

Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul
Programa de Pós-Graduação em Química

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE SUPORTE HÍBRIDO PARA IMOBILIZAÇÃO
DE PENICILINA G ACILASE**

Campo Grande – MS

2025

Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul
Programa de Pós-Graduação em Química

JEAN ALAIN RENAUD

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
SUPORTE HÍBRIDO PARA IMOBILIZAÇÃO DE
PENICILINA G ACILASE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Química – Nível de
Mestrado – da Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rebeca Yndira Cabrera Padilla

Co-orientador: Prof. Dr. Adilson Beatriz

Campo Grande – MS

2025

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rebeca Yndira Cabrera Padilla

Orientadora

Prof. Dr. Edson Romano Nucci

Examinador Titular

Prof^a. Dr^a. Adriana Pereira Duarte

Examinador Titular

Prof. Dr^a. Ana Camila Micheletti

Examinador Suplente Interno

Prof^a. Dr^a. Maria Lucila Hernandez Macedo

Examinadora Suplente Externa

Dedico este trabalho à minha mãe, Marie Marthe, e ao meu pai, Alismé, à minha esposa e à minha princesa Lorvelie Decius e Emley Joyce Renaud, aos meus irmãos: Jean Widner, Asthofel, Mackendy, Abner Renaud, à minha tia Ersila, Dr. Claudel Noël, Professor Jakly Méhu, e ao diretor Jean Exantus, por seus conselhos tão valiosos para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão a Deus, Criador do universo, pela vida, saúde, sabedoria e força que me permitiram concluir esta pesquisa e finalizar mais uma etapa da minha jornada acadêmica.

Aos Orientadores

- ❖ À Professora Rebeca Yndira Cabrera Padilla, minha orientadora, pelo apoio incansável, pela paciência em me guiar nos processos acadêmicos e pelo carinho que ultrapassou o papel de professora, tornando-se uma verdadeira mentora.
- ❖ Ao Professor Adilson Beatriz, meu coorientador, pela confiança depositada em mim, pelo suporte técnico e pelo incentivo constante, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Apoio Técnico e Institucional

- ❖ Ao Luiz Praça e ao Laboratório MULTILAM (Instituto de Física) pela colaboração.
- ❖ À equipe técnica do Instituto de Química pelo suporte essencial.
- ❖ Ao Laboratório Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) pelas análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)
- ❖ Aos professores do Instituto de Química (INQUI), em especial ao Prof. Dr. Leandro Moreira de Campos Pinto, pelo acolhimento e apoio.
- ❖ Ao CNPQ pelo financiamento que viabilizou esta pesquisa.
À Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pela estrutura e recursos disponibilizados.

Colegas e Amigos

Meu sincero agradecimento a Mário Rodrigues Cortes, Paul Jérôme Patrice, Yves François Lemeuble, Géralde Magny, Wendest Francique, Oldy Albert, Dr. Jean Daniel Zephyr, Yougens Augustin, Sanmyr Bezerra de Moura Albuquerque, Vitor Dorta Franco, Phara Olivier, Jean Rosly Pierre, Eduardo dos Santos Freitas Cardoso, pela amizade, parceria e motivação ao longo desta caminhada.

Família

- ❖ À minha mãe, Marie Marthe Pierre, meu alicerce, maior inspiração e por todos os esforços dedicados desde a escola clássica até a universidade.
- ❖ Ao meu pai, Alisme Renaud, pelas contribuições valiosas e orientação.
- ❖ Aos meus irmãos e irmãs, especialmente Jean Widner, Asthofel, Mackendy, Abner, Marie Yoline, Marie Yolita Renaud, pela escuta atenta e apoio.
- ❖ À minha tia Ersila, pelo suporte emocional e técnico em momentos cruciais.
- ❖ À Lorvelie Decius, amor da minha vida, por estar ao meu lado em cada desafio. Este trabalho também é seu.

Esta conquista é resultado de um esforço coletivo, e sou imensamente grato a todos que fizeram parte desta trajetória. Muito obrigado!

Resumo

A imobilização enzimática em suportes híbridos orgânico-inorgânicos surge como estratégia promissora para otimizar a produção de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), combinando a estabilidade da sílica com a sustentabilidade de resíduos agroindustriais como o endocarpo de cumbaru. Este estudo teve como objetivo sintetizar e caracterizar suportes híbridos à base de sílica e endocarpo de cumbaru (*Dipteryx alata* Vogel) para a imobilização da enzima penicilina G acilase (PGA), visando à produção de 6-APA por hidrólise enzimática da penicilina G. Os suportes foram obtidos pelo método sol-gel, incorporando diferentes proporções de endocarpo de cumbaru (1%; 1,5% e 2%). Adicionalmente, foram preparadas matrizes contendo 2% de endocarpo previamente tratado com dioxano e periodato de sódio. Todos os suportes sintetizados foram posteriormente ativados com glutaraldeído ou epícloridrina. A caracterização estrutural e físico-química foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA). As análises por MEV e FTIR confirmaram a formação bem-sucedida do suporte híbrido, evidenciando uma estrutura porosa e a presença de grupos funcionais essenciais para a imobilização enzimática. Os resultados de TGA demonstraram que o suporte híbrido ativado com glutaraldeído apresentou maior estabilidade térmica, com perda de massa de apenas 16,3% até 700°C, comparado com os demais suportes preparados, destacando sua robustez para aplicações industriais. Após a caracterização, foi selecionado o suporte híbrido preparado com sílica e 2% de endocarpo de cumbaru ativado com glutaraldeído para realizar a imobilização da penicilina G acilase (PGA) pelo método de ligação covalente, em seguida foi realizada a determinação da atividade enzimática da enzima livre e imobilizada, bem como o rendimento de imobilização (29%). Apesar do rendimento de imobilização obtido relativamente baixo, o suporte híbrido desenvolvido com os ajustes necessários apresenta-se com potencial promissor para aplicações biotecnológicas, destacando-se como uma alternativa sustentável para processos industriais baseados em biocatálise.

Palavras-chave: Imobilização enzimática, penicilina G acilase, suporte híbrido, endocarpo de cumbaru, ácido 6-aminopenicilânico.

