para desnaturação das enzimas presentes, interrompendo conseqüentemente a catálise. Após secagem, descrita na seção 4.7, as amostras foram diluídas com volume fixo de solvente metanol/água na proporção 1:1 (v/v), filtradas com seringa associada ao filtro membrana PES 0,22 µm 30 mm Kasvi e armazenadas para quantificação dos compostos de interesse por cromatografia líquida.

4.7. Secagem

Amostras do meio de esterificação foram secas a 70 °C por 12 horas em estufa à vácuo (SL-104, SOLAB), acoplada a uma bomba de vácuo (SL-60, SOLAB) para remoção dos vapores para uma capela com exaustão. Também foram realizados ensaio de secagem a 30 °C por 24 horas em estufa à vácuo, bem como apenas à temperatura ambiente por 48 horas sob exaustão. Realizou-se também um ensaio de secagem de amostras padrões de PG e PGME (10 mg) foram submetidas à secagem (condição I: 30°C por 24 horas; e condição II 70°C por 12h) em meios similares aos de reação enzimática para investigar se as amostras provenientes da reação de esterificação enzimática sofriam degradação ou hidrólise indesejada nas temperaturas dos ensaios de secagem.

4.8. Métodos cromatográficos

4.8.1. Caracterização e quantificação de PG e PGME por cromatografia líquida

PG e PGME foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High-performance liquid chromatography* -HPLC). A separação cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo Waters Alliance e2695 (Waters Co., Milford, CA, EUA), equipado com uma coluna de adsorção hidrofóbica (fase estacionária) Phenomenex Gemini C18 (Torrance, CA, EUA), cujas dimensões são 150 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel isocrática, constituída por 70% de tampão fosfato 20 mM pH 7 e 30% de metanol, foi mantida a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção era de 20 µL e os analitos foram identificados em detector UV em 214 nm.

A separação cromatográfica também foi realizada utilizando-se um sistema de cromatografia líquida Waters, tendo-se com fase estacionária uma coluna Waters Xbridge BEH Phenyl (Waters Co., Milford, CA, EUA) de 150 mm×3,0 mm e 3,5 µm de tamanho da partícula. A fase móvel, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min, consistiu no seguinte gradiente: 0 min, 30% B; 3 min, 45% B; 5 min, 50% B; 12 min, 80% B; 13 min, 30% B; 15 min, 30% B, sendo o eluente “A” formado por 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água Milli-Q e o eluente B formado por 0,1% (v/v) de ácido fórmico em metanol. Todas as análises foram realizadas a 25 ° C, volume de injeção de 20 µL e os analitos detectados por UV em 214 nm.

4.8.2. Caracterização do éster PGME via cromatografia gasosa

A presença de PGME nas amostras de reação foi investigada por cromatografia gasosa (*Gas chromatography*-GC) em um cromatógrafo de fase gasosa 7890A (Agilent Technologies, PA, EUA), equipado com um detector de ionização a chama (FID) e injetor do tipo split-splitless. A coluna empregada foi uma HP-5 (5%-fenil-metilpolissiloxano) de 30 m × 0,320 mm de diâmetro × 0,25 µm de espessura de filme (Agilent Technologies). Utilizou-se gradiente de temperatura para realização da separação cromatográfica, sendo a temperatura inicial 70 °C, e posteriormente, na taxa de 10° C/min, chegou-se a 250 °C, ficando nesta temperatura por 1 minuto. As amostras foram dissolvidas em 300 µL de 2-propanol grau HPLC, e o padrão foi preparado nas concentrações de 0,5 e 1,0 g/L em 2-propanol e na concentração de 0,5 g/L em 2-propanol, contendo 100 µL de 2-HDEAL, a

fim de analisar se o tempo de retenção do analito se alterava na presença de líquido iônico. Neste caso, utilizou-se também como branco uma solução de 2-HDEAL em 2-propanol.

4.8.3. Identificação de PGME por cromatografia líquida acoplada à espectrofotômetro de massas

PGME foi identificado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry- LC/MS*) utilizando-se o cromatógrafo líquido de ultra performance Waters Acquity (Waters Co., Milford, CA, EUA), composto por uma bomba quaternária, com injetor automático Waters Acquity H-Class Sample Manager – *Flow Through Needle*, acoplado a um analisador de massa Xevo-TQD (Waters Co., Milford, CA, EUA) com fonte de ionização a pressão atmosférica do tipo electrospray (*ESI*), operando no modo positivo. Os cromatogramas e espectros de massa foram registrados através do *software* Mass-Lynx. Para a otimização das condições de ionização, preparou-se uma solução padrão de PGME na concentração de 9,8 µg/mL utilizando-se uma solução de metanol e água na proporção de 1:1 v/v como diluente. Esta solução foi infundida no sistema a uma vazão de 20 µL/min e as condições estabelecidas foram: temperatura da fonte 150 °C, voltagem do capilar 3,7 kV, temperatura de dessolvatação 400 °C, vazão do gás de dessolvatação 1000 l/h. A energia de colisão (CE) e a voltagem do cone foram otimizadas, para cada transição, utilizando-se o *software* *MassLynx* através da ferramenta de ajuste automático *Intellistart*. A coluna Waters Acquity UPLC BEH Fenil (100 x 2,1 mm; 1,7 µm) foi utilizada para a separação cromatográfica, que ocorreu no modo gradiente de eluição, sendo o solvente A = água, contendo 0,1% de ácido fórmico e o solvente B = metanol, contendo 0,1% de ácido fórmico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação do meio reacional e solubilidade da PG

Apesar da ampicilina permanecer como um dos antibióticos mais consumidos mundialmente, os relatos de solubilidade deste e do seu produto de hidrólise enzimática (PG) são escassos na literatura em diferentes condições operacionais, sobretudo em meios não aquosos (FELIX; CHIAVONE-FILHO; MATTEDI, 2016; WADE; BENJAMIN, 2011). Diante da presente investigação da síntese enzimática do éster, a avaliação da solubilidade da PG em solventes com baixa ou nula atividade de água foi uma etapa inicial indispensável no estudo desta rota, que é inédita na literatura, uma vez que em ambientes aquosos as lipases apresentam natural preferência pela reação inversa (hidrólise) à esterificação desejada.

Assim, a solubilidade da PG foi avaliada seguindo-se as metodologias adaptadas de Jauregi et al. (2001) e Monteiro et al. (2021), de forma que a matéria sólida de fenilglicina foi adicionada aos solventes: heptano (solvente com propriedade apolar) e acetato de metila (solvente com propriedade polar), ambos em conjunto com metanol 24:1 (com referência no número de mols de PG) adotado nas reações realizadas, e então as amostras foram agitadas e alíquotas coletadas para caracterização posterior em HPLC. Quanto à solubilidade aparente, a PG manteve-se insolúvel em ambos os solventes, apresentando massa concentrada ao fundo do recipiente. A nula ou desprezível solubilidade tornou-se evidente no, na qual se constata que as massas de fenilglicina adicionadas aos solventes (em conjunto com o metanol 24:1) não dissolveram em heptano (Sb 1), assim como em acetato de metila (Sb 4). Tais resultados corroboram com as pesquisas de Cohn e Edsall (1943), que destacam que a solubilidade dos AAs diminuí em sistemas de solventes orgânicos puros a um ponto consideravelmente baixo quando comparado com a água.

Ademais, a alcalinização do meio em heptano não promoveu a solubilização de PG (Sb 2). Apesar de muito baixa (<0,1 mM) (Tabela 2), confirmou-se que a inclusão da base foi vantajosa para a solubilização da PG em KOH/AC (Sb 5). A acidificação com HCl foi empregada apenas em acetato de metila para apoiar os ensaios de reação enzimática. Quando se acidificou o meio HCL/AC (Sb 7), a solubilidade da PG atingiu

um valor médio de $0,7476 \pm 0,0728$ mM (Tabela 2), valor esse superior ao obtido em acetato de metila alcalinizado.

Com base na pesquisa de Needham et al. (1971), que comprova aumento de solubilidade de aminoácidos em solventes (aquosos ou não) mediante a adição de ácido ou base, adotou-se neste estudo a alcalinização em parte dos ensaios com adição de 120 μ L de KOH 5M, atingindo-se pH em torno de 12-13, assim como se adotou também a estratégia de acidificação com 17 μ L de HCl 0,5 M atingindo-se pH 5, sendo ambas faixas de pH escolhidas para exceder ou aproximar-se das constantes de dissociação (pKa) da fenilglicina ($pKa_1 = 1,71 \pm 0,06$ e $pKa_2 = 9,00 \pm 0,05$, a 30°C) com a finalidade de promover uma melhora da solubilidade desta nos solventes selecionados (RUIZ *et al.*, 2002). Ampicilina e fenilglicina (PG) possuem em sua estrutura grupos amino e carboxila que atribuem características ácidas e básicas coexistentes na mesma molécula e, devido a isso, tais compostos podem em solução coexistir em três diferentes formas iônicas (catiônica, zwitteriônica e aniônica) de diferentes solubilidades, a depender do pH da solução (FELIX; CHIAVONE-FILHO; MATTEDI, 2016). A faixa ácida abaixo do pKa1 não foi explorada devido à incompatibilidade com a estabilidade das lipases, que desnatura em pH ácido (AHMAD *et al.*, 2010).

Tabela 2 - Solubilidade média da fenilglicina em acetato de metila e metanol (razão molar 24:1) na presença de KOH, líquido iônico prótico (2-HDEAL) ou HCL.

Amostra	Solubilidade média (mM)
Sb 5 KOH/AC	$0,066 \pm 0$
Sb 6 LI/AC	$2,686 \pm 0,026$
Sb7 HCL/AC	$0,748 \pm 0,073$

Devido às suas propriedades físico-químicas, os líquidos iônicos (LI's) têm sido utilizados como solventes, os quais são capazes de dissolver uma gama de compostos: orgânicos, inorgânicos, metálicos e poliméricos, etc (TIAN *et al.*, 2017). Nesta perspectiva, o líquido iônico prótico e não comercial 2-HDEAL foi utilizado como cossolvente em um ambiente ausente de água para investigar os efeitos da presença deste

na solubilidade da PG. O sistema LI/Heptano não possibilitou nenhuma solubilização de PG, enquanto que o sistema LI/AC permitiu a maior solubilização de PG nas condições avaliadas (Sb 6), atingindo uma solubilidade média de $2,686 \pm 0,026$.

Segundo Hossain et al. (2017), o ânion presente nos LI's, para as soluções aquosas de aminoácidos, promove preferencialmente ligações às porções não polares dos aminoácidos hidrofóbicos, exercendo importante papel na direção e magnitude dos fenômenos de solubilidade em LI. Apesar do ambiente em solvente orgânico, os resultados de melhores solubilidade, observados em acetato e LI, expressam de maneira análoga o desempenho do ânion carboxílico característico do LI prótico 2-HDEAL (KULHAVY *et al.*, 2016), que demonstrou desempenhar um papel importante para promover uma melhora da solubilidade da PG em acetato de metila, devido sobretudo à sua interação com a porção apolar na molécula (anel aromático fenil).

A glicina é um aminoácido relativamente solúvel em água à temperatura ambiente e muito insolúvel em solventes orgânicos, enquanto que a solubilidade da fenilglicina é relativamente baixa em água e, portanto, é frequentemente encontrado na forma sólida (cristalina) no solvente (JAUREGI *et al.*, 2001). É reportado que a solubilidade da PG em água é bem mais expressiva (por exemplo, 32,27 mM a 25 °C e pH 7,00) que àquela em soluções pouco aquosas (FELIX; CHIAVONE-FILHO; MATTEDI, 2016).

5.2. Espectroscopia

A espectroscopia de UV-Vis foi utilizada com o objetivo de obter informações sobre a composição química de amostras de PG e PGME comerciais usadas como padrões analíticos. Os espectros de absorção UV-Vis de PG e PGME são apresentados na Figura 19, ambas na concentração de 10 mM em tampão fosfato pH 7 (70 %) e metanol (30 %). Observa-se absorção elevada de ambos os compostos na região entre 200 e 275 nm, que compreende a faixa do UV, exibindo a PG um máximo de absorção em 226 nm e PGME em 230 nm. Ademais, nota-se que as bandas de absorção para ambos os compostos apresentaram comportamento similar com um decaimento exponencial após o máximo de absorção, seguidos por um segundo ponto máximo em comum em 256 nm. Resultados semelhantes foram obtidos por Palumbo et al. (1981), os quais observaram absorção de PG em ácido sulfúrico na região UV de 210-300 nm, com absorção máxima em 224. Segundo Galo e Colombo (2009), o desempenho de todo o sistema óptico depende

altamente do comprimento de ondas que é utilizado, pois em alguns casos, a exemplo de sistemas refratores, as propriedades ópticas dos materiais se alteram com o comprimento de onda. Ademais, ambos os compostos apresentam perfil de absorção muito próximos, impedindo assim a utilização desta técnica para caracterizar separadamente tais moléculas em soluções que contenham ambos PG e PGME. Ainda assim, tais resultados foram importantes para confirmar o comprimento de onda a ser adotado nas demais técnicas de caracterização que se utilizem de detector UV. Com base na metodologia de Wilson et al (2009) e nos resultados obtidos desta espectroscopia, as amostras obtidas na reação de síntese de PGME a partir de PG foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a um detector UV em 214 nm.

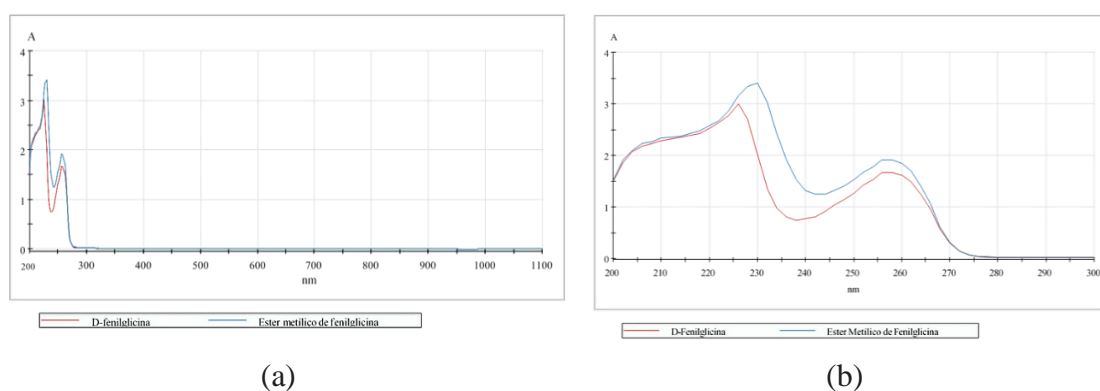


Figura 19 - (a) espectros de absorção de fenilglicina (PG) e éster metílico de fenilglicina (PGME) na região UV-Vis (200-750 nm), (b) visualização ampliada dos espectros de absorção de PG e PGME na região UV (<400 nm).