Abstract

Enzymatic immobilization on organic-inorganic hybrid supports emerges as a promising strategy to optimize the production of 6-aminopenicillanic acid (6-APA), combining the stability of silica with the sustainability of agro-industrial waste such as cumbaru endocarp. This study aimed to develop and characterize a hybrid support based on silica and cumbaru endocarp (*Dipteryx alata* Vogel) for the immobilization of the enzyme penicillin G acylase (PGA), targeting the production of (6-APA) through the enzymatic hydrolysis of penicillin G. Hybrid matrices with different percentages of cumbaru endocarp (1%, 1.5%, and 2%) and silica were prepared by the sol-gel method. Matrices with silica and 2% cumbaru endocarp, previously treated with dioxane and sodium periodate, were also prepared. Subsequently, all prepared hybrid supports were activated with glutaraldehyde and epichlorohydrin. The characterization of the prepared supports was carried out using scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and thermogravimetric analysis (TGA). SEM and FTIR analyses confirmed the successful formation of the hybrid support, revealing a porous structure and the presence of essential functional groups for enzyme immobilization. The TGA results demonstrated that the hybrid support activated with glutaraldehyde exhibited higher thermal stability, with a mass loss of only 16.3% up to 700°C, compared to the other prepared supports, highlighting its robustness for industrial applications. After characterization, the hybrid support prepared with silica and 2% cumbaru endocarp activated with glutaraldehyde was selected to carry out the immobilization of penicillin G acylase (PGA) by the covalent binding method. Subsequently, the enzymatic activity of the free and immobilized enzyme was determined, along with the immobilization yield (29%). Despite the relatively low immobilization yield obtained, the developed hybrid support, with the necessary adjustments, shows promising potential for biotechnological applications, standing out as a sustainable alternative for industrial processes based on biocatalysis.

Keywords: Enzyme immobilization, penicillin G acylase, hybrid support, cumbaru endocarp, 6-aminopenicillanic acid.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA DOS B-LACTÂMICOS	19
FIGURA 3- ÁRVORE DE CUMBARU.	26
FIGURA 4- O FRUTO DO CUMBARU (DIPTERYX ALATA) É DESCRITO EM TRÊS PARTES: A POLPA (MESOCARPO), O ENDOCARPO E A SEMENTE (AMÊNDOA)	26
FIGURA 5- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA PENICILINA G CATALISADA POR PGA	27
FIGURA 6- IMAGENS AMPLIADAS 500 E 2000X DE SÍLICA, CUMBARU E CUMBARU TRATADO	33
FIGURA 7- IMAGENS AMPLIADAS (500X E 2000X) DOS SUPORTES HÍBRIDOS COM SÍLICA E DIFERENTES PROPORÇÕES DE ENDOCARPO DE CUMBARU (1%, 1,5% E 2%).	34
FIGURA 8 - IMAGENS AMPLIADAS (500X E 2000X) DOS SUPORTES PREPARADOS COM SÍLICA E 2% DE ENDOCARPO DE CUMBARU SEM TRATAMENTO (SH 2%) E ATIVADOS COM EPICLORIDRINA (SH 2%-EPI) E GLUTARALDEÍDO (SH 2%-GLU).	35
FIGURA 9- IMAGENS AMPLIADAS (500X E 2000X) DO SUPORTE HÍBRIDO PREPARADO COM SÍLICA E 2% DE ENDOCARPO DE CUMBARU TRATADO (SH 2%Trat), ATIVADO COM EPICLORIDRINA (SH 2%Trat-EPI) E GLUTARALDEÍDO (SH 2%Trat-GLU).....	36
FIGURA 10- ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DA SÍLICA, DO ENDOCARPO DE CUMBARU E DOS SUPORTES HÍBRIDOS PREPARADOS COM SÍLICA E 1%, 1,5% E 2% DE ENDOCARPO DE CUMBARU.....	37
FIGURA 11- ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DOS SUPORTES HÍBRIDOS PREPARADOS COM SÍLICA E 2% DE ENDOCARPO DE CUMBARU, ATIVADOS COM EPICLORIDRINA E GLUTARALDEÍDO.....	38
FIGURA 12- ESPECTRO DAS AMOSTRAS DE SUPORTES HÍBRIDOS PREPARADOS COM SÍLICA E 2% DE ENDOCARPO DE CUMBARU COM TRATAMENTO.	39
FIGURA 13- CURVAS DE TGA E DTGA DA SÍLICA E DO ENDOCARPO DE CUMBARU, SEM E COM TRATAMENTO.	40
FIGURA 14- CURVAS DE TGA E DTGA DOS SUPORTES HÍBRIDOS PREPARADOS COM SÍLICA E 1%, 1,5% E 2% DE ENDOCARPO DE CUMBARU.	42
FIGURA 15- CURVAS DE TGA E DTGA DOS SUPORTES HÍBRIDOS DE SÍLICA COM 2% DE ENDOCARPO DE CUMBARU, ATIVADOS COM EPICLORIDRINA E GLUTARALDEÍDO.....	43
FIGURA 16- CURVAS DE TGA E DTGA DOS SUPORTES HÍBRIDOS DE SÍLICA COM 2% DE ENDOCARPO DE CUMBARU TRATADO, ATIVADOS COM EPICLORIDRINA E GLUTARALDEÍDO.	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 .CLASSIFICAÇÃO DOS SUPORTES EM RELAÇÃO À SUA COMPOSIÇÃO	23
TABELA 2: VALORES DAS ATIVIDADE ENZIMATICA ANTES E APÓS AIMOBILIZAÇÃO.....	45

LISTA DE SIGLAS

?: Porcentagem

1,3-BPG: 1,3-bisfosfoglicerato

1g: Uma grama

1h: Uma hora

6-APA: Acido 6-aminopenicilânico

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

Abs: Absorbância

ADP: Adenosina Difosfato

A_{t_0} : Atividade inicial

A_t : Atividade final

DTGA: Análise Termogravimétrica Derivada

EPI: Epicloridrina

FTIR: Infravermelho com transformada de Fourier

GLU: Glutaraldeído

IV: Infravermelho

LFT: Faculdade de ciências farmacêuticas

m/v: massa/volume

M: molar

MESH: Malha Estandar Sistema de Homogeneização

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

mL: mililitro

MULTILAM: Multiusuário de Analise de Materiais

PACs: Penicilina Acilases

PBDA: Para-dimetilamino Benzaldeído

PG: Penicilina G

PGA: Penicilina G acilase

pH : Potencial de hidrogênio

PHBV: Poli (3-hidroxiabutirato-CO-3-hidroxiacetoato)

PVA: Álcool Polivinil

RI: Rendimento de imobilização

SH: Suporte híbrido

SiO₂: sílica

TEOS: Tetraetilortossilicato

TGA: Análise Termogravimétrica

TMOS: Tetrametilortossilicato

Trat: Tratada

UI: Unidade internacional

Sumário

INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVO GERAL.....	17
Objetivos específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Antibiótico β -lactâmicos.....	18
3.2 Penicilina G Acilase (PGA).....	19
3.3 Imobilizações de enzimas	21
3.4 Suporte híbrido	23
3.5 Cumbaru (<i>Dipteryx alata</i>).....	26
3.6 Hidrolise da Penicilina G	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Material.....	29
4.2 Métodos	29
4.2.1. Preparação e tratamento das partículas do endocarpo de cumbaru	29
4.2.2. Preparação do suporte híbrido e ativação.....	29
4.2.3 Caracterização do suporte	30
4.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	30
4.2.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	30
4.2.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)	31
4.2.4 Imobilização por ligação covalente de PGA em suporte híbrido.....	31
4.2.5 Curva de calibração.....	31
4.2.6 Determinação da Atividade enzimática por Método colorimétrico do PDAB31	
5. RESULTADOS	33
5.1 Caracterizações do suporte híbrido	33
5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	33
5.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	37
5.2. Atividade enzimática e rendimento de imobilização.....	45
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	48

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas causadas por bactérias tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, entre outras, são responsáveis pela morte de mais de 50% da população mundial (Naghavi et al., 2022).