5.3. Atividade de hidrólise de tributirina

As atividades hidrolíticas de tributirina catalisadas pelas lipases comerciais são apresentadas na Tabela 3, as quais foram medidas com o intuito de se definir a carga de enzima para as reações posteriores. Foram utilizadas então as lipases livres (não imobilizadas) comerciais e de fonte microbiana: lipase B de *Candida antarctica* (CALB), lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Eversa® Transform 2.0* (EV), de *Pseudomonas Fluorescens* (PFL) e de origem animal: lipase de pâncreas de porco (PPL) e lipases imobilizadas de *Candida antarctica* (CALB IM) e de *Thermomyces lanuginosus* (TLL IM).

Tabela 3 - Atividades hidrolíticas de lipases comerciais a 37°C e pH 7,0 usando tributirina como substrato. As atividades são expressas em unidades de tributirina (TBU) por mililitro (para lipases líquidas) ou por grama (para lipases sólidas).

Lipase/Unidades	Atividade de hidrólise (A_H)
CALB (TBU/mL)	12.330,11
CALB IM (TBU/g)	3.065,907
TLL (TBU/mL)	68.888,61
TLL IM (TBU/g)	8.370,57
EV (TBU/mL)	77.128,10
PFL (TBU/g)	17.026,10
PPL (TBU/g)	30.162,14

CALB: lipase B de *Candida antarctica*; TLL: lipase de *Thermomyces lanuginosus*; EV: Eversa Transform 2.0; PFL: lipase de *Pseudomonas fluorescens*; PPL: lipase de pâncreas de porco; IM: imobilizada.

5.4. Hidrólise de PGME

As concentrações de PGME e PG, no meio reacional constituído de tampão fosfato de sódio 20 mM e pH 7, foram monitoradas via técnica analítica em HPLC para as amostras coletadas em intervalos de tempo definidos até atingir-se o tempo total da batelada, com o intuito de avaliar a reação de hidrólise de PGME catalisada pelas lipases comerciais: de *Candida antarctica* tipo B (CALB), de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Eversa® Transform 2.0* (EV), de *Pseudomonas Fluorescens* (PFL) e de pâncreas de porco (PPL), todas na forma livre.

A Figura 20 apresenta o perfil de conversão de PGME em PG ao longo de 96 horas de ensaio, na qual se observa que o éster é mais rapidamente consumido pela reação catalisada pela lipase CALB, atingindo conversão de 100% de éster em PG após 2 horas de reação. As reações de hidrólise de PGME catalisadas por outras lipases também foram eficientes, atingindo 100% de conversão, porém em um tempo maior de hidrólise: 52 horas para as reações catalisadas por TLL e PPL e 72 horas para as reações catalisadas

por EV e PFL. Conclui-se, portanto, que todas as lipases avaliadas são eficientes na hidrólise de PGME, gerando equivalentemente PG.

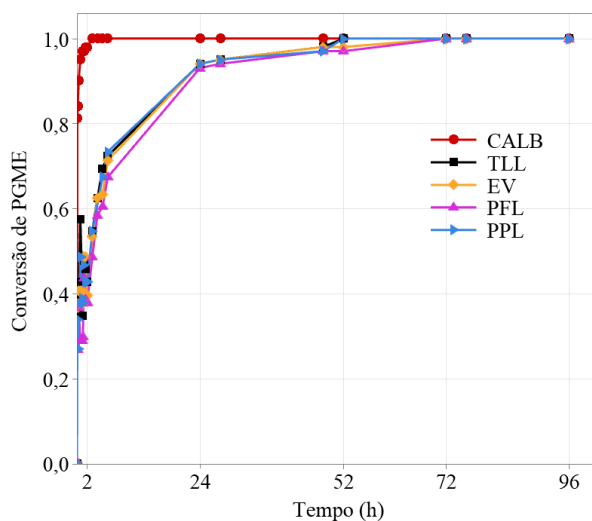
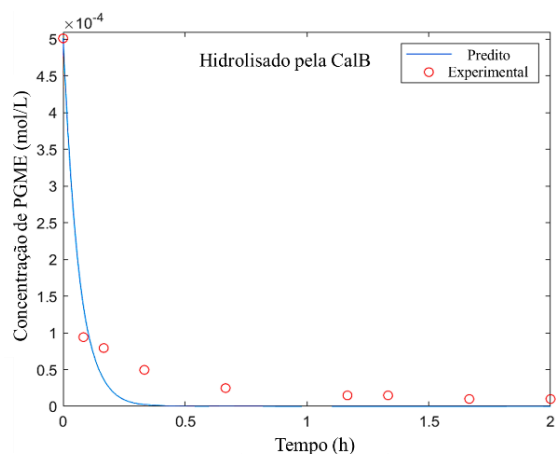
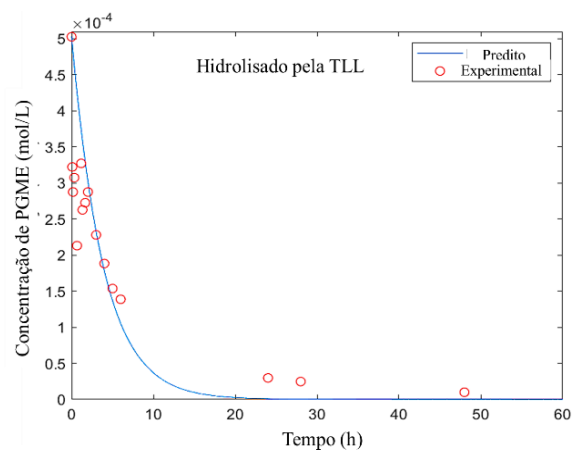


Figura 20 - Perfis de conversão das hidrólises de PGME em PG catalisadas por lipases a 50°C e pH 7,0 em modo batelada. Vermelho: lipase B de *Candida antarctica* (CALB); ciano: lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL); laranja: *Eversa® Transform 2.0* (EV); magenta: lipase de *Pseudomonas Fluorescens* (PFL) e azul: lipase de pâncreas de porco.

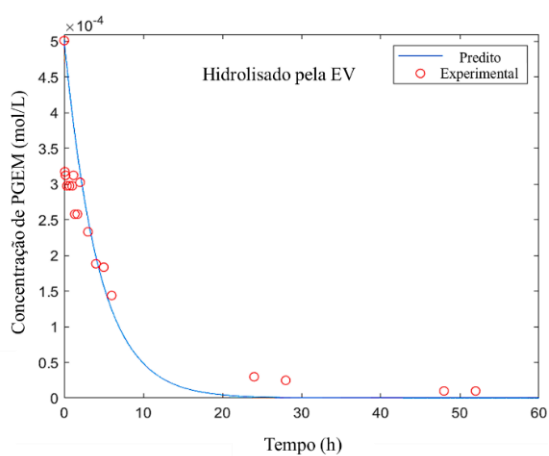
Visando-se obter uma melhor compreensão do desempenho destas lipases na hidrólise do PGME, realizou-se um estudo comparativo dos parâmetros cinéticos V_{max} (taxa máxima de reação) e K_m (constante de Michaelis-Menten) a partir dos mesmos dados experimentais em tampão fosfato de sódio 20 mM e pH 7 a 50 °C. Para estimativa dos parâmetros cinéticos, utilizou-se de regressão não linear com minimização da função objetivo, no qual os dados de concentração do substrato PGME ao longo tempo foram ajustados à solução de uma equação diferencial de Michaelis-Menten. Embora seja mais desafiadora, a ferramenta computacional exibe mais eficiência quando comparado com o método tradicional de ensaio de velocidades iniciais, que utiliza forma linearizada da equação cinética (CHOI; REMPALA; KIM, 2017). Desta maneira, as regressões não lineares, Figura 21, apresentaram bons ajustes dos dados preditos aos dados experimentais, visto que o coeficiente de correlação R^2 calculado foi superior a 0,9 (Tabela 4), em todos os casos.



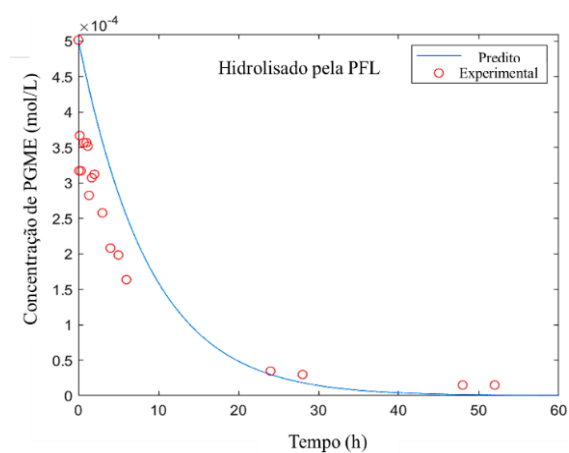
(a)



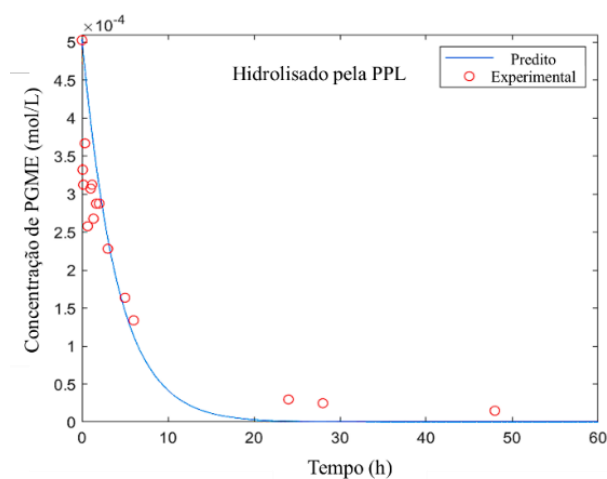
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 21 - Regressões não lineares com ajuste da equação de Michaelis Menten para os dados experimentais de concentração de PGME ao longo da reação de hidrólise catalisada por: (a) CALB, (b) de TLL, (c) EV, (d) PFL e (e) PPL.

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten da hidrólise do éster PGME catalisada pelas diferentes lipases avaliadas, e o valor do coeficiente de correlação da regressão não linear.

Enzimas	V_{\max} (mM/ h)	K_m (mM)	R^2
CALB	61,48	3,67	0,99
TLL	1,57	5,81	0,91
EV	1,66	6,90	0,94
PFL	0,59	4,86	0,96
PPL	1,31	5,09	0,94

De maneira geral, V_{\max} representa a taxa máxima alcançada pelo sistema quando todos os sítios ativos da enzima estão saturados com substrato (toda a enzima está na forma de complexo enzima-substrato), indicando que o aumento indefinido da concentração do substrato não aumenta a taxa de uma reação além do seu ponto máximo, e a constante de Michaelis representa a concentração de substrato na qual $V_{\max}/2$, ou seja, quando metade dos sítios ativos da enzima estão saturado com substrato (DORAN, 2013).

Neste âmbito, e de acordo com a Tabela 4, nota-se que a lipase CALB apresentou maior valor de V_{\max} indicando que esta enzima é mais eficiente dentre as avaliadas para processar o substrato PGME mais rapidamente, o que é evidente dado o tempo significativamente menor de reação (2 horas) para conversão completa do éster em PG. Além disso, a CALB demonstrou maior afinidade pelo substrato, uma vez que apresentou menor valor de K_m frente à hidrólise do éster e, assim, pôde atingir metade da sua taxa máxima de reação em concentrações menores de substrato. As demais lipases (TLL, EV, PFL e PPL) também apresentaram significativo desempenho, dados que os valores do parâmetro de K_m também são baixos e confirmam a afinidade das lipases pelo substrato, apesar de apresentarem menores taxas de reação por unidade de tempo, que está correlacionado com a alta duração da reação entre 48 e 52 horas para conversão completa do éster. O sistema catalisado pela PFL apresentou relativo desvio no ajuste aos dados experimentais, mas, apesar de ligeiramente inferiores, os parâmetros cinéticos seguem a mesma tendência das demais lipases TLL, EV e PPL.

A ativação interfacial de lipases (incluindo TLL, EV, PFL e PPL) envolve normalmente a abertura de uma longa hélice da “tampa”, cobrindo o sítio ativo na ausência de uma interface hidrofóbica. Ao contrário da maioria das lipases, a CALB possui um sítio ativo tipo fenda próximo à superfície da enzima, ademais, não possui uma grande tampa helicoidal cobrindo a entrada do sítio ativo, logo, não exibe uma forte ativação interfacial. Assim, esse caráter interfacial embasa a forte interação com o PGME, pelo fácil acesso do substrato ao sítio ativo (HÖCK *et al.*, 2018). Assim, a confirmação da hidrólise enzimática de PGME fundamenta a possibilidade da seletividade destas lipases em catalisar a reação inversa, esterificação, a qual se apresenta como uma promissora e sustentável rota de produção deste intermediário da produção de antibióticos.

5.5. Técnicas cromatográficas usadas na identificação de PGME sintetizado por rota enzimática

5.5.1. Caracterização via cromatografia líquida

Com o objetivo de identificar PGME produzido pela reação de esterificação catalisada por lipases, utilizou-se a caracterização do éster por cromatografia líquida, a qual foi inicialmente adaptada a partir da metodologia descrita por Wilson *et al.* (2009). Desse modo, as amostras foram eluídas isocriticamente com uma mistura de 70% (v/v) de tampão fosfato 20 mM pH 7,4 e 30% (v/v) de metanol, e detector UV a 214 nm. Os tempos de retenção identificados foram 3,904 e 8,278 minutos para a fenilglicina (PG) e éster metílico de fenilglicina (PGME) respectivamente, para o tempo de análise de 15 minutos em coluna C18.