No entanto, as doenças infecciosas causadas por essas bactérias passaram a ser controladas com o uso da penicilina, um antibiótico descoberto por Alexander Fleming em 1928, isolado a partir do fungo *Penicillium chrysogenum*. Apesar de sua descoberta precoce, a penicilina só foi introduzida em larga escala na prática clínica após o desenvolvimento de técnicas de produção em massa durante a Segunda Guerra Mundial, com uso terapêutico registrado a partir de 1941 em casos experimentais e difusão ampla a partir de 1943 (Gaynes, 2017).

Sob a ação específica da enzima penicilinase ou acilase, a penicilina G sofre hidrólise controlada, liberando seu núcleo beta-lactâmico ativo como ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), um precursor essencial para a síntese de antibióticos semissintéticos. A penicilina melhorou a qualidade de vida ao controlar doenças bacterianas e promover o crescimento populacional, mas também levou ao surgimento de bactérias resistentes. Para resolver isso, novos antibióticos, como cefalosporinas, carbapenêmicos, monomicina e penicilina G, foram desenvolvidos (Morgado, 2020).

Cada tipo de penicilina possui propriedades específicas que influenciam sua eficácia e uso. Por exemplo, a penicilina V, estável em ácido, tem como alvo principal bactérias Gram-positivas (Pedra., et al), enquanto a penicilina G, mais versátil, é usada para produzir industrialmente ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), um precursor essencial dos antibióticos β -lactâmicos (Bruggink et al., 1998). A penicilina G, frequentemente injetada em hospitais, é essencial para tratar infecções graves (Alves et al., 2022)

A hidrólise enzimática da penicilina G (PenG) para produzir ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) é uma etapa fundamental na fabricação de penicilinas semissintéticas, servindo como precursor de muitos antibióticos β -lactâmicos (Tishkov et al., 2010). Este método enzimático é preferido por seu alto rendimento e reduzido

impacto ambiental em comparação aos processos químicos convencionais (Shewale e Sivaraman, 1989).

Aspenicilina acilases (PACs) estão entre as enzimas mais utilizadas industrialmente devido à sua especificidade e estabilidade, sendo essenciais na produção de antibióticos semissintéticos. Outras enzimas, como certas β -lactamases, têm sido investigadas para aplicações alternativas, como biotransformação de β -lactâmicos ou estudos de resistência bacteriana (Tishkov et al., 2010).

Embora avanços tenham sido feitos na compreensão dos mecanismos reacionais e na otimização dos processos, ainda há desafios na implementação industrial em larga escala, especialmente em termos de rendimento, produtividade e custos (Silva et al., 2023).

A continuidade das pesquisas nessa área deve permitir enfrentar esses desafios e contribuir para uma produção mais sustentável de 6-APA. A enzima penicilina acilase é a mais utilizada na hidrólise enzimática da penicilina G para gerar o 6-APA. No contexto industrial, essas enzimas atuam de maneira específica, quebrando a ligação amida entre o núcleo β -lactâmico e o grupo acila presente na PenG. Elas são produzidas por diversas cepas de bactérias e fungos, possuindo propriedades únicas (Shewale & Sudhakaran, 1997).

A utilização da enzima industrialmente apresenta algumas barreiras. Elas possuem custo elevado, são solúveis em água e apresentam-se em baixas concentrações. Desse modo, a recuperação da enzima no final da reação torna-se economicamente inviável. Esse problema pode ser resolvido através da imobilização da enzima.

Vários métodos já foram utilizados para a imobilização de enzimas, incluem adsorção, aprisionamento de fibras, microencapsulação, reticulação, copolimerização, ligação covalente entre outros (Sheldon & Van Pelt, 2018).

Diferentes materiais sintéticos, orgânicos, inorgânicos e híbridos com distintas características de tamanho, forma e densidade têm sido empregados para a imobilização de PGA José e Prado (2005).

Os avanços da tecnologia requerem novos materiais ou aperfeiçoamento dos materiais existentes ou tradicionais para sua utilização como suportes na imobilização de enzimas. Um exemplo de uma nova abordagem que leva a novos materiais é a síntese de material híbrido inorgânico-orgânico. Esses híbridos são alternativas promissoras na produção de novos materiais multifuncionais, com ampla gama de aplicações (Zdarta et al., 2018).

Entre os materiais orgânicos, o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, representa uma solução alternativa e econômica para ser utilizados como suporte para imobilização de enzimas. Entre eles o endocarpo de cumbaru (*Dipteryx alata* Vogel), espécie também referida como baru, castanha-de-bugre, cumarurana, da família Fabaceae, nativa no Pantanal e no Cerrado. Uma árvore adulta produz cerca de 1.500 frutos por ano, e em média o fruto pesa 25 g, sendo 30% polpa, 65% endocarpo lenhoso e 5% semente (Melo et al., 2017).

Os suportes inorgânicos, a exemplo da sílica (SiO_2), se destaca por possuir elevado potencial de aplicação para imobilização de enzimas, por apresentar uma série de características como a possibilidade de modificação da superfície, estabilidade térmica, estabilidade mecânica e segurança toxicológica e é um dos materiais multifuncionais mais descritos na literatura (Mendes et al., 2011). A sílica pode ser combinada com diversos compostos orgânicos ou inorgânicos apresentando novas propriedades físico-químicas ampliando suas aplicações.

A produção de matrizes híbridas já foram amplamente empregadas na presença de precursores silanos, tais como tetraetilortossilicato (TEOS) e tetrametilortossilicato (TMOS) devido a biocompatibilidade destes precursores com diversos polímeros, tais como álcool polivinil (PVA), celulose, carragenana, quitosana, entre outros (Kandimalla et al., 2006).

Neste contexto, o foco deste estudo é a preparação de um suporte híbrido orgânico-inorgânico para imobilizar a enzima penicilina G acilase, e a caracterização dos biocatalisadores resultantes.

OBJETIVO GERAL

Preparar um suporte híbrido composto por endocarpo de cumbaru e sílica para a imobilização da penicilina G acilase para obtenção de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) por hidrólise enzimática.