Para o ensaio **1**, dados da Tabela 5, definiu-se o heptano como solvente (fonte apolar), metanol (razão molar PG:metanol de 1:24) como doador do grupo metila, em conjunto com a adição de 120 µL de KOH 5M, sendo este último utilizado para favorecer a difícil solubilização da PG. Uma vez que o método cromatográfico citado se mostrou apto para identificar e quantificar tais compostos, a técnica foi então aplicada para caracterizar as amostras provenientes desta reação enzimática **1**, 10 mg de PG condicionada a 30 °C e 250 rpm por sete dias. Os resultados do primeiro ensaio demonstraram que em todos os casos, a detecção de éster foi nula por este método, inferindo na não ocorrência da reação de esterificação catalisada pelas lipases (Figura 22).

Tabela 5 - Lipases e cargas enzimáticas (em TBU) usadas na esterificação de PG (ensaio 1) com metanol (razão molar 1:24) a 30°C, 250 rpm, sete dias de reação, em heptano alcalinizado (120 µL de KOH 5 M). Sendo a massa de 10 mg de PG adicionada em 5 mL de solvente.

Amostra	Solvente (5 mL)	Lipase	Volume (mL) ou massa de lipase (g)	Carga (TBU)
r1- 1.1	Heptano	CALB	1 mL	12330,11
r1- 1.2	Heptano	CALB	1 mL	12330,11
r1- 2.1	Heptano	CALB IM	0,011 g	33,72
r1- 2.2	Heptano	CALB IM	0,011 g	33,72
r1- 3.1	Heptano	PFL	0,011g	187,29
r1- 3.2	Heptano	PFL	0,011 g	187,29
r1- 4.1	Heptano	TLL	1 mL	68888,61
r1- 4.2	Heptano	TLL	1 mL	68888,61
r1- 5.1	Heptano	TLL IM	0,011 g	92,08
r1- 5.2	Heptano	TLL IM	0,011 g	92,08
r1- 6.1	Heptano	EV	1 mL	77128,10
r1- 6.2	Heptano	EV	1 mL	77128,10
r1- 7.1	Heptano	PPL	0,011 g	331,78
r1- 7.2	Heptano	PPL	0,011 g	331,78

r1: reação 1.

A concentração do substrato remanescente nas amostras é significativamente elevada (Figura 22a), evidenciada pelas curvas com tempo de retenção média de 3,914 min, diante do padrão comercial de PG (3,904 min), indicado que a massa de PG fornecida ao final do processo é muito próxima à fornecida do começo da reação. Em contrapartida, que as mesmas apresentaram apenas pequenos ruídos na faixa prevista para o padrão de PGME, dado o elevado desvio (média= 8,055 min) com referência ao tempo de retenção do éster (8,278 min) e, portanto, não podem ser utilizados para comprovar a presença do éster nas amostras pós a reação. A carga em TBU/g das lipases livres foi

consideravelmente maior do que a fornecida de lipases imobilizadas em suportes, e apesar disso os meios dispondo-se de enzimas livres também não apresentaram concentrações de éster mensuráveis por este método.

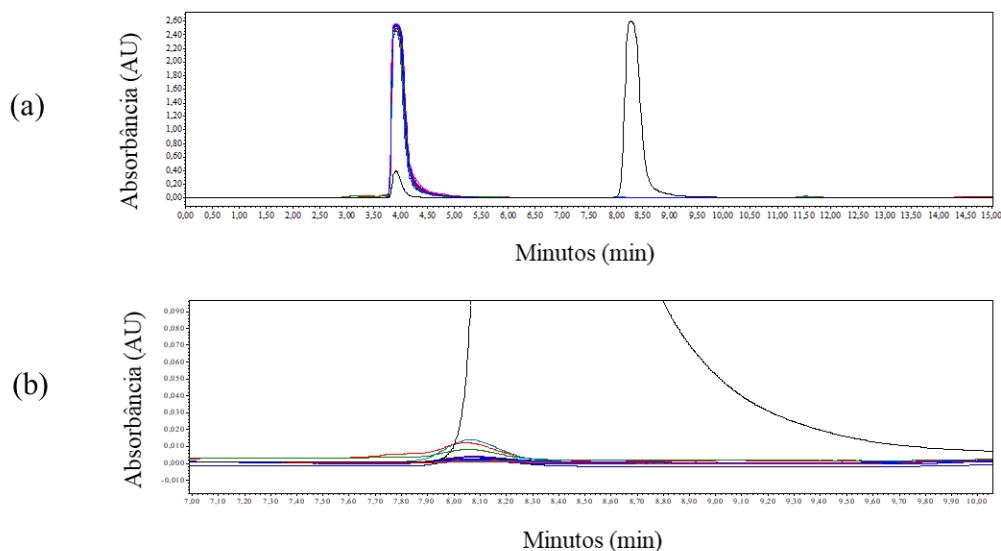


Figura 22 - Cromatograma do (a) padrão comercial de PGME (em preto) sobreposto pelos cromatogramas das amostras reacionais (demais cores); e (b) visão ampliada do item anterior, com destaque para a região prevista com o respectivo tempo de retenção do éster padrão.

O mesmo método foi aplicado novamente para caracterizar, por sua vez, as amostras provenientes da reação enzimática **2** (Tabela 6) com a mesma massa de substrato, realizada a uma temperatura ligeiramente maior (40 °C) a fim de fornecer mais energia para a lipase, condicionada também a 250 rpm por sete dias. Além do heptano, o acetato de metila (solvente polar) também foi utilizado como solvente principal, mantendo-se o metanol (razão molar PG:metanol de 1:24), com ou sem adição de 120 μ L de solução de KOH 5M nos meios reacionais. Ao que se segue, os dados do ensaio **2** também não apresentam concentrações do produto de interesse (Figura 23), apesar da nova condição de temperatura.

Tabela 6 - Lipases e cargas enzimáticas (em TBU) usadas na esterificação de PG (ensaio 2) com metanol (razão molar 1:24) a 40°C, 250 rpm, 7 dias de reação, em diferentes solventes. Uma massa de 10 mg de PG era adicionada em 5 mL de solvente.

Amostra	Solvente (5 mL)	Lipase	Volume (mL) ou massa de lipase (g)	Carga (TBU)	KOH 5M (µL)
r2- BR	Acetato	*	*	*	*
r2- BR	Heptano	*	*	*	*
r2- 1.1	Heptano	EV	0,5 mL	38564,	120
r2- 1.2	Heptano	EV	0,5 mL	38564,	120
r2- 2	Acetato	EV	1 mL	77128,	*
r2- 3	Heptano	EV	1 mL	77128,	*
r2- 4.1	Heptano	CALB	1,755 mL	21639,	120
r2- 4.2	Heptano	CALB	1,755 mL	21639,	120
r2- 5	Acetato	CALB	0,5 mL	6165,0	*
r2- 6	Heptano	CALB	2 mL	24660,	*
r2- 7.1	Heptano	TLL	1 mL	68888,	120
r2- 7.2	Heptano	TLL	2 mL	137777	120
r2- 8	Acetato	TLL	1,305 mL	89899,	*
r2- 9	Heptano	TLL	1,305 mL	89899,	*
r2 10	Acetato	PPL	0,2128 g	6418,5	*
r2- 11	Heptano	PPL	0,21283 g	6419,4	*

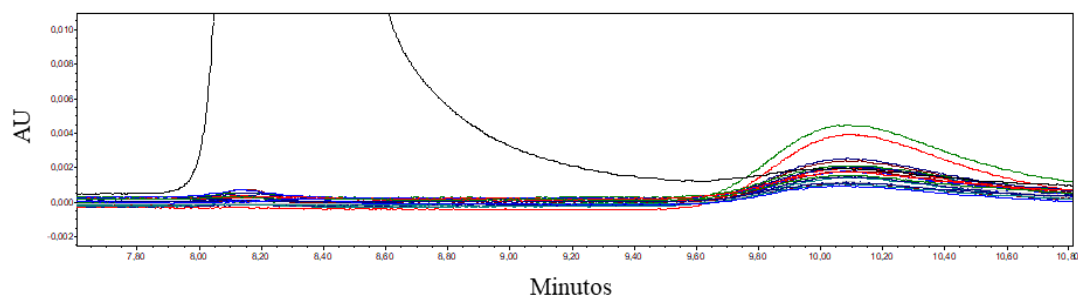


Figura 23 - Visualização ampla para a região e tempo de retenção prevista para o éster padrão em preto, e as amostras do ensaio 2 em demais cores.

Em acréscimo, realizou-se um ensaio **3** com os padrões de PG e PGME, com a finalidade de observar se a temperatura de secagem é um potencial interferente, nas condições testadas, no sentido de promover hidrólise enzimática ou química. Para isso, utilizou-se a metodologia desenvolvida de cromatografia líquida em coluna Waters Xbridge BEH Phenyl e fase móvel “A” formada por 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água Milli-Q e o eluente “B” formado por 0,1% (v/v) de ácido fórmico em metanol. Os tempos de retenção identificados foram 3,604 e 7,203 minutos para a PG e PGME respectivamente, para o tempo de análise de 15 minutos.

Amostras de PG e PGME (10 mg) foram submetidas à secagem (30°C por 24 horas) em meios similares aos de reação na presença da lipase TLL (Tabela 7). Observa-se que as amostras **I-s1** a **I-s6** (Tabela 7), contendo individualmente 10 mg de PG, apresentaram apenas pequenas perdas associadas ao manuseio, enquanto não houve síntese de éster, ainda que em meios na presença da lipase TLL (**I-s4** a **I-6**). Uma massa de 10 mg de PGME foi utilizada nos ensaios de secagem (ensaios **I-s7** a **I-s12**), e no qual se verificou hidrólise alcalina do PGME (ensaio **I-s7**), com consumo de aproximadamente 13,1% da massa do éster. Em **I-s10**, o consumo de éster foi fortemente promovido pela associação entre hidrólise enzimática catalisada pela lipase e hidrólise alcalina pela base forte que resultaram em conversão de PGME em PG acima de 96% durante 24 horas de secagem a 30 °C. Em **I-s11** e **I-s12** observou-se hidrólise de PGME, porém em menor quantidade, devido à baixa quantidade de água na formulação da lipase líquida.

Na segunda etapa do ensaio (**II**), adotou-se uma temperatura de secagem maior, de 70 °C e menor duração (12 horas) para remoção completa dos solventes, e cujos dados são apresentados na Tabela 8. Nos ensaios **II-s1** a **II-s6** não foram observadas perdas de PG e nem detecção de PGME, mesmo em meios na presença de lipase (**II-s5** e **II-s6**). Nos ensaios de secagem do PGME, nas mesmas condições acima, observaram perdas de massa expressivas em meio alcalinizado sem ou com lipase (76,08% e 99,02%), ensaios **II-s8** e **II-s12**, respectivamente) e menos expressivas na presença somente de lipase, sem adição de base (22-30%, **II-s13** e **II-s14**).

Com base nos resultados de secagem apresentados, constata-se que a presença de água, mesmo em baixas concentrações, é altamente prejudicial se a reação de esterificação é desejada. Constata-se que a reação alvo (esterificação de PG em PGME) deve ser conduzida na ausência de água ou em baixíssimas concentrações para evitar a reação inversa (hidrólise). Então, ainda que o PGME seja sintetizado pela reação de

esterificação, existe uma maior seletividade da lipase pela sua reação inversa, sobretudo em temperaturas mais elevadas. Além disso, pode-se confirmar que ambos compostos, nos solventes orgânicos avaliados, mantêm sua integridade mediante temperaturas de secagem relativamente altas, sem degradação por aquecimento.

Tabela 7 - Dados de secagem realizada a 30 °C e 24 h no ensaio 3 (etapa I), para avaliação de ocorrência de degradação dos padrões PG e PGME, ou hidrólise indesejada.

Amostras PG	Solvente	Sigla da lipase	Enzima (mL)	TBU	KOH 5M	Consumo PG (%)	Produção PGME (%)
I-s1	Heptano	*	*	*	120 μ L	4,902	0
I-s2	Heptano	*	*	*	*	0	0
I-s3	Acetato	*	*	*	*	0	0
I-s4	Heptano	TLL	0,5 mL	34444,31	120 μ L	3,214	0
I-s5	Heptano	TLL	0,5 mL	34444,31	*	5,301	0
I-s6	Acetato	TLL	0,5 mL	34444,31	*	6,704	0
Amostras PGME						Consumo PGME (%)	Produção PG (%)
I-s7	Heptano	*	*	*	120 μ L	13,198	22,412
I-s8	Heptano	*	*	*	*	0	0
I-s9	Acetato	*	*	*	*	0	0
I-s10	Heptano	CALB	0,5 mL	6165,06	120 μ L	98,020	96,419
I-s11	Heptano	CALB	0,5 mL	6165,06	*	7,534	9,089
I-s12	Acetato	CALB	0,5 mL	6165,06	*	2,826	3,923

Tabela 8 - Dados de secagem realizada a 70 °C e 12 h no ensaio 3 (etapa II), para avaliação de ocorrência de degradação dos padrões PG e PGME, ou hidrólise indesejada.

Amostras PG	Solvente	Sigla da lipase	Enzima (mL)	TBU	KOH 5M	Consumo PG (%)	Produção PGME (%)
II-s1	Heptano	*	*	*	120 µL	8,711	0
II-s2	Acetato	*	*	*	*	0	0
II-s3	Heptano	*	*	*	*	8,008	0
II-s4	Heptano	*	*	*	*	3,663	0
II-s5	Heptano	TLL	0,5 mL	34444,31	120 µL	7,719	0
II-s6	Heptano	TLL	0,5 mL	34444,31	*	0	0
Amostras PGME						Consumo PGME (%)	Produção PG (%)
II-s8	Heptano	*	*	*	120 µL	76,0766	31,9143
II-s9	Heptano	*	*	*	*	0	0
II-s10	Acetato	*	*	*	*	0	0
II-s11	Heptano	*	*	*	*	0	0
II-s12	Heptano	CALB	0,5 mL	6165,06	120 µL	99,021	92,758
II-s13	Heptano	CALB	0,5 mL	6165,06	*	22,037	5,266
II-s14	Acetato	CALB	0,5 mL	6165,06	*	30,331	3,927

A metodologia de cromatografia líquida em coluna Waters Xbridge BEH Phenyl foi novamente utilizada, desta vez para o ensaio 4 (Tabela 9), o qual se difere dos experimentos anteriores pela utilização do líquido iônico prótico 2-HDEAL com a mesma massa de substrato (10 mg), realizado na temperatura de 40 °C, agitação de 250 rpm por sete dias. Acetato de metila foi utilizado como solvente principal em todos os meios reacionais, mantendo-se metanol com principal doador acil, com adição de 100 mg KOH 85 %. Os cromatogramas mostraram que a coluna utilizada não forneceu separação adequada dos analitos do ensaio 4, devido à co-eluição do cossolvente 2-HDEAL na região prevista para o padrão de PGME, assim como os ruídos produzidos apresentaram tempo de retenção muito distinto do tempo de retenção do padrão (7,421 minutos), como

visto na Figura 24. Logo, o resultado deste método foi inconclusivo, influenciado pela presença do líquido iônico, tornando necessária a busca por um método adequado para separar os analitos de interesse, permitindo identificar se houve ou não síntese do éster na presença de líquido iônico.

Tabela 9 - Lipases e cargas enzimáticas (em TBU) usadas na esterificação de PG (ensaio 4) com metanol (razão molar 1:24) a 40 °C, 250 rpm, 7 dias de reação, em diferentes solventes combinado com o cossolvente 2-HDEAL. Uma massa de 10 mg de PG era adicionada em 5 mL de solvente.

Amostra	Solvente (5 mL)	Lipase	Volume (mL) ou massa de lipase (g)	Carga (TBU)	KOH (g)	2-HDEAL (μL)
r4- 1.1	Acetato	CALB	1 mL	12330,11	0,102	100
r4- 1.2	Acetato	CALB	1 mL	12330,11	0,102	100
r4- 2	Acetato	CALB	0,011 g	33,72	0,102	100
r4- 3	Acetato	EV	1 mL	77128,10	*	100
r4- 4.1	Acetato	TLL	1 mL	68888,61	0,102	100
r4- 4.2	Acetato	TLL IM	0,011 g	92,08	0,102	100

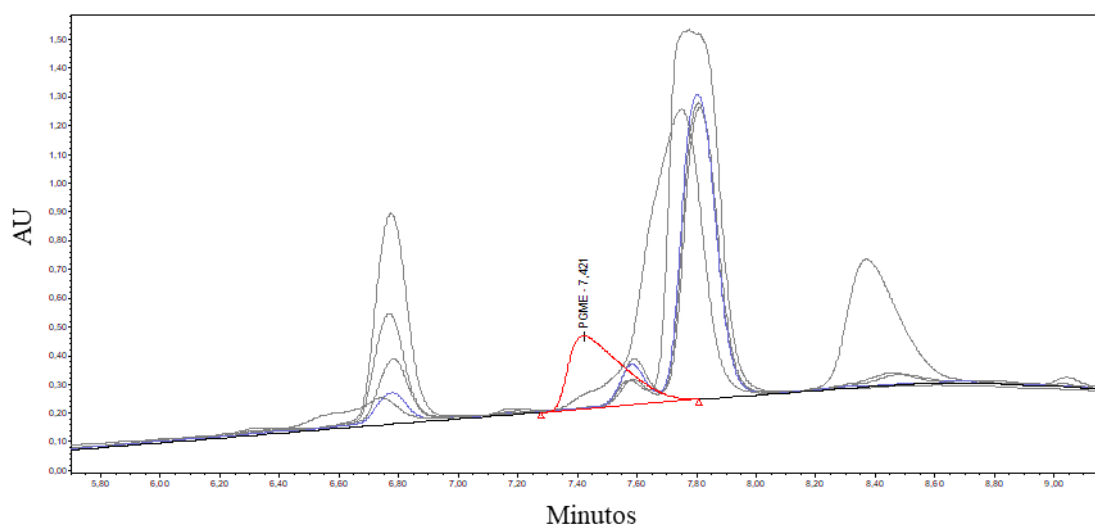
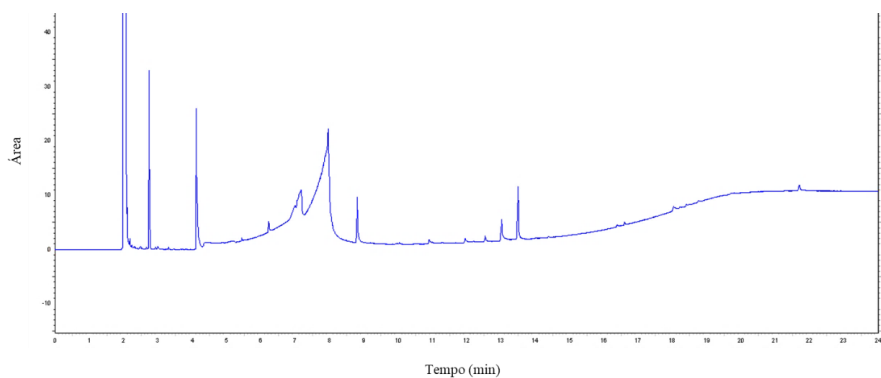


Figura 24 - Cromatograma do padrão comercial de PGME (vermelho) sobreposto pelos cromatogramas das amostras reacionais com líquido iônico (todos em cinza).

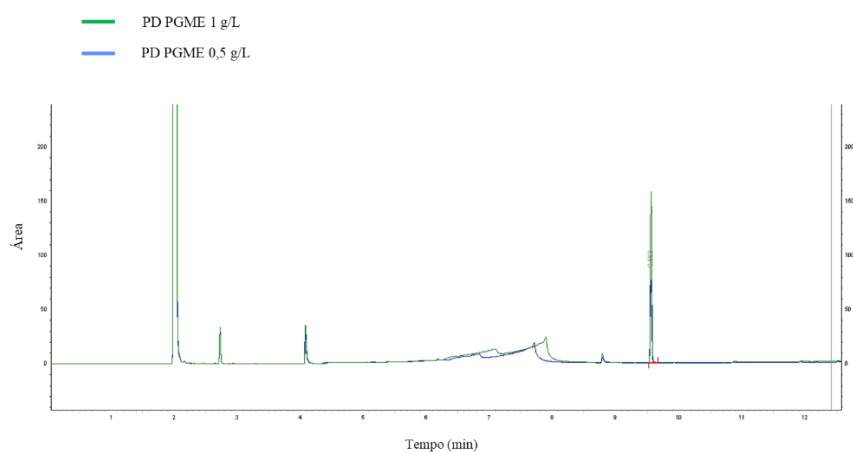
5.5.2. Caracterização via cromatografia gasosa

Várias metodologias já foram relatadas para caracterização de PGME e análise da composição da mistura com o mesmo. Em geral, essas metodologias são baseadas em cromatografia líquida (HPLC) utilizando mais especificamente detector ultravioleta (UV) (LOU *et al.*, 2006b; WILSON *et al.*, 2009), conforme visto anteriormente no presente estudo. Apesar da cromatografia gasosa (GC) possuir um campo de aplicação muito amplo, são escassas as pesquisas na literatura que exploram esta técnica na caracterização do éster metílico de fenilglicina. De maneira geral, com o uso do detector de ionização de chama e do detector de captura de elétrons, a cromatografia gasosa pode determinar quantitativamente materiais presentes em concentrações baixas (FAUZI; HAMEED; KADHIM, 2017). Logo, devido à sua simplicidade, sensibilidade e eficácia na separação de componentes de misturas, este método foi estudado para identificar e quantificar o padrão de PGME, assim como amostras obtidas pelas reações enzimáticas. Para isto, utilizou-se o cromatógrafo gasoso 7890A da Agilent Technologies, equipado com um detector de ionização a chama (FID) e coluna HP-5 (5%-fenil-metilpolissiloxano). Uma vez que o enfoque foi a caracterização do PGME, apenas o padrão do éster foi preparado nas concentrações de 0,5 e 1,0 g/L no solvente 2-propanol, como também 0,5 g/L em 2-propanol e 100 μ L de 2-HDEAL para analisar se o tempo de retenção se alterava na presença líquido iônico.

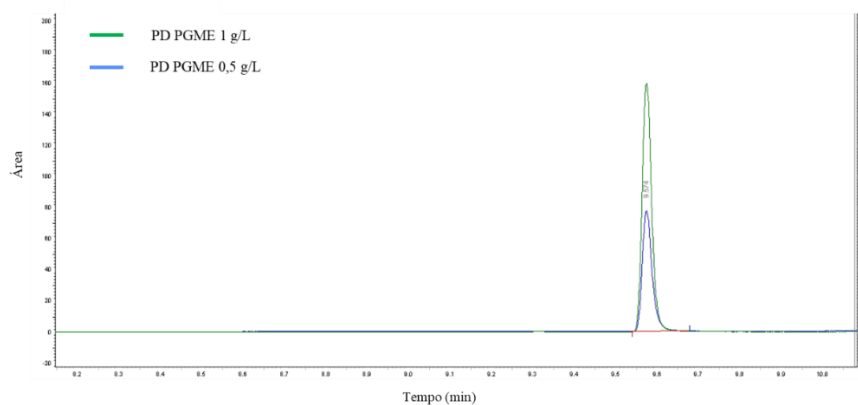
O método implementado para GC em coluna HP-5 foi avaliado pela sua capacidade de separação do padrão e líquido iônico, que anteriormente não pôde ser alcançada em coluna de cromatografia líquida. Logo, o método de GC foi projetado com o intuito de determinar uma alternativa para caracterizar o PGME, sobretudo nas condições presentes, como também realizar a busca de teores do éster nas amostras do ensaio 5 que passaram pela reação enzimática na presença de líquido iônico 2-HDEAL. Verifica-se na Figura 25 que a separação dos analitos na coluna foi eficaz, uma vez que não houve problema de co-eluição entre o líquido iônico em 2-propanol (Figura 25a) e o éster nas concentrações de 0,5 e 1 g/L preparadas em 2-propanol e 2-HDEAL (Figura 25b) e, em complemento, notou-se que o tempo de retenção do PGME (9,574 min) se manteve estável nas duas concentrações injetadas, cuja curva gaussiana varia de maneira proporcional com a concentração do padrão.



(a)



(b)



(c)

Figura 25 - Cromatograma de GC: a) Líquido iônico 2-HDEAL em 2-propanol, b) PGME nas concentrações de 0,5 e 1 g/L (preparadas em 2-propanol e 2-HDEAL), em azul e verde respectivamente, c) visualização ampliada das curvas de éster no tempo de retenção de 9,574 minutos.

O novo método foi então aplicado para caracterizar as amostras provenientes da reação enzimática **5** (Tabela 10) com a mesma massa de substrato, realizada na

temperatura de 40 °C, a 250 rpm por sete dias, explorando por sua vez o líquido iônico e a solução de ácido HCl 0,5 M como alternativas mais promissoras, dentre as estudadas, para favorecer a difícil solubilização do substrato e então possibilitar a síntese do éster pela catálise das lipases. O acetato de metila foi utilizado como solvente principal apenas nos meios reacionais que utilizaram metanol como doador acil 1:24 (**r5- 1.1, 2.1, 3.1, 4.2, 5.1 e 6.1**), pois as lipases são facilmente inativadas na presença deste álcool que, portanto, não deve ser predominante no meio, enquanto que álcoois de cadeias mais longas (etanol, propanol e butanol) foram utilizados como solventes e doadores acil em substituição ao metanol, com adições de 17 µL de HCl 0,5 M e 100 µL de 2-HDEAL. O diferencial deste experimento também se fundamenta na escolha apenas das lipases comerciais imobilizadas, a fim de se evitar a adição de água no meio reacional presente nas formulações líquidas de lipases.

Apesar disso, também não foi possível detectar concentrações do produto de interesse no tempo de retenção do padrão (9,574 min), enquanto os meios reacionais com os álcoois de cadeias mais longas não puderam ser analisados com precisão pela falta do padrão de éster constituído por grupos etílicos, propílicos ou butílicos. Logo, os resultados obtidos por método mais tradicionais não detectaram teores de PGME sintetizado pela reação enzimática, demandando então uso de técnicas de caracterização com maior poder de identificação e maior sensibilidade.

Tabela 10 - Lipases e cargas enzimáticas (em TBU) usadas na esterificação de PG (ensaio 5) com metanol (razão molar 1:24) a 40°C, 250 rpm, 7 dias de reação, em diferentes solventes combinado com o cossolvente 2-HDEAL. Uma massa de 10 mg de PG era adicionada em 5 mL de solvente.

Amostra	Solvente (5 mL)	Lipase	Massa de lipase (g)	Carga (TBU)	HCL 0,5 M (µl)	2-HDEAL (µL)
r5- 1.1	Acetato	TLL IM	0,024	200,89	*	*
r5- 1.2	Etanol	TLL IM	0,024	200,89	*	*
r5- 1.3	Propanol	TLL IM	0,024	200,89	*	*
r5- 1.4	Butanol	TLL IM	0,024	200,89	*	*
r5- 2.1	Acetato	TLL IM	0,024	200,89	17	*
r5- 2.2	Etanol	TLL IM	0,024	200,89	17	*
r5- 2.3	Propanol	TLL IM	0,024	200,89	17	*
r5- 2.4	Butanol	TLL IM	0,024	200,89	17	*
r5- 3.1	Acetato	TLL IM	0,024	200,89	*	100
r5- 3.2	Etanol	TLL IM	0,024	200,89	*	100
r5- 3.3	Propanol	TLL IM	0,024	200,89	*	100
r5- 3.4	Butanol	TLL IM	0,024	200,89	*	100
r5- 4.1	Acetato	CALB	0,066	202,35	*	*
r5- 4.2	Etanol	CALB	0,066	202,35	*	*
r5- 4.3	Propanol	CALB	0,066	202,35	*	*
r5- 4.4	Butanol	CALB	0,066	202,35	*	*
r5- 5.1	Acetato	CALB	0,066	202,35	17	*
r5- 5.2	Etanol	CALB	0,066	202,35	17	*
r5- 5.3	Propanol	CALB	0,066	202,35	17	*
r5- 5.4	Butanol	CALB	0,066	202,35	17	*
r5- 6.1	Acetato	CALB	0,066	202,35	*	100
r5- 6.2	Etanol	CALB	0,066	202,35	*	100
r5- 6.3	Propanol	CALB	0,066	202,35	*	100
r5- 6.4	Butanol	CALB	0,066	202,35	*	100

5.5.3. Identificação de PGME por LC/MS

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é uma técnica analítica poderosa usada para separação, identificação e quantificação de compostos e, por estas razões, foi selecionada para analisar as amostras provenientes do ensaio **2** dado que o método oferece maior sensibilidade e seletividade na análise de traços de substâncias em comparação ao HPLC e GC (MUKHERJEE, 2019), uma vez que estes últimos demonstraram ser inábeis em identificar PGME nos meios de produção deste por esterificação enzimática de PG com metanol.