Objetivos específicos

- Preparar e ativar as partículas do endocarpo de cumbaru.
- Preparar o suporte híbrido, com sílica e diferentes porcentagens de partículas de endocarpo (1%, 1,5% e 2%).
- Ativar os suportes preparados com glutaraldeído e epícloridrina.
- Imobilizar a enzima PGA por ligação covalente no suporte ativado selecionado.
- Medir a atividade enzimática da PGA livre e imobilizada, além de calcular o rendimento de imobilização.
- Caracterizar os derivados preparados utilizando espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TGA), e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3. REVISÃO DE LITERATURA

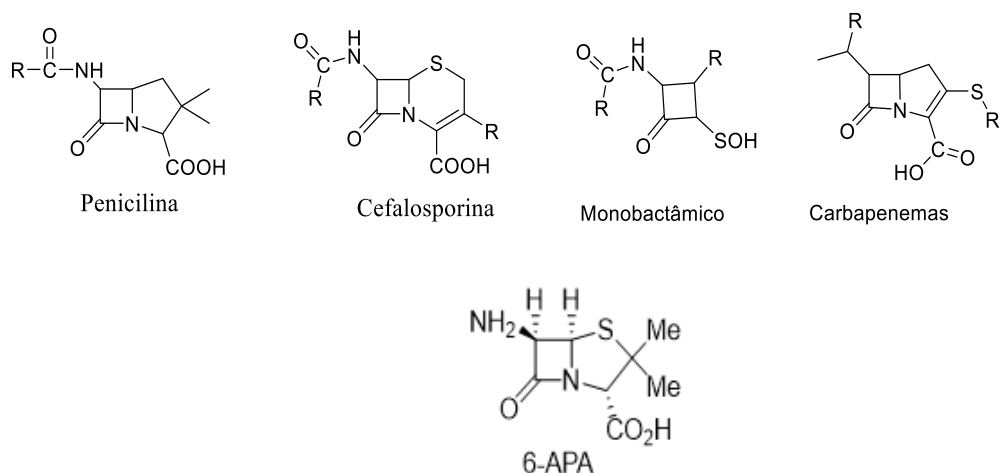
3.1 Antibiótico β -lactâmicos

Os antibióticos desempenharam um papel vital no tratamento e representaram aproximadamente 17% do total das vendas farmacêuticas. Apesar do grande número de laboratórios, o mercado farmacêutico foi altamente concentrado, especialmente de princípios ativos, levando a um elevado grau de dependência de importações. Esta concentração de ingredientes ativos e a dependência de alguns fornecedores globais criaram vulnerabilidades de abastecimento e afetaram os preços e a disponibilidade dos medicamentos. Além disso, as políticas regulatórias e de controle de qualidade variaram de país para país, o que afetou a consistência e a segurança dos produtos disponíveis no mercado (Ramírez-Rendon et al., 2022).

Embora muitas bactérias possuam genes de resistência que reconhecem esses antibióticos, elas produzem enzimas que hidrolisam e rompem as ligações β -lactâmicas e amida (C-N), catalisadas respectivamente pelas β -lactamases e amidases, reduzindo assim a duração e a eficácia terapêutica desses antibióticos (Bahr et al. 2021).

Além disso, os β -lactâmicos (Figura 1) representam 60% dos antibióticos semissintéticos injetáveis, incluindo carbapenemas, monobactamas, cefalosporinas e penicilinas, essenciais no tratamento de diversas infecções bacterianas. Esses antibióticos semissintéticos são produzidos pela reação de uma cadeia doadora de acila com um núcleo β -lactâmico, obtidos industrialmente pela hidrólise enzimática de antibióticos naturais como as penicilinas V e G. (Bahr et al. 2021).

Os antibióticos β -lactâmicos se caracterizam pela presença de um anel β -lactâmico, uma estrutura química crucial para sua ação antimicrobiana. Após a descoberta do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (Figura 1), os pesquisadores conseguiram desenvolver penicilinas semissintéticas com propriedades únicas, diferentes das penicilinas naturais produzidas por micro-organismos (Bertoncheli et Hörner (2008).

Figura 1- Estrutura dos β -lactâmicos e 6-aminopenicilânico (6-APA)

Fonte: Autor

Em 1965, Abraham sintetizou a ampicilina, um antibiótico β -lactâmico semissintético derivado da penicilina G. Este antibiótico foi eficaz contra algumas bactérias gram-negativas aeróbias, como *Escherichia coli*, e foi usado para tratar a meningite e infecções causadas por micro-organismos gram-positivos, como *pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium perfringens*.

A produção enzimática de antibióticos β -lactâmicos surge como alternativa sustentável em substituição aos métodos químicos tradicionais, que envolviam o uso de solventes perigosos e condições extremas (Bruggink; Roos; De Vroom, 1998). De acordo com os autores, a acilase da penicilina imobilizada mostrou-se um biocatalisador eficiente para a síntese em meio aquoso de amoxicilina e ampicilina.

3.2 Penicilina G Acilase (PGA)

De acordo com Adriano., et al (2020), a penicilina G acilase é uma enzima hidrolítica de grande importância biotecnológica que atua especificamente na clivagem da ligação amida entre o núcleo β -lactâmico e a cadeia lateral acila da penicilina G. Esse processo enzimático resulta na liberação do 6-aminopenicilânico (6-APA), um intermediário crucial para a síntese de penicilinas semissintéticas, e do ácido fenilacético como subproduto. A enzima é amplamente empregada na indústria farmacêutica, pois permite a produção em larga escala de derivados β -lactâmicos com propriedades terapêuticas

melhoradas, como maior estabilidade frente a β -lactamases e espectro de ação ampliado contra diferentes patógenos bacterianos. A estrutura da enzima é mostrada na Figura 2.

Figura 2 – Estrutura do PGA



Citação: McVey, C.E., Walsh, M.A., Dodson, G.G., Wilson, K.S., Brannigan, J.A.

A enzima é uma proteína globular e monomérica na maior parte dos organismos. É composta por cerca de 415 a 420 resíduos de aminoácidos dependendo da espécie.

A penicillin G acylase é uma enzima pertencente à família das hidrolases nucleofílicas N-terminais, desempenhando um papel central na hidrólise da penicilina G para gerar o 6-APA, precursor fundamental dos antibióticos semissintéticos β -lactâmicos. Essa enzima estabelece ligações catalíticas específicas que permitem não apenas a hidrólise, mas também a síntese de novos antibióticos com melhores propriedades farmacológicas. O seu desenvolvimento baseia-se em processos de fermentação microbiana, principalmente com *Escherichia coli*, bem como em estratégias de engenharia genética destinadas a aumentar sua produtividade e especificidade. A imobilização da PGA em diferentes suportes permitiu melhorar sua estabilidade, reutilização e tolerância a solventes orgânicos, reforçando assim o seu potencial industrial. Esses avanços conduziram a processos de síntese mais limpos, competitivos e economicamente viáveis para a produção de β -lactâmicos (Arroyo et al., 2003)

A demanda anual de PGA situou-se entre 10 e 30 milhões de toneladas. Nas últimas duas décadas, a produção de antibióticos β -lactâmicos aumentou

consideravelmente para atender a essa demanda. As indústrias farmacêuticas adotaram processos enzimáticos mais eficazes em substituição aos métodos tradicionais de hidrólise da penicilina, alcançando uma eficiência de produção de cerca de 80 a 90% (Elander, 2003).

Um exemplo notável da transição de um processo químico para um processo enzimático foi à utilização da penicilina G Acilase imobilizada. Essa enzima tornou-se a segunda enzima mais utilizada na indústria mundial, depois da glicose isomerase (Adriano et al., 2005).

A síntese enzimática destacou-se por suas diversas vantagens, incluindo a realização em condições suaves, como meio aquoso, pH neutro e temperatura ambiente, o que contribui para um processo mais sustentável. Contudo, para que esse método fosse viável, tornou-se essencial imobilizar a enzima, devido ao elevado custo do biocatalisador e à necessidade de reaproveitá-lo para otimizar os custos (Santos & Oliveira, 2018).

3.3 Imobilizações de enzimas

A hidrólise enzimática envolve o uso de enzimas para decompor moléculas em unidades menores, geralmente na presença de água. Com a imobilização das enzimas, esse processo se torna mais eficiente e estável, pois as enzimas podem ser reutilizadas e são mais resistentes. Isso permite reduzir os custos associados ao uso de enzimas livres, mantendo uma alta atividade enzimática (Souza et al., 2017).

As enzimas imobilizadas apresentam um grande potencial como catalisadores na indústria. Sua alta atividade em condições suaves de temperatura e pH as torna alternativas valiosas para processos em que os reagentes e/ou produtos são instáveis e se decompõem em condições extremas, como é o caso dos produtos farmacêuticos (Leite, 2009).

De acordo com Ferreira (2004), a utilização de enzimas na indústria enfrentou vários desafios. Seu alto custo, solubilidade em água e baixa disponibilidade

dificultaram sua recuperação após a reação, tornando o processo oneroso. No entanto, a imobilização das enzimas permitiu superar esses obstáculos.

Em processos de aplicação enzimática, a imobilização de enzimas em suportes sólidos pode oferecer diversas vantagens, incluindo a capacidade de ser usada repetidamente, melhoria da estabilidade da enzima e ampliação da faixa ideal de pH da enzima. Estes são aspectos críticos no desenvolvimento de processos enzimáticos que estão intimamente ligados à economia do processo (Gonzatti, 2024).

Diferentes métodos podem ser utilizados para imobilizar a PGA, tais como adsorção, aprisionamento em fibras, micro encapsulamento, reticulação, copolimerização e ligação química, entre outros (Adriano et al., 2005). Sendo a ligação covalente particularmente importante porque leva à preparação de derivados enzimáticos estáveis Santos (2014). Grupos funcionais adequados são essenciais para realizar tal técnica de imobilização.

De acordo com Adriano et al. (2005), pesquisas sobre a imobilização da penicilina G acilase (PGA) em quitosana ativada com glutaraldeído foram realizadas visando ao desenvolvimento de um biocatalisador estável e de baixo custo. Foram testadas duas metodologias: imobilização por ligação covalente em um único ponto e por ligação multipontual. Os resultados indicaram que a fixação multipontual proporcionou à enzima maior resistência térmica e alcalina, com uma meia-vida de até 40 horas em condições operacionais. O estudo destacou o potencial da quitosana como um suporte de imobilização econômico e viável para aplicações industriais.

O estudo de Leite (2009) demonstrou que a combinação de adsorção, estabilização em pH 9 e reticulação com glutaraldeído foi eficaz para imobilizar a enzima β -galactosidase na resina Duolite A568, resultando em um aumento de 44% na atividade enzimática em comparação com métodos isolados. Além disso, a enzima imobilizada mostrou maior estabilidade térmica, mantendo 77% de sua atividade após 140 minutos a 55°C, e manteve-se funcional mesmo após 100 dias de armazenamento, comprovando a eficiência da técnica na preservação da atividade enzimática em condições desafiadoras. Esses resultados destacam o potencial dessa abordagem para aplicações industriais, onde a durabilidade e o desempenho das enzimas são essenciais.

De acordo com José e Prado (2005) uma variedade de materiais sintéticos, orgânicos, inorgânicos e híbridos, caracterizados por diferentes tamanhos, formas e densidades, podem ser utilizadas para imobilizar a PGA.

3.4 Suporte híbrido

Os materiais utilizados como suporte de imobilização podem ser classificados com base em sua composição e estrutura. Quanto à composição (Tabela 1), eles puderam ser categorizados em orgânicos e inorgânicos (Messing, 1975).

Tabela 1. Classificação dos suportes em relação à sua composição

Natureza	Classificação do suporte	Suporte
Natural	Orgânico	• Polissacarídeos: Celulose, dextranas, ágar, agarose, quitina, quitosana, alginato, carragenana. • Proteínas: Colágeno, albumina • Carbono
	Inorgânico	bentonita, sílica
Sintético	Orgânico	• Poliestireno • Poliacrilato, polimetacrilato, poliamidas, poliacrilamida
	Inorgânico	Materiais processados: vidro (não poroso e poro controlado), metais, Óxidos.

Do ponto de vista físico, materiais inorgânicos foram mais adequados para aplicações industriais devido às suas propriedades que minimizaram alterações sob variações de temperatura, pressão e pH. No entanto, materiais orgânicos foram preferidos devido à sua capacidade de incorporar grupos funcionais reativos que puderam interagir com enzimas (Pereira, 1999).

Os suportes inorgânicos, como a sílica (SiO_2), destacam-se por suas diversas propriedades favoráveis para a imobilização de enzimas. A modificação fácil da superfície, a resistência térmica e mecânica e a segurança quanto à toxicidade tornam esses materiais adequados para diferentes aplicações nos setores industrial e biotecnológico. Além disso, podem ser combinados com compostos orgânicos e

inorgânicos, melhorando suas características físico-químicas e ampliando suas possibilidades de uso (Benvenutti et al., 2009).

A escolha de materiais orgânicos é impulsionada pela sua capacidade de se adaptar a diferentes métodos de imobilização, o que facilita a introdução de grupos funcionais na superfície para a ligação de biocatalisadores. No entanto, esses materiais apresentaram como principal desvantagem sua menor resistência química e mecânica Carvalho, Lima e Soares (2015).

Entre os materiais orgânicos, tem sido utilizados resíduos agroindustriais tais como o bagaço de cana-de-açúcar, as cascas de coco, as fibras de palma e as cascas de café entre outros. Dessa forma, o endocarpo de cumbaru apresenta-se como uma alternativa promissora, devido sua disponibilidade abundante na região centro-oeste.