A Figura 26 apresenta os cromatogramas dos meios reacionais (“brancos”) na ausência do biocatalizador, preparados com a finalidade de avaliar se a possível síntese do éster está relacionada apenas com a catálise das lipases. Conforme visto em seções anteriores, a PG é predominantemente insolúvel nestes solventes sem a presença de base ou cossolvente e apesar disso o método atestou concentrações de PGME, os quais foram desconsiderados como válidos e adotados então como valores de corte para eliminar amostras com resultados falso-positivos. Tais concentrações foram desconsideradas visto que pode haver contaminação por éster na formulação de PG 99%, assim como a esterificação de aminoácidos somente é possível em um processo catalisado por ácidos fortes (por exemplo o ácido sulfúrico) e sob elevado aquecimento na presença de um álcool (MOODY, 2011), ou então a via catalisada por lipases que está sendo investigada.

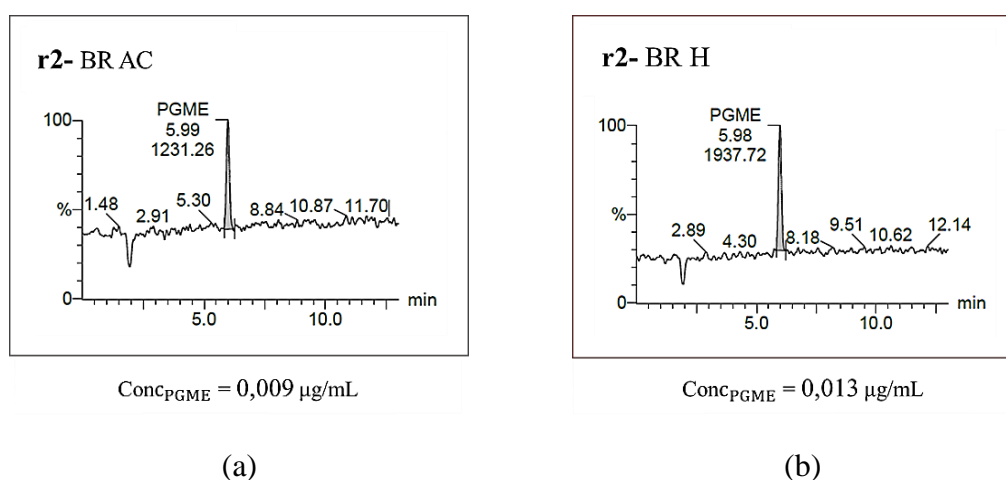


Figura 26 - Cromatograma LC-MS de amostras dos meios reacionais, na ausência de lipase: (a) Branco (Br) de PG em apenas metanol e acetato (AC), (b) Branco de PG em apenas metanol e heptano (H).

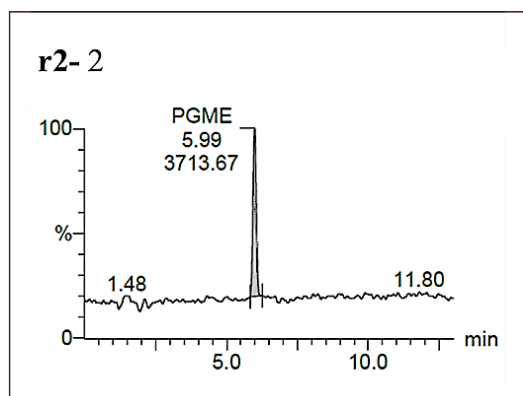
As concentrações de PGME em $\mu\text{g/mL}$ determinadas pelo LC/MS para os “brancos” e demais amostras são apresentados na Tabela 11, com destaque para as concentrações consideradas relevantes devido aos valores ligeiramente superiores aos das amostras sem catalizador.

A partir do LC/MS pôde-se quantificar as concentrações de PGME para as reações catalisadas pela lipase EV (Figura 27a), CALB (Figura 27b), TLL em KOH (Figura 27c) e TLL (Figura 27d), cuja esterificação de PG foi investigada em acetato de metila ou heptano com e sem adição de KOH, não sendo realizadas análises dos demais ensaios com adição de ácido ou líquido iônico em virtude da falta de disponibilidade técnica do equipamento necessário. Apesar da baixíssima solubilidade da PG em acetato, comprovou-se a síntese do éster em todos os meios catalisados pelas lipases citadas (amostras **r2- 2, 5 e 8**). Todavia, as conversões de PG em PGME são extremamente baixas e não ultrapassam 0,1 %. Como esperado, os meios alcalinos renderam menores rendimentos comparáveis aos dados das amostras sem catalizador (“brancos”), o que está associado à desvantagem em haver adição de mais conteúdo aquoso, que favorece a reação inversa de hidrólise.

Tabela 11 - Concentrações de PGME determinadas pelo LC/MS para as amostras do ensaio 2.

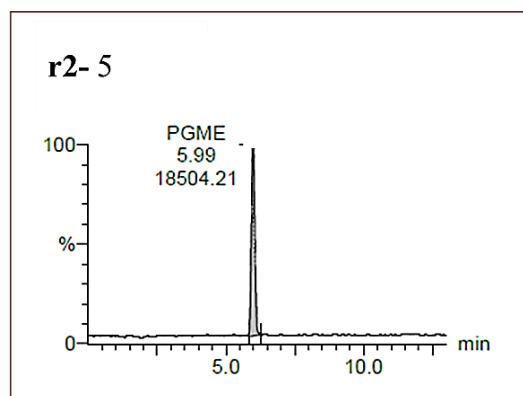
Amostra	Conc PGME ($\mu\text{g/ml}$)
r2 BR AC	0,009
r2 BR H	0,013
r2- 1.1	0,004
r2- 1.2	0,017
r2- 2	<u>0,024</u>
r2- 3	0,007
r2- 4.1	0,017
r2- 4.2	0,012
r2- 5	<u>0,116</u>
r2- 6	0
r2- 7.1	0,015
r2- 7.2	<u>0,020</u>

r2- 8	<u>0,079</u>
r2- 9	0,007
r2 10	0,006
r2- 11	0,008



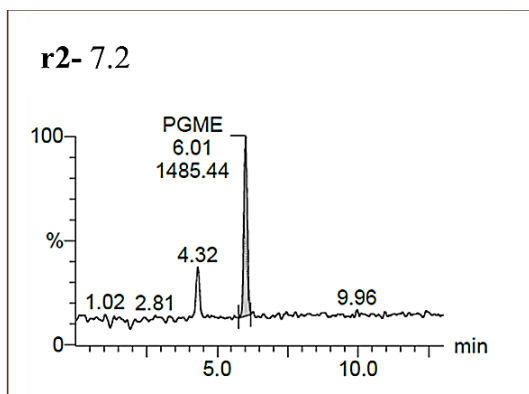
Conc_{PGME} = 0,024 µg/mL

(a)



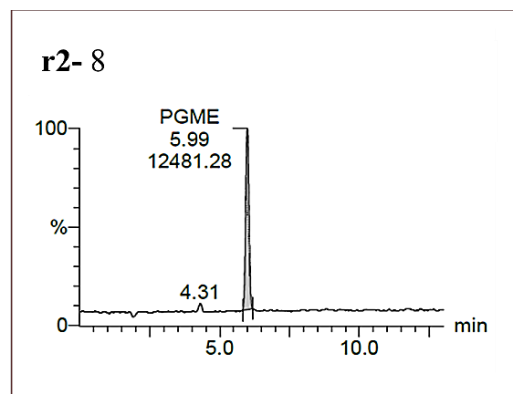
Conc_{PGME} = 0,116 µg/mL

(b)



Conc_{PGME} = 0,020 µg/mL

(c)



Conc_{PGME} = 0,079 µg/mL

(d)

Figura 27 - Cromatograma LC-MS de amostras dos meios reacionais, na presença de lipase: (a) EV em acetato de metila; b) CALB em acetato de metila; c) TLL em heptano e KOH d) TLL em acetato de metila. Todas submetidas a uma reação a 40°C, sob 250 rpm e sete dias de reação, massa de 10 mg de PG adicionada em 5 mL de solvente.

Nota-se que de modo geral a lipase CALB apresentou desempenho ligeiramente superior ao da lipase TLL e, sobretudo, da EV, informação que complementa o estudo de hidrólise em que se constatou o potencial da CALB em catalisar a reação de esterificação. Em complemento, os dados obtidos sugerem melhores taxas de produção de PGME quando o acetato de metila é adotado como solvente principal, o qual possui maior polaridade em comparação ao heptano, além de ser vantajoso por caracterizar-se como substrato na produção de PGME por uma reação de acidólise entre o éster da estrutura do acetato de metila e o grupo ácido carboxílico presente na PG.

Ao contrário de outras propriedades comuns, cada lipase exibe uma seletividade para diferentes substratos a depender da interação dos substratos com a bolsa acila (MOHARANA; RAO, 2020). A bolsa de ligação das lipases é caracterizada por um sítio hidrofóbico, que permanece coberto pelo domínio móvel “tampa” na ausência de uma interface lipídio-água, resultando em um rearranjo da conformação da enzima que torna o sítio catalítico inacessível ao substrato (SARMAH *et al.*, 2018). Assim, é possível inferir que a baixa afinidade das lipases pelo substrato PG e, conseqüentemente baixa seletividade pela esterificação, são afetadas sobretudo pela alta polaridade, seu coeficiente de partição ($\log P$) (coeficiente hidrofóbico/hidrófilo) e suas propriedades físico-química particulares que caracterizam os AA's (ZBINDEN *et al.*, 2005) que dificultam a adsorção da PG no sítio ativo hidrofóbico e tornam a síntese do éster pouco viável, confirmado pelas baixas concentrações determinadas pelo LC/MS.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES FUTURAS

6.1. Conclusões

Os solventes heptano e acetato de metila não se mostraram eficientes na solubilização de PG, sendo necessária a adição de solução ácida de HCl 0,5 M ou líquido iônico em acetato de metila para haver ligeira melhora. Portanto, a solubilidade da PG mostrou-se como um grande gargalo, e um fator desfavorável para a interação das lipases e o substrato PG.

A espectroscopia UV-Vis confirmou a propriedade de absorbância da PG na região do UV, da mesma forma que o seu derivado PGME, necessário para confirmar o comprimento de onda a ser adotado na técnica de caracterização via HPLC que se utiliza do detector UV.

Um novo método de cromatografia gasosa foi implementado com eficácia para separar e caracterizar o PGME, cuja possibilidade é pouco explorada na literatura, sobretudo em solução com líquido iônico que pode atuar como interferente a depender da técnica escolhida.

As lipases CALB, TLL, EV, PFL e PPL apresentaram excelente atividade de hidrólise do éster PGME, convertendo-o totalmente em PG em todas bateladas. Todas as lipases avaliadas exibiram favoráveis taxas de reação (V_{max}) e coeficientes de Michaelis-Menten (K_m) que comprovam eficiência destas enzimas em catalisar a reação, bem como elevada afinidade pelo substrato PGME, dentre as quais a lipase B de *Candida antarctica* se sobressai pelo menor tempo de reação e melhores valores de parâmetros cinéticos.

Quanto à reação de esterificação, foi revelado o promissor potencial das lipases CALB, TLL e EV em catalisar a síntese do éster de interesse, principalmente a CALB em solvente acetato de metila que apresentou relativo melhor desempenho em termos de conversões de PG em PGME, ainda que a reação tenha ocorrido em condições de baixa solubilidade do reagente. Entretanto, a síntese do éster catalisado por lipases ainda não se mostra viável, dentro das condições testadas, evidenciado pelas baixíssimas concentrações de PGME detectadas somente pela técnica LC/MS, que diferentemente da cromatografia convencional é sensível a traços de compostos, até mesmo na escala de microgramas/mL. A baixa atividade das lipases na esterificação da PG deve-se a sua baixa afinidade por esse substrato, em consequência, sobretudo, das propriedades químicas deste aminoácido que interferem em sua solubilidade nos solventes e adsorção no sítio

hidrofóbico das lipases. Mediante à escassez de relatos de produção do PGME catalisada por lipases, o presente estudo fornece informações valiosas para contribuir para um avanço do conhecimento nesta área.

6.2. Sugestões Futuras

Tendo-se por base os resultados obtidos nas etapas experimentais e a correlação com a literatura, verifica-se que o estudo realizado se caracteriza como um ponto de partida para a pesquisa de síntese enzimática do PGME, havendo espaços para explorar o tema.

Assim, tem-se as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliar o desempenho de outras enzimas comerciais de menores custos para a hidrólise de éster metílico de fenilglicina;
- Validar as metodologias de Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida Acoplada ao à Espectrometria de Massas para determinação de PGME;
- Testar o bloqueio químico do grupo amino na estrutura da fenilglicina a fim de torna-la muito mais solúvel em solvente orgânico com baixa atividade de água;
- Avaliar uma maior gama de líquidos iônicos para a solubilização da PG e reação de esterificação desta catalisada por lipases;
- Busca por solventes seguros e/ou solventes ecológicos para substituir o metanol na produção do éster;
- Purificação/separação do éster sintetizado a partir da esterificação enzimática.

7. REFERÊNCIAS

ABE, H.; YOSHIKAWA, N.; SAROWER, G.; OKADA, S. Physiological Function and Metabolism of Free D-Alanine in Aquatic Animals. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, p. 1571–1577, 1 out. 2005.

ADETUNJI, A. I.; OLANIRAN, A. O. Production Strategies and Biotechnological Relevance of Microbial Lipases: A Review. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 52, n. 3, p. 1257–1269, set. 2021.

AHMAD, E.; FATIMA, S.; KHAN, M. M.; KHAN, R. H. More stable structure of wheat germ lipase at low pH than its native state. **Biochimie**, v. 92, n. 7, p. 885–893, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908410001343>>.