A imobilização enzimática é um campo em constante evolução que requer a melhoria contínua dos suportes existentes. Como destacam Boudrant et al. (2020) em sua revisão, os recentes avanços tecnológicos exigem o desenvolvimento de novos materiais, particularmente híbridos orgânicos-inorgânicos. Essa perspectiva é corroborada pelos trabalhos de Zdarta et al. (2018), que evidenciam o potencial desses suportes compostos para criar microambientes otimizados que favorecem a estabilidade e a atividade das enzimas imobilizadas. Esses suportes híbridos são particularmente atraentes porque melhoram as propriedades dos materiais originais, o que se traduz em uma melhor eficiência enzimática.

Entre os precursores silânicos mais comuns para a síntese de materiais híbridos à base de sílica estão o tetrametilortossilicato (TMOS) e o tetraetilortossilicato (TEOS). Por apresentarem baixa miscibilidade em água, sua hidrólise é frequentemente conduzida com o auxílio de solventes alcoólicos, que atuam como co-solventes (Benvenutti et al., 2009). Independentemente da estratégia utilizada na preparação de uma matriz híbrida, o processo sol-gel é, indiscutivelmente, o mais empregado. O processo sol-gel envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros (Benvenutti et al., 2009).

Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e

homogeneidade do produto (Senna et al. (2013). Além disso, aditivos químicos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle de porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico Paula et al., (2008).

Os suportes híbridos à base de sílica/lignina e sílica/quitosana representam uma abordagem inovadora no campo de materiais catalíticos e adsorventes. A sílica, conhecida por sua alta área superficial e estabilidade térmica, é frequentemente utilizada como suporte para nanopartículas metálicas. No entanto, ao combinar a sílica com biopolímeros como a lignina e a quitosana, é possível melhorar as propriedades mecânicas, a biocompatibilidade e a capacidade de adsorção dos materiais. A lignina, um polímero natural abundante em plantas, confere uma estrutura porosa e uma afinidade por compostos orgânicos (Zhou et al. 2020; Figueiredo et al., 2018), enquanto a quitosana, derivada da quitina, oferece propriedades antibacterianas e capacidade de quelação de metais pesados (Wang et al., 2020; El Kadib et al., 2015).

Esses suportes híbridos podem ser utilizados em diversas aplicações, como catálise heterogênea, adsorção de poluentes e liberação controlada de medicamentos, oferecendo uma alternativa sustentável e ecológica aos suportes tradicionais. Dentre esses materiais promissores, a lignina e o PHBV (poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)) destacam-se especialmente por seu potencial no desenvolvimento de suportes híbridos inovadores e ecologicamente corretos.

Os suportes híbridos à base de sílica e materiais orgânicos como, a lignina e o PHBV, oferecem propriedades únicas, adequadas a diversas aplicações. Segundo Klapiszewski et al. (2012), a combinação de sílica e lignina, um subproduto da indústria de papel, permite criar materiais com propriedades de adsorção aprimoradas, graças aos grupos funcionais da lignina (fenólicos e carboxílicos) e à alta área superficial da sílica. Em resumo, a sílica/lignina é principalmente utilizada para a adsorção de metais pesados, enquanto a sílica/PHBV é mais adequada para aplicações biomédicas, devido à sua flexibilidade e biocompatibilidade. Os trabalhos de Klapiszewski et al. (2012) e Ciesielczyk et al. (2011) fornecem bases sólidas para compreender as vantagens e limitações desses materiais híbridos.

3.5 Cumbaru (*Dipteryx alata*)

A árvore de Cumbaru (Figura 3), que pode atingir uma altura de 20 a 30 metros. Valorizado por seus múltiplos usos, especialmente na indústria madeireira, caracterizou-se por um crescimento rápido, produção abundante de folhas, bom estabelecimento de mudas e baixas exigências de fertilização (Carvalho, 2003).

Figura 2- Árvore de Cumbaru.

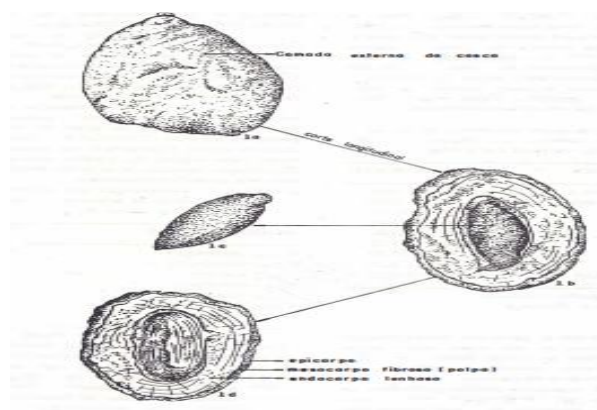


Fonte: Julcéia Camillo

O Cumbaru produz frutos a cada dois anos e tem uma longevidade de até 1.000 anos (Carvalho, 2003). Uma árvore madura produz cerca de 1.500 frutos por ano, com cada fruto pesando aproximadamente 25 gramas, sendo composto por 65% de endocarpo lenhoso (MELO et al., 2017).

O fruto do cumbaru (Figura 4), nativo da América do Sul e amplamente distribuído no Brasil, possui um endocarpo com comprimento variando de 4 a 6 cm e diâmetro de 3 a 4 cm.

Figura 3- O fruto do cumbaru (*Dipteryx alata*) é descrito em três partes: a polpa (mesocarpo), o endocarpo e a semente (amêndoa)



Fonte: José Felipe Ribeiro

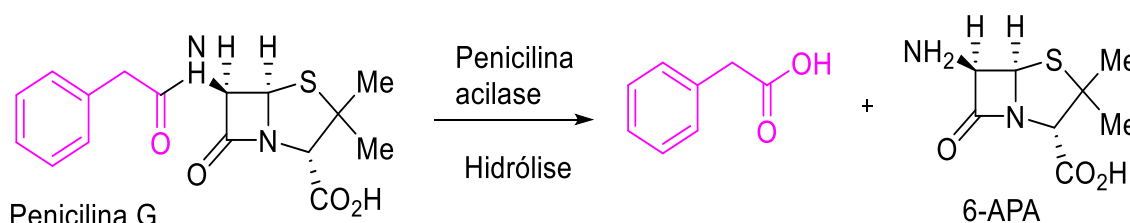
O cumbaru (ou Baru) é um fruto rico em compostos químicos, conferindo-lhe grande valor industrial e econômico. Segundo Vallilo et al. (1990), suas sementes contêm lipídios, proteínas e carboidratos, tornando-as uma importante fonte nutricional. Takemoto et al. (2001) também evidenciaram a presença de ácidos graxos insaturados, como o ácido oleico e linoleico, benéficos para a saúde e utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

De fato, o cumbaru é uma espécie de grande valor devido à sua rica composição química e seus múltiplos usos, apoiados pelos trabalhos dos autores supracitados.