AHMADINEJAD, N.; TALEBI TRAI, M. Computational NQR–NBO Parameters and DFT Calculations of Ampicillin and Zwitterion (Monomer and Dimer Structures). **Chemical Methodologies**, v. 3, n. 1, p. 55–66, 2019.

AL TOMA, R. S.; BRIEKE, C.; CRYLE, M. J.; SÜSSMUTH, R. D. Structural Aspects of Phenylglycines, Their Biosynthesis and Occurrence in Peptide Natural Products. **Natural product reports**, v. 32, n. 8, p. 1207–1235, ago. 2015.

ALBAYATI, S. H.; MASOMIAN, M.; ISHAK, S. N.; MOHAMAD ALI, M. S.; THEAN, A. L.; MOHD SHARIFF, F. B.; MUHD NOOR, N. D.; RAJA ABD RAHMAN, R. N. **Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity Catalysts** 2020.

ANOBOM, C. D.; PINHEIRO, A. S.; DE-ANDRADE, R. A.; AGUIEIRAS, E. C. G.; ANDRADE, G. C.; MOURA, M. V; ALMEIDA, R. V; FREIRE, D. M. From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 684506, 2014.

BARROS, S.; ANDRADE, R.; IGLESIAS, M. Effect of temperature on thermodynamic properties of protic ionic liquids: 2-Hydroxy Ethylammonium Lactate (2-HEAL) + Short hydroxylic solvent. **International Journal of Thermodynamics**, v. 21, p. 70–80, 30 maio 2018.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 2, p. 133–153, 1 fev. 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1438-9312\(200002\)102:2<133::AID-EJLT133>3.0.CO](https://doi.org/10.1002/(SICI)1438-9312(200002)102:2<133::AID-EJLT133>3.0.CO)>.

BEN SALAH, A.; SAYARI, A.; VERGER, R.; GARGOURI, Y. Kinetic studies of *Rhizopus oryzae* lipase using monomolecular film technique. **Biochimie**, v. 83, n. 6, p. 463–469, 2001.

BERGER, M.; SCHNEIDER, M. P. Lipases in organic solvents: The fatty acid chain length profile. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 9, p. 641–645, 1991.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101368, 2019.

BIELÉN, A.; ŠIMATOVIĆ, A.; KOSIĆ-VUKŠIĆ, J.; SENTA, I.; AHEL, M.; BABIĆ, S.; JURINA, T.; GONZÁLEZ PLAZA, J. J.; MILAKOVIĆ, M.; UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N. Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. **Water Research**, v. 126, p. 79–87, 2017.

BISCHOFF R; SCHLÜTER H. Amino acids: chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. **J Proteomics.**, v. 18, n. 75(8):2275-96, 2012.

BORRELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774–20840, set. 2015.

BRUGGINK, A.; ROOS, E.; DE VROOM, E. Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. **Organic Process Research & Development - ORG PROCESS RES DEV**, v. 2, 28 fev. 1998.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 8, ago. 2016.

CAMARGO, D.; ANDRADE, R.; FERREIRA, G.; MAZZER, H.; FILHO, L.; IGLESIAS, M. Investigation of the rheological properties of protic ionic liquids. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 29, p. n/a-n/a, 1 mar. 2016.

CAO, X.; MANGAS-SÁNCHEZ, J.; FENG, F.; ADLERCREUTZ, P. Acyl migration in enzymatic interesterification of triacylglycerols: Effects of lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizopus oryzae*, support material, and water activity. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 10, p. 1579–1587, 1 out. 2016.

CASAS-GODOY, L.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; SANDOVAL, G.; MARTY, A. Lipases: An Overview. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 861, p. 3–30, 2012.

CHOI, B.; REMPALA, G. A.; KIM, J. K. Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17018, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17072-z>>.

CLEMENTE-JIMÉNEZ, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; RODRÍGUEZ-VICO, F.; HERAS-VÁZQUEZ, F. J. L. Optically Pure Alpha-Amino Acids Production by the “Hydantoinase Process”. **Recent patents on biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 35–46, 2008.

COBOS-PUC, L.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; CANO-CABRERA, J. C.; AGUAYO-MORALES, H.; SILVA-BELMARES, S. Y.; GALLEGOS, A. C. F.; HERNÁNDEZ, J. L. M. Classical and New Pharmaceutical Uses of Bacterial Penicillin G Acylase. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 287–297, 2020.

COHN, E. J.; EDSALL, J. T. **Proteins, Amino Acids, and Peptides**. [s.l: s.n.]

CRUZ C; CIACH A. Phase Transitions and Electrochemical Properties of Ionic Liquids and Ionic Liquid—Solvent Mixtures. **Molecules**, v. 26, n. 12:3668, 2021.

DEMIRCI, S.; DEMIRBAS, A.; ULKER, S.; ALPAY-KARAOGLU, S.; DEMIRBAS, N. Synthesis of Some Heterofunctionalized Penicillanic Acid Derivatives and Investigation of Their Biological Activities. **Archiv der Pharmazie**, v. 347, n. 3, p. 200–220, 1 mar. 2014.

DENG, S.; MA, X.; SUN, M.; WEI, D.; SU, E. Efficient enzymatic synthesis of ampicillin using mutant Penicillin G acylase with bio-based solvent glycerol. **Catalysis Communications**, v. 79, p. 31–34, 2016.

DENIS, J. N.; CORREA, A.; GREENE, A. E. Direct, highly efficient synthesis from (S)-(+)-phenylglycine of the taxol and taxotere side chains. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 6939–6942, 1 nov. 1991.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial Use of Immobilized Enzymes. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437–6474, ago. 2013.

DOI, Y.; CHAMBERS, H. F. 20 - Penicillins and β -Lactamase Inhibitors. *Em*: BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER DOUGLAS, AND BENNETT'S PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFECTIOUS DISEASES (EIGHTH EDITION), M. J. B. T.-M. Philadelphia: W.B. Saunders, 2015. p. 263-277.e3.

DORAN, P. M. Chapter 12 - Homogeneous Reactions. *Em*: DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)**. London: Academic Press, 2013. p. 599–703.

DOYLE, F. P.; NAYLER, J. H. C.; SMITH, H.; STOVE, E. R. Some Novel Acid-stable Penicillins. **Nature**, v. 191, n. 4793, p. 1091–1092, 1961.

ENGINEER, A. S.; YADAV, K. K.; KSHIRSAGAR, P. R.; DHAKEPHALKAR, P. K. A novel, enantioselective, thermostable recombinant hydantoinase to aid the synthesis of industrially valuable non-proteinogenic amino acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 138, p. 109554, 2020.

EPPINGER, E.; GRÖNING, J. A. D.; STOLZ, A. Chemoenzymatic enantioselective synthesis of phenylglycine and phenylglycine amide by direct coupling of the Strecker synthesis with a nitrilase reaction. **Frontiers in Catalysis**, v. 2, 2022.

ERGIN, F. Purification of Amoxicillin Trihydrate in the Presence of Degradation Products by Washing Method. **CrystEngComm**, v. 23, 1 jan. 2021.

ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research**, v. 4, p. 90–101, 1 jan. 2016.

FAISAL, P. A.; HAREESH, E. S.; PRIJI, P.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.; SREEDEVI, S.; JOSH, M. S.; BENJAMIN, S. Optimization of Parameters for the Production of Lipase from *Pseudomonas* sp. BUP6 by Solid State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 02, p. 125–133, 2014.

FALLAVENA, L.; ANTUNES, F.; ALVES, J.; PALUDO, N.; AYUB, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. Ultrasound technology and molecular sieves improve the thermodynamically controlled esterification of butyric acid mediated

by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **RSC Advances**, v. 4, p. 8675, 1 jan. 2014.

FAN, C.-W.; XU, G.-C.; MA, B.-D.; BAI, Y.-P.; ZHANG, J.; XU, J.-H. A Novel D-Mandelate Dehydrogenase Used in Three-Enzyme Cascade Reaction for Highly Efficient Synthesis of Non-Natural Chiral Amino Acids. **Journal of biotechnology**, v. 195, p. 67–71, fev. 2015.

FAN, Y.; LI, Y.; LIU, Q. Efficient Enzymatic Synthesis of Cephalexin in Suspension Aqueous Solution System. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 136–147, fev. 2021.

FAUZI, A.; HAMEED, I.; KADHIM, M. A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. **International Journal of Toxicological and Pharmacological Research**, v. 9, 1 mar. 2017.

FEDOROV, M. V; KORNYSHEV, A. A. Ionic Liquids at Electrified Interfaces. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 5, p. 2978–3036, 12 mar. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cr400374x>>.

FELIX, I. M. B.; CHIAVONE-FILHO, O.; MATTEDI, S. Effect of ethanol on the solubility of ampicillin and phenylglycine in aqueous media. **Fluid Phase Equilibria**, v. 424, p. 105–113, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381215302132>>.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3, p. 197–212, 2010.

FERREIRA, A. L. O.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. Nonconventional Reactor for Enzymatic Synthesis of Semi-Synthetic β -Lactam Antibiotics. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 23, p. 7695–7702, 7 nov. 2007.

FUSE, S.; MIFUNE, Y.; NAKAMURA, H.; TANAKA, H. Total synthesis of feglymycin based on a linear/convergent hybrid approach using micro-flow amide bond formation. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 13491, 2016.

GANDHI, N. N.; PATIL, N. S.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B.; WANGIKAR, P. P.; MUKESH, D. Lipase-Catalyzed Esterification. **Catalysis Reviews**, v. 42, n. 4, p. 439–480, 30 nov. 2000.

GHANDI, K. A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 04, 1 jan. 2013.

GOKHALE, D. V.; BASTAWDE, K. B.; PATIL, S. G.; KALKOTE, U. R.; JOSHI, R. R.; JOSHI, R. A.; RAVINDRANATHAN, T.; GAIKWAD, B. G.; JOGDAND, V. V.; NENE, S. Chemoenzymatic Synthesis of D(-)Phenylglycine Using Hydantoinase of *Pseudomonas Desmolyticum* Resting Cells. **Enzyme and microbial technology**, v. 18, n. 5, p. 353–357, abr. 1996.

GOTHWAL, R.; THATIKONDA, S. Role of environmental pollution in prevalence of antibiotic resistant bacteria in aquatic environment of river: case of Musi river, South India. **WATER AND ENVIRONMENT JOURNAL**, v. 31, n. 4, p. 456–462, 2017.

GREENSTEIN, J. P.; WINITZ, M. **Chemistry of the Amino Acids**. New York: John Wiley & Sons, 1961.

GRÖGER, H. Catalytic Enantioselective Strecker Reactions and Analogous Syntheses. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 8, p. 2795–2828, 1 ago. 2003.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–781, 2004.

GURURAJ, P.; RAMALINGAM, S.; NANDHINI DEVI, G.; GAUTAM, P. Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 647–657, 2016.

HANH, H. D.; OKITSU, K.; NISHIMURA, R.; MAEDA, Y. Biodiesel production through transesterification of triolein with various alcohols in an ultrasonic field. **Renewable Energy**, v. 34, p. 766–768, 2009.

HASNAOUI, I.; DAB, A.; MECHRI, S.; ABOULOIFA, H.; SAALAOUI, E.; JAOUADI, B.; NOIRIEL, A.; ASEHRAOU, A.; ABOUSALHAM, A. **Purification, Biochemical and Kinetic Characterization of a Novel Alkaline sn-1,3-Regioselective**

Triacylglycerol Lipase from *Penicillium crustosum* Thom Strain P22 Isolated from Moroccan Olive Mill Wastewater *International Journal of Molecular Sciences* 2022.

HÖCK, H.; ENGEL, S.; WEINGARTEN, S.; KEUL, H.; SCHWANEBERG, U.; MÖLLER, M.; BOCOLA, M. Comparison of *Candida antarctica* Lipase B Variants for Conversion of ϵ -Caprolactone in Aqueous Medium—Part 2. *Polymers*, v. 10, 2018.

HÖHNE, M.; BORNSCHEUER, U. T. Biocatalytic Routes to Optically Active Amines. *ChemCatChem*, v. 1, n. 1, p. 42–51, 24 ago. 2009.

HORCHANI, H.; AISSA, I.; OUERTANI, S.; ZARAI, Z.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 76, p. 125–132, 2012.

HORN, D.; KLAAS, C.; FOBKER, M.; KÖCK, R.; LANCKOHR, C. Chapter 8 - Therapeutic drug monitoring of antibiotics in critically ill patients. *Em: HEMPEL, G. B. T.-H. OF A. S. Methods of Therapeutic Drug Monitoring Including Pharmacogenetics*. [s.l.] Elsevier Science B.V., 2020. p. 169–183.

HOSSAIN, A.; ROY, S.; DOLUI, B. K. Effects of thermodynamics on the solvation of amino acids in the pure and binary mixtures of solutions: A review. *Journal of Molecular Liquids*, v. 232, p. 332–350, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732216341654>>.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 118, n. 1, p. 155–170, 2004.

HUA, S.; BAOSHU, L.; KAI, R.; ZHANG, J.; WANG, Y.; XUEJUN, C. **Preparation process of D-phenylglycine methyl ester hydrochloride crystals**. CN104829478A. 2015.

HUANG, Z.-X.; CAO, S.-L.; XU, P.; WU, H.; ZONG, M.-H.; LOU, W.-Y. Preparation of a novel nanobiocatalyst by immobilizing penicillin acylase onto magnetic nanocrystalline cellulose and its use for efficient synthesis of cefaclor. *Chemical Engineering Journal*, v. 346, p. 361–368, 2018.

ISIKA ADETUNJI, A.; OLUFOLAHAN OLANIRAN, A. Optimization of culture conditions for enhanced lipase production by an indigenous *Bacillus aryabhata* SE3-PB using response surface methodology. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 32, n. 6, p. 1514–1526, 2 nov. 2018.

ISMALAJ, E.; DE BORGGRAEVE, W. 2.02 - Penicillins. *Em*: BLACK, D. S.; COSSY, J.; STEVENS, C. V. B. T.-C. H. C. I. V. Oxford: Elsevier, 2022. p. 116–158.

JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315–351, 1 out. 1999.