3.6 Hidrólise da Penicilina G

As penicilinas semissintéticas são obtidas através da hidrólise química ou enzimática da penicilina natural para extrair o seu componente fundamental, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Esse composto serve como matéria-prima para a síntese de diferentes derivados de penicilina (PEREIRA et al., 2016), conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 4- Reação de hidrólise da Penicilina G catalisada por PGA



Fonte: Autor

Tavares 2020 explicou que, durante a hidrólise, é possível introduzir cadeias laterais no anel do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), permitindo a criação de novos tipos de penicilinas semissintéticas que diferem das encontradas na natureza. Essas penicilinas semissintéticas oferecem vantagens significativas, como uma atividade antimicrobiana mais eficaz, o que impulsionou sua ampla aplicação na quimioterapia.

De acordo com Ferreira, 2004, os processos específicos da hidrólise da penicilina incluem a limitação da transformação devido ao equilíbrio químico, a inibição causada pelo ácido fenilacético como subproduto, a formação de sais devido ao controle de pH e os desafios na separação e purificação devido à similaridade dos compostos. Para lidar com esses problemas, sistemas líquidos bifásicos, que combinam

água e solvente orgânico, foram considerados como uma alternativa viável. No entanto, devido à estrutura quimicamente semelhante dos componentes, os coeficientes de partição não são suficientemente distintos para permitir uma conversão completa em um único estágio. Assim, o uso de um extrator de contracorrente e de múltiplos estágios se torna-se necessário.

De acordo com Abian et al. (2003), a hidrólise da penicilina G em presença de solventes orgânicos haviam simplificado a produção de 6-APA, mas enfrentaram desafios devido à baixa estabilidade e inibição da acilase de penicilina G imobilizada. Por exemplo, observaram que o uso de solventes orgânicos como a metil isobutil cetona degrada a estabilidade e a eficácia catalítica da penicilinase G.

Além disso, sistemas aquosos bifásicos polímero-sal mostraram que os copolímeros em bloco são mais eficazes para separar o 6-APA e o ácido fenilacético (AFA) em comparação com copolímeros aleatórios, embora a presença de misturas reduza a seletividade devido às interações moleculares (Silva et al., 2006).

Sawant et al. (2020) projetaram um sistema trifásico que permitiu atingir uma produtividade de 80% para o 6-APA, embora as constantes cinéticas não tenham sido documentadas. Desenvolveram um processo de purificação em três etapas, oferecendo um produto de alta pureza, com dados mais detalhados sobre os parâmetros cinéticos.

A exploração do 6-APA apoia-se numa dança molecular onde cada elemento desempenha um papel crucial, e onde os pesquisadores reconstruíram metodicamente seus mecanismos para revelar seus mistérios. Batchelor et al. (1959)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

Penicilina G (PG), penicilina G acilase (PGA), ácido 6-Aminopenicilânico (6-APA) e ortossilicato de tetraetila (TEOS), adquiridos de Sigma-Aldrich. Hidróxido de sódio micro pérolas P.A. 100%, ácido clorídrico, fosfato de sódio monobásico anidrido 98%, fosfato de sódio Bibásico anidro P.A., álcool etílico, ácido acético, periodato de sódio, reagente PDAB (para-dimetilamino benzaldeído), dioxano.

4.2 Métodos

4.2.1. Preparação e tratamento das partículas do endocarpo de cumbaru

O endocarpo do Cumbaru foi retirado do fruto e imerso em água deionizada por 2 horas, filtrado e posto em uma estufa para secagem, por 24 h à temperatura de 60 °C. Logo em seguida, foi realizada a moagem do endocarpo seco em um micro moinho Willye, modelo R-TE-648. Depois da trituração, os tamanhos das partículas foram separados em sistema de peneiras de acordo com a norma ABNT.

As partículas do endocarpo de cumbaru com tamanho entre $200 \geq X \geq 325$ mesh foram tratadas de acordo com a metodologia adaptada de Nowacka et al., 2013. Inicialmente as partículas foram dispersas em uma solução de dioxano: água (9:1, v/v) com adição de um oxidante forte: periodato de sódio 20% dissolvido em água destilada e colocada em agitação por 30 min. Após esse período foi filtrado e secado em estufa a 70°C.

4.2.2. Preparação do suporte híbrido e ativação

O suporte híbrido sílica (SiO₂)/endocarpo cumbaru foi preparado conforme metodologia adaptada de Paula et al., (2007) com modificações, inicialmente foram colocados 11 mL de etanol e adicionadas as partículas de endocarpo de cumbaru em diferentes proporções variando entre 1%, 1,5% e 2% (m/v) agitados por um período de 2 min e logo adicionado 5 mL tetraetilortossilicato (TEOS) e 0,1 mL de ácido clorídrico

concentrado. Essa mistura foi aquecida e mantida sob agitação magnética em banho a 60 °C durante 1 h. Em seguida, a mistura foi transferida para um molde de silicone e levado à secagem a temperatura ambiente até completa solidificação do material. O suporte foi então triturado até que o material passasse completamente por uma peneira padrão série Tyler de 42 mesh, a fração retida em peneira de 60 mesh foi utilizada.

Em seguida, o suporte híbrido foi ativado com uma solução de glutaraldeído e com uma solução de epícloridrina a 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) na proporção de 1:10 de massa de suporte para volume de solução, respectivamente. A mistura foi mantida sobre agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Após a ativação, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão, e depois seco em estufa a 60 °C por 24 horas.

4.2.3 Caracterização do suporte

4.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras destinadas à análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram previamente preparadas, uma pequena massa de amostra foi colocada na ponta de uma espátula e, em seguida, transferida para um frasco contendo etanol. A mistura foi submetida a tratamento por ultrassom durante 10 minutos para dispersar as partículas. Após esse processo, as partículas maiores foram deixadas decantar, enquanto os menores, presentes no sobrenadante, foram cuidadosamente coletados. Essas partículas finas foram então espalhadas de forma adequada sobre um suporte, os quais foram fixados em *stubs* de latão utilizando fita de carbono dupla face e recoberta com uma fina camada de ouro por meio de sputtering, utilizando o equipamento Desk III da Denton Vacuum. A análise foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura Jeol, modelo JSM-6380 LV, no Laboratório Multiusuário de Análise de Materiais (MULTILAM), no Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em Campo Grande, MS.

4.2.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

O espectro na região do infravermelho (IV) foi coletado utilizando o espectrômetro BOMEM Hartmann & Braun, modelo The Michelson series MB-100, abrangendo a faixa espectral de 500 a 4000 cm^{-1} . A análise foi realizada com uma

resolução de 4 cm^{-1} , acumulando 6 ciclos de varredura a uma velocidade de $0,2\text{ cm/s}$. As amostras foram preparadas dispersando-se em KBr de grau espectroscópico e, em seguida, prensadas com aproximadamente 6 toneladas de pressão usando uma prensa mecânica. Os dados foram obtidos no Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos (LFT) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição.