JARIYACHAWALID, K.; LAOWANAPIBAN, P.; MEEVOOTISOM, V.; WIYAKRUTTA, S. Effective enhancement of *Pseudomonas stutzeri* D-phenylglycine aminotransferase functional expression in *Pichia pastoris* by co-expressing *Escherichia coli* GroEL-GroES. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 47, 2012.

JAUREGI, P.; HOEBEN, M. A.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; KWANT, G.; VAN DER WIELEN, L. A. M. Selective Separation of Physically Near-Identical Microparticle Mixtures by Interfacial Partitioning. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 40, n. 24, p. 5815–5821, 1 nov. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ie001024h>>.

JIANG, Y.; LOOS, K. Enzymatic Synthesis of Biobased Polyesters and Polyamides. **Polymers**, v. 8, n. 7, jun. 2016.

KANDASAMY, R.; VENKATESAN, S. K.; UDDIN, M. I.; GANESAN, S. Chapter 1 - Anaerobic biovalorization of leather industry solid waste and production of high value-added biomolecules and biofuels. *Em*: KRISHNARAJ RATHINAM, N.; SANI, R. K. B. T.-B. OF W. TO R. C. AND B. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 3–25.

KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. An insight into microbial lipases and their environmental facet. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY**, v. 12, n. 3, p. 1147–1162, 2015.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KATSIMPOURAS, C.; STEPHANOPOULOS, G. Enzymes in Biotechnology: Critical Platform Technologies for Bioprocess Development. **Current opinion in biotechnology**, v. 69, p. 91–102, jun. 2021.

KIM, M. G.; LEE, S. B. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of pivampicillin: Effect of reaction variables and organic cosolvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 1, n. 2, p. 71–80, 1996.

KIRCHNER, G.; SCOLLAR, M. P.; KLIBANOV, A. M. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 24, p. 7072–7076, 1 nov. 1985.

KOTWANI, A.; JOSHI, J.; KALONI, D. Pharmaceutical effluent: a critical link in the interconnected ecosystem promoting antimicrobial resistance. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 1–14, 1 jul. 2021.

KULHAVY, J.; ANDRADE, R.; BARROS, S.; SERRA, J.; IGLESIAS, M. Influence of temperature on thermodynamics of protic ionic liquid 2-hydroxy diethylammonium lactate (2-HDEAL)+short hydroxylic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 213, p. 92–106, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732215303536>>.

KUMAR, S. S.; KUMAR, L.; SAHAI, V.; GUPTA, R. A Thiol-Activated Lipase from *Trichosporon Asahii* MSR 54: Detergent Compatibility and Presoak Formulation for Oil Removal from Soiled Cloth at Ambient Temperature. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 427–432, 2009.

KUROCHKINA, V.; SKLYARENKO, A. Enzymatic synthesis of beta-lactam antibiotics. Analytical review. *Em*: [s.l: s.n.]p. 175–204.

LEE, M.-Y.; PENG, J.; WU, C.-C. Geometric effect of copper nanoparticles electrodeposited on screen-printed carbon electrodes on the detection of α -, β - and γ -amino acids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 186, p. 270–277, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400513007004>>.

LEUCHTENBERGER, W.; HUTHMACHER, K.; DRAUZ, K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 1, p. 1–8, 2005a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-005-0155-y>>.

LEUCHTENBERGER, W.; HUTHMACHER, K.; DRAUZ, K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 1, p. 1–8, 2005b.

LI, C.; ZHANG, F.; GAO, Z.; HE, L.; ZENG, X.; ZHU, Q.; YU, L. Effects of Organic Solvent, Water Activity, and Salt Hydrate Pair on the Sn-1,3 Selectivity and Activity of

Whole-Cell Lipase from *Aspergillus Niger* GZUF36. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 225–235, jan. 2018.

LIMA, L. M.; SILVA, B. N. M. da; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p. 112829, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523420308011>>.

LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 445–451, 2008.

LOU, W.-Y.; ZONG, M.-H.; LIU, Y.-Y.; WANG, J.-F. Efficient enantioselective hydrolysis of d,l-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid containing systems. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 1, p. 64–74, 2006a.

LOU, W.-Y.; ZONG, M.-H.; LIU, Y.-Y.; WANG, J.-F. Efficient enantioselective hydrolysis of d,l-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid containing systems. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 1, p. 64–74, 2006b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165606000915>>.

MALDONADO, R.; LOPES, D.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; KAMIMURA, E.; MACEDO, G. A Review on *Geotrichum* Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 30, p. 439–454, 1 dez. 2016.

MARKUSSON, H.; BELIÈRES, J.-P.; JOHANSSON, P.; ANGELL, C. A.; JACOBSSON, P. Prediction of Macroscopic Properties of Protic Ionic Liquids by Ab Initio Calculations. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, n. 35, p. 8717–8723, 1 set. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp072036k>>.

MAST, Y.; WEBER, T.; GÖLZ, M.; ORT-WINKLBAUER, R.; GONDRAN, A.; WOHLLEBEN, W.; SCHINKO, E. Characterization of the ‘pristinamycin supercluster’ of *Streptomyces pristinaespiralis*. **Microbial Biotechnology**, v. 4, p. 192–206, 2011.

MATEO, C.; ABIAN, O.; GRAZU, V.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; SEGURA, R.; MONTES, T.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; WILSON, L.; TORRES SÁEZ, R.; GUISAN, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Recent Advances in the Industrial Enzymatic Synthesis of Semi-Synthetic Lactam Antibiotics. **Medicinal Chemistry Reviews - Online**, v. 2, p. 207–218, 1 jun. 2005.

MCDONALD, M. A.; BOMMARIUS, A. S.; ROUSSEAU, R. W. Enzymatic reactive crystallization for improving ampicillin synthesis. **CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE**, v. 165, p. 81–88, 2017.

MITCHELL, D. A.; RODRIGUEZ, J. A.; CARRIÈRE, F.; KRIEGER, N. Determination of the quantitative stereoselectivity fingerprint of lipases during hydrolysis of a prochiral triacylglycerol. **Journal of Biotechnology**, v. 135, n. 2, p. 168–173, 2008.

MOHARANA, T. R.; RAO, N. M. Substrate structure and computation guided engineering of a lipase for omega-3 fatty acid selectivity. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, p. e0231177-, 9 abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231177>>.

MONTEIRO, P. F.; SILVA-BARCELLOS, N. M.; CALDEIRA, T. G.; REIS, A. C. C.; RIBEIRO, A. S.; DE SOUZA, J. Effects of experimental conditions on solubility measurements for BCS classification in order to improve the biowaiver guidelines. **BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**, v. 57, 2021.

MOODY, H. M. **Process for the preparation of amino acid methyl esters**. 2011a.

MOODY, H. M. **Process for the preparation of amino acid methyl esters**. 2011b.

MOOSMANN, D.; MOKEEV, V.; KULIK, A.; OSIPENKOV, N.; KOCADINC, S.; ORT-WINKLBAUER, R.; HANDEL, F.; HENNRICH, O.; YOUN, J.-W.; SPRENGER, G. A.; MAST, Y. Genetic Engineering Approaches for the Fermentative Production of Phenylglycines. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 8, p. 3433–3444, abr. 2020.

MUKHERJEE, P. K. Chapter 11 - LC–MS: A Rapid Technique for Understanding the Plant Metabolite Analysis. *Em*: MUKHERJEE, P. K. **Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 459–479.

NAGAR, S.; GUPTA, V. K. Hyper Production and Eco-Friendly Bleaching of Kraft Pulp by Xylanase From *Bacillus pumilus* SV-205 Using Agro Waste Material. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 7, p. 4019–4031, 2021.

NAGARAJAN, S. New Tools for Exploring “Old Friends—Microbial Lipases”. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 5, p. 1163–1196, 2012.

NEEDHAM, T. E.; PARUTA, A. N.; GERRAUGHTY, R. J. Solubility of Amino Acids in Pure Solvent Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 4, p. 565–567, 1971. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354915378436>>.

NINGSIH, F.; KITANI, S.; FUKUSHIMA, E.; NIHIRA, T. VisG Is Essential for Biosynthesis of Virginiamycin S, a Streptogramin Type B Antibiotic, as a Provider of the Nonproteinogenic Amino Acid Phenylglycine. **Microbiology (Reading, England)**, v. 157, n. Pt 11, p. 3213–3220, nov. 2011.

OLIVEIRA, A. C. D.; FERNANDES, M. L.; MARIANO, A. B. Production and Characterization of an Extracellular Lipase from *Candida Guilliermondii*. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 45, n. 4, p. 1503–1511, 2014.

ONOJA, E.; CHANDREN, S.; RAZAK, F. I. A.; WAHAB, R. A. Enzymatic synthesis of butyl butyrate by *Candida rugosa* lipase supported on magnetized-nanosilica from oil palm leaves: Process optimization, kinetic and thermodynamic study. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 91, p. 105–118, 2018.

OSPINA, S.; BARZANA, E.; RAMÍREZ, O. T.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 6, p. 462–469, 1996.

PAN, S.-B.; WU, Q.; CHEN, C.-X.; LIN, X.-F. Efficient enzymatic synthesis of ampicillin in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 1, p. 13–18, 2008a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117707002779>>.

PAN, S.-B.; WU, Q.; CHEN, C.-X.; LIN, X.-F. Efficient enzymatic synthesis of ampicillin in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 1, p. 13–18, 2008b.

PAN, X.; XU, L.; LI, Y.; WU, S.; WU, Y.; WEI, W. Strategies to Improve the Biosynthesis of β -Lactam Antibiotics by Penicillin G Acylase: Progress and Prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022.

PANCU, D. F.; SCURTU, A.; MACASOI, I. G.; MARTI, D.; MIOC, M.; SOICA, C.; CORICOVAC, D.; HORHAT, D.; POENARU, M.; DEHELEAN, C. **Antibiotics: Conventional Therapy and Natural Compounds with Antibacterial Activity—A Pharmaco-Toxicological Screening** *Antibiotics* 2021.

PANDEY, N.; DHAKAR, K.; JAIN, R.; PANDEY, A. Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. **Mycosphere**, v. 7, 29 set. 2016.

PARIKH, D. T.; LANJEKAR, K. J.; RATHOD, V. K. Kinetics and thermodynamics of lipase catalysed synthesis of propyl caprate. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 10, p. 1163–1175, 2019.

PARK, J.-Y.; PARK, K.-M. Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review. **Journal of Chemistry**, v. 2022, p. 7609019, 2022.

PATEL, N.; RAI, D.; SHIVAM; SHAHANE, S.; MISHRA, U. Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications. **Recent patents on biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 45–56, 2019.

PIAO, M.-H.; HWANG, J.; WON, M.-S.; HYUN, M. H.; SHIM, Y.-B. A Solid State Polymer-Coated Electrode Containing a Chiral Crown Ether Derivative for Enantioselective Detection of Phenylglycine Methyl Ester Isomer. **Electroanalysis**, v. 20, n. 12, p. 1293–1299, 1 jun. 2008.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1, p. 67–80, 1998.

POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Transesterification of Waste Frying Oil and Soybean Oil by Combi-lipases Under Ultrasound-Assisted Reactions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 186, n. 3, p. 576–589, 2018.

PRAKASAN, P.; SREEDHARAN, S.; ABDUL FAISAL, P.; BENJAMIN, Prof. S. MICROBIAL LIPASES – PROPERTIES AND APPLICATIONS. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 6, 3 out. 2016.

PRASAD, B. A. B.; BISAI, A.; SINGH, V. K. Trimethylsilyl cyanide addition to aldimines and its application in the synthesis of (S)-phenylglycine methyl ester. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 52, p. 9565–9567, 2004.

RAJAN, A.; KUMAR, D. R.; NAIR, A. Isolation of a Novel Alkaline Lipase Producing Fungus *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 from Aged and Crude Rice Bran Oil and Quantification by HPTLC. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 5, 1 fev. 2011.

RASALKAR, M. S.; POTDAR, M. K.; SALUNKHE, M. M. Pseudomonas cepacia lipase-catalysed resolution of racemic alcohols in ionic liquid using succinic anhydride: role of triethylamine in enhancement of catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, n. 4, p. 267–270, 2004.

RESCH, V.; FABIAN, W. M. F.; KROUTIL, W. Deracemisation of Mandelic Acid to Optically Pure Non-Natural L-Phenylglycine via a Redox-Neutral Biocatalytic Cascade. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 352, n. 6, p. 993–997, 19 abr. 2010.

RIYADI, F. A.; ALAM, Md. Z.; SALLEH, Md. N.; SALLEH, H. M. Optimization of thermostable organic solvent-tolerant lipase production by thermotolerant *Rhizopus* sp. using solid-state fermentation of palm kernel cake. **3 Biotech**, v. 7, n. 5, p. 300, 2017.

RUIZ, M.; CABEZAS, J.; ESCUDERO, I.; ALVAREZ, J.; COCA PRADOS, J. α -Phenylglycine Extraction with Trialkylmethylammonium Chloride Free and Immobilized in a Macroporous Resin. **Chemical Engineering Research & Design - CHEM ENG RES DES**, v. 80, p. 529–536, 1 jul. 2002.

SAMANIDOU, V. F.; EVAGGELOPOULOU, E. N.; PAPADOYANNIS, I. N. Chromatographic analysis of penicillins in pharmaceutical formulations and biological fluids. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1879–1908, 1 ago. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jssc.200600137>>.

SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; YAMUNA RANI, K.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases. **Biotechnology progress**, v. 34, n. 1, p. 5–28, jan. 2018.

SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 258–268, 2001.

SHARMA, A.; BARDHAN, D.; PATEL, R. Optimization of Physical Parameters for Lipase Production from *Arthrobacter* Sp. BGCC#490. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 46, n. 2, p. 178–183, abr. 2009.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **CHEMICAL REVIEWS**, v. 118, n. 2, p. 801–838, 2018.

SIGMAALDRICH. **(R)-(-)-2-Phenylglycine methyl ester hydrochloride**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/307882>>. Acesso em: 8 mar. 2023.

SOUTO-MONTERO, P.; RODIL, E.; SOTO, A. Solubility of seven amino acids in two acetate ionic liquids from 298.15 K to 328.15 K. **Fluid Phase Equilibria**, v. 582, p. 114075, 2024. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381224000529>>.

STERGIOU, P.-Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L. G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E. M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846–1859, 2013.