4.2.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

O equipamento utilizado para análise termogravimétrica foi o STA 449 F3 Jupiter (Netzsch). A análise foi realizada em atmosfera de ar com fluxo de gás de 60 mL/min , em uma faixa de temperatura de 25 a $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ e com taxa de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C/min}$.

4.2.4 Imobilização por ligação covalente de PGA em suporte híbrido

A enzima PGA foi imobilizada em suporte híbrido ativada com glutaraldeído seguindo uma metodologia previamente desenvolvida (Braun et al., 1989) que foi ligeiramente modificada. A enzima foi dissolvida em tampão fosfato $0,1\text{M}$ a $\text{pH } 8,0$ e adicionada ao suporte ativado (1g de suporte para 10 mL de solução). A preparação foi mantida sob agitação suave (100 rpm) a 28°C por 22 horas em movimento rotatório circular (agitador orbital).

4.2.5 Curva de calibração

A curva de calibração foi obtida mediante a medição das absorbâncias em um comprimento de onda de 240 nm de soluções padrão de 6-APA na faixa de concentração de $0,0005$ a $0,005\text{ mol/L}$. Os dados obtidos foram ajustados a uma reta dada pela Equação 1 (CANASSA et al., 2018).

$$Abs = a + b \cdot C \quad (1)$$

Donde *Abs* é a absorbância e é dada em função da concentração *C* por meio de uma equação de reta com coeficientes lineares *a* e angular *b*.

4.2.6 Determinação da Atividade enzimática por Método colorimétrico do PDAB

Este método foi realizado seguindo a metodologia de Balasingham et al., 1972, que mede a atividade da penicilina G acilase usando o reagente p-dimetilamino

benzaldeído (PDAB). A técnica se baseia na formação de uma base de Schiff através da reação do 6-APA com PDAB. O ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), gerado durante a hidrólise da penicilina G, reage com o PDAB, resultando em um produto colorido. Este produto foi monitorado em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 415 nm. A leitura foi relacionada a concentração de 6-APA por meio de uma curva de calibração.

A hidrólise da penicilina G foi realizada a 37 °C em um reator encamisado. Inicialmente foi adicionado 5 mL de uma solução de penicilina G a 4% (m/v) em tampão fosfato 100 mM com pH 8 e após atingir a temperatura desejada, 1 mL de solução de PGA foi adicionada sob agitação suave. Amostras de 0,25 mL foram retiradas a cada 5 minutos e colocadas em cubetas contendo 0,5 mL de PDAB 0,5% m/v em metanol, 2 mL de ácido acético 20% v/v e 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio 0,05M. Após 2,5 minutos de reação foi medida a absorbância de cada amostra.

A partir dos valores de concentração de 6-APA, foi construído um gráfico da concentração vs tempo e a tangente da curva foi usada para calcular as atividades enzimáticas utilizando a equação 2 (Leite, 2009).

$$Atividade = \frac{(\mu\text{mol } 6\text{APA}/\text{mL}_{\text{sol}}\text{min}) * \text{vol}_{\text{sol}}(\text{mL})}{V_{\text{enzima}}} = UI/\text{mL}_{\text{enzima}} \quad (2)$$

Uma unidade internacional (UI) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de 6-APA, a partir de penicilina G em 1 minuto a 37°C e pH 8,0.

A carga enzimática do derivado foi calculada medindo a diferença entre as atividades enzimáticas do sobrenadante (enzima livre) antes (At_0) e após (At_t) imobilização (Adriano et al., 2005). O rendimento de imobilização (RI) foi calculado com a equação 3:

$$RI(\%) = \frac{At_0 - At_t}{At_0} \times 100 \quad (3)$$

5. RESULTADOS

A seguir, são apresentados os resultados obtidos na caracterização do suporte híbrido e da imobilização enzimática, bem como na determinação da atividade enzimática e o cálculo do rendimento de imobilização.

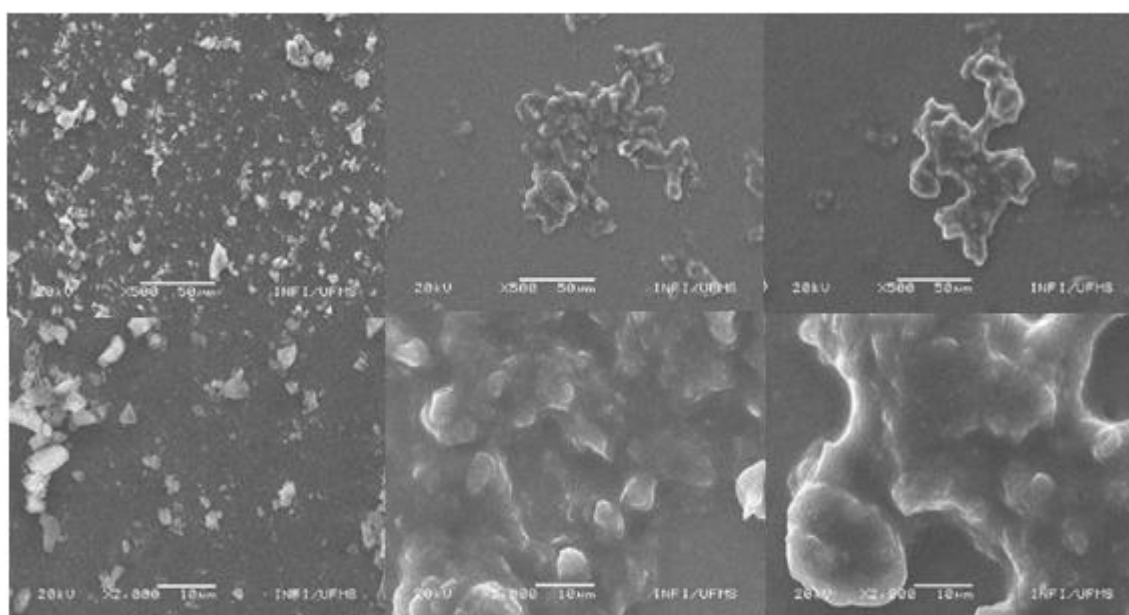
5.1 Caracterizações do suporte híbrido

O suporte preparado a partir do endocarpo do cumbaru e sílica foi caracterizado quanto à morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV), à composição por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e à resistência térmica por análise termogravimétrica (TGA).

5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 6 são apresentadas as imagens das amostras dos suportes: sílica e endocarpo de cumbaru, sem e com tratamento.

Figura 5- Imagens ampliadas 500 e 2000x de sílica, Cumbaru e Cumbaru tratado



Sílica

Cumbaru