STEVENAZZI, A.; MARCHINI, M.; SANDRONE, G.; VERGANI, B.; LATTANZIO, M. Amino acidic scaffolds bearing unnatural side chains: An old idea generates new and versatile tools for the life sciences. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 23, p. 5349–5356, 2014.

SUN, H.; LIU, B.; REN, K.; LI, J. Solubility of d-phenylglycine methyl ester hydrochloride in water and in organic individual or mixed solvents: Experimental data and results of thermodynamic modeling. **Fluid Phase Equilibria**, v. 417, p. 62–69, 2016.

TAJUDDIN, N. A.; LEE, A. F.; WILSON, K. 6 - Production of biodiesel via catalytic upgrading and refining of sustainable oleaginous feedstocks. *Em*: LUQUE, R.; LIN, C. S. K.; WILSON, K.; CLARK, J. B. T.-H. OF B. P. (SECOND E. [s.l.] Woodhead Publishing, 2016. p. 121–164.

TANG, C.-D.; SHI, H.-L.; JIA, Y.-Y.; LI, X.; WANG, L.-F.; XU, J.-H.; YAO, L.-G.; KAN, Y.-C. High Level and Enantioselective Production of L-Phenylglycine from Racemic Mandelic Acid by Engineered Escherichia Coli Using Response Surface Methodology. **Enzyme and microbial technology**, v. 136, p. 109513, maio 2020.

TASKIN, M.; UCAR, M. H.; UNVER, Y.; KARA, A. A.; OZDEMIR, M.; ORTUCU, S. Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 8, p. 97–103, 2016.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R. Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. **ChemBioEng Reviews**, v. 6, n. 5, p. 157–166, 1 out. 2019.

THANGARASU, V.; ANAND, R. Chapter 17 - Comparative evaluation of corrosion behavior of Aegle Marmelos Correa diesel, biodiesel, and their blends on aluminum and mild steel metals. *Em*: AZAD, A. K.; RASUL, M. B. T.-A. B. **Woodhead Publishing Series in Energy**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2019. p. 443–471.

THIRUNAVUKARASU, K.; EDWINOLIVER, N. G.; ANBARASAN, S.; GOWTHAMAN, M. K.; IEFUJI, H.; KAMINI, N. R. Removal of triglyceride soil from fabrics by a novel lipase from *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 701–706, 2008.

TIAN, T.; HU, X.; GUAN, P.; DING, X. Research on solubility and bio-solubility of amino acids ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 225, p. 224–230, 2017.
Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732216331324>>.

TOLOMELLI, A.; RICCI, A.; VIOLA, A.; BASSAN, M.; FERRARI, L.; FERRAZZANO, L.; MARTELLI, G.; MATTELLONE, A.; CABRI, W. Ampicillin Sodium: Isolation, Identification and Synthesis of the Last Unknown Impurity after 60 Years of Clinical Use. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 191, p. 113584, nov. 2020.

TONG, X.; BUSK, P. K.; LANGE, L. Characterization of a new sn-1,3-regioselective triacylglycerol lipase from *Malbranchea cinnamomea*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 4, p. 471–478, 1 jul. 2016.

TRIPATHI, R.; SINGH, J.; BHARTI, R.; THAKUR, I. Isolation, Purification and Characterization of Lipase from *Microbacterium* sp. and its Application in Biodiesel Production. **Energy Procedia**, v. 54, 31 dez. 2014.

UDDIN, T. M.; CHAKRABORTY, A. J.; KHUSRO, A.; ZIDAN, B. M. R. M.; MITRA, S.; EMRAN, T. Bin; DHAMA, K.; RIPON, Md. K. H.; GAJDÁCS, M.; SAHIBZADA, M. U. K.; HOSSAIN, Md. J.; KOIRALA, N. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1750–1766, 2021.

ÜLKER, S.; KARAOĞLU, Ş. A. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 385–390, 2012.

VAN LANGEN, L. M.; VAN RANTWIJK, F.; ŠVEDAS, V. K.; SHELDON, R. A. Penicillin acylase-catalyzed peptide synthesis: a chemo-enzymatic route to stereoisomers of 3,6-diphenylpiperazine-2,5-dione. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 11, n. 5, p. 1077–1083, 2000.

VANLEEUEW, E.; WINDERICKX, S.; THEVISSSEN, K.; LAGRAIN, B.; DUSSELIER, M.; CAMMUE, B. P. A.; SELS, B. F. Substrate-Specificity of *Candida rugosa* Lipase and Its Industrial Application. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 19, p. 15828–15844, 7 out. 2019.

VASANTHA, T.; KUMAR, A.; ATTRI, P.; VENKATESU, P.; DEVI, R. The Solubility and Stability of Amino Acids in Biocompatible Ionic Liquids. **Protein and peptide letters**, v. 21, 22 jul. 2013.

VILAS BÔAS, R. N.; DE CASTRO, H. F. A Review of Synthesis of Esters with Aromatic, Emulsifying, and Lubricant Properties by Biotransformation Using Lipases. **Biotechnology and bioengineering**, v. 119, n. 3, p. 725–742, mar. 2022.

VOLPATO, G.; C. RODRIGUES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives** *Current Medicinal Chemistry* 2010a.

VOLPATO, G.; C. RODRIGUES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives** *Current Medicinal Chemistry* 2010b. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/article/17619>>.

VRANCIANU, C. O.; GHEORGHE, I.; DOBRE, E.-G.; BARBU, I. C.; CRISTIAN, R. E.; POPA, M.; LEE, S. H.; LIMBAN, C.; VLAD, I. M.; CHIFIRIUC, M. C. **Emerging Strategies to Combat β -Lactamase Producing ESKAPE Pathogens** *International Journal of Molecular Sciences* 2020.

WADE, K.; BENJAMIN, D. Clinical Pharmacology of Anti-Infective Drugs. *Em: Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. [s.l: s.n.]p. 1160–1211.

WANG, S.-S.; ZOU, F.; MENG, W.-Q.; ZHANG, J.-Z.; FENG, Y.; ZHANG, L.; LIU, Y. Chemical Resolution of DI-Phenylalanine Methyl Ester Using N-Acetyl-D-Phenylglycine as Resolving Agent. **Journal of Chemical Research**, v. 39, n. 3, p. 159–161, 1 mar. 2015.

WEGMAN, M. A.; JANSSEN, M. H. A.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Towards Biocatalytic Synthesis of β -Lactam Antibiotics. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 343, p. 559–576, 2001.

WEI, D.-Z.; YANG, L. Effects of ethylene glycol on the synthesis of ampicillin using immobilized penicillin G acylase. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 78, n. 4, p. 431–436, 1 abr. 2003.

WILLIAMS, R. M.; HENDRIX, J. A. Asymmetric synthesis of arylglycines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 3723–3728, 1 jun. 1990.

WILSON, L.; ILLANES, A.; SOLER, L.; HENRÍQUEZ, M. J. Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 322–326, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511308003607>>.

WU, G. **Biochemistry and Nutrition (2nd ed.)**. . Boca Raton: CRC Press, 2021.

WU, X.; WANG, R.; ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Enantioselective Ammonolysis of Phenylglycine Methyl Ester with Lipase–Pluronic Nanoconjugate in Tertiary Butanol. **Catalysis Letters**, v. 144, n. 8, p. 1407–1410, 2014.

YABUUCHI, T.; KUSUMI, T. Phenylglycine Methyl Ester, a Useful Tool for Absolute Configuration Determination of Various Chiral Carboxylic Acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 397–404, 1 jan. 2000.

YÖRÜR-GÖRECI, Ç.; ALTAŞ-PUNTAR, N.; TORAMAN, A.; DEMIRHAN, N. Synthesis, spectral and thermal characterization, biological activity of a new amino acid ester containing substituted salicylaldehyde Schiff base ligand and its Ru(II)bipyridyl complex. **Main Group Chemistry**, v. 20, p. 193–202, 2021.

ZBINDEN, K. G.; OBST-SANDER, U.; HILPERT, K.; KÜHNE, H.; BANNER, D. W.; BÖHM, H.-J.; STAHL, M.; ACKERMANN, J.; ALIG, L.; WEBER, L.; WESSEL, H. P.; RIEDERER, M. A.; TSCHOPP, T. B.; LAVÉ, T. Selective and orally bioavailable phenylglycine tissue factor/factor VIIa inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**

Letters, v. 15, n. 23, p. 5344–5352, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X05011169>>.

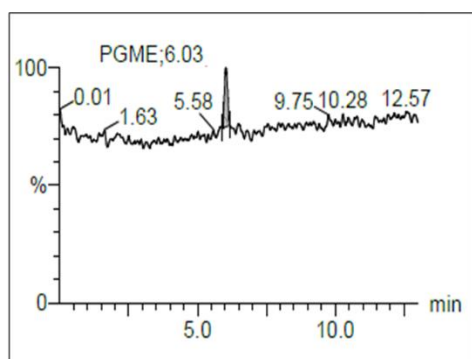
ZHANG, Y.; WEI, D.; LI, D.; LIU, S.; SONG, Q. Optimisation of enzymatic synthesis of cefaclor with in situ product removal and continuous acyl donor feeding. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 1, p. 59–64, 1 jan. 2007.

ZHOU, Y.; LI, W.; KUMAR, V.; NECIBI, M. C.; MU, Y.-J.; SHI, C.; CHAURASIA, D.; CHAUHAN, S.; CHATURVEDI, P.; SILLANPÄÄ, M.; ZHANG, Z.; AWASTHI, M. K.; SIROHI, R. Synthetic organic antibiotics residues as emerging contaminants waste-to-resources processing for a circular economy in China: Challenges and perspective. **Environmental Research**, v. 211, p. 113075, 2022.

ZHOU, Y.; WU, S.; LI, Z. One-Pot Enantioselective Synthesis of d-Phenylglycines from Racemic Mandelic Acids, Styrenes, or Biobased l-Phenylalanine via Cascade Biocatalysis. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 359, n. 24, p. 4305–4316, 19 dez. 2017.

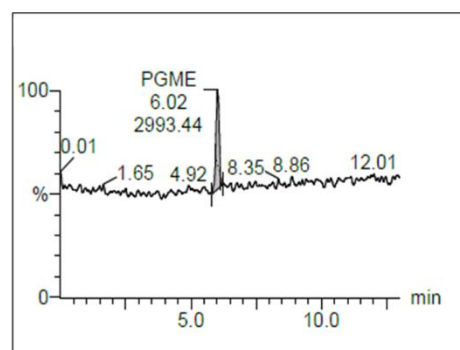
ZHU, Y.; YUAN, J. A Four-Step Enzymatic Cascade for Efficient Production of L-Phenylglycine from Biobased L-Phenylalanine. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, v. 23, n. 8, p. e202100661, abr. 2022.

8. APÊNDICE



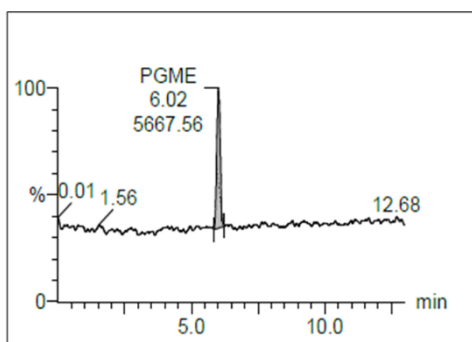
Conc Padrão_{PGME} = 0,009 µg/mL

(a)



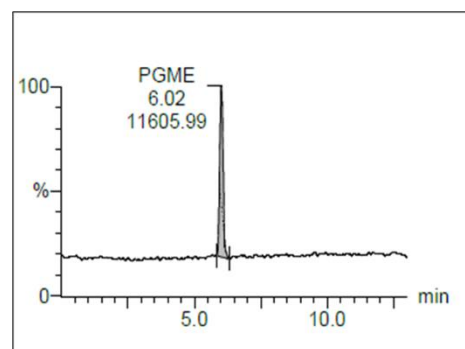
Conc Padrão_{PGME} = 0,020 µg/mL

(b)



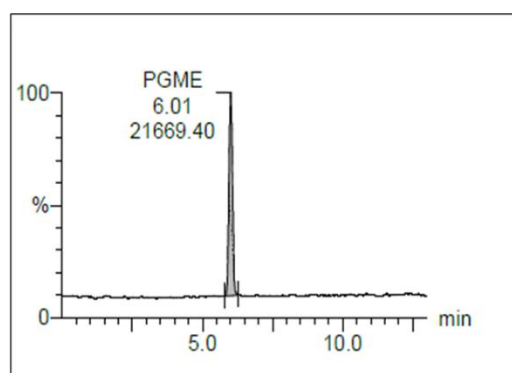
Conc Padrão_{PGME} = 0,036 µg/mL

(c)



Conc Padrão_{PGME} = 0,073 µg/mL

(d)



Conc Padrão_{PGME} = 0,135 µg/mL

(e)

Figura A1 - Cromatograma LC-MS para as concentrações do padrão PGME injetado para construção da curva padrão: (a) Padrão PGME a 0,009 µg/mL, b) 0,020 µg/mL, c) 0,036 µg/mL, d) 0,073 µg/mL e e) 0,135 µg/mL, todas preparadas a partir de uma solução

padrão de PGME na concentração de 9,8 µg/mL utilizando-se solução de metanol e água na proporção de 1:1 v/v como diluente.

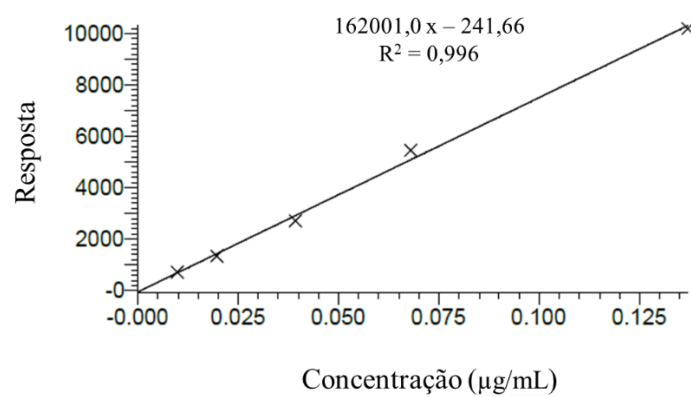


Figura A2 - Gráfico de resposta do detector pela concentração do padrão PGME (µg/mL), construído para calibração da injeção pela técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS).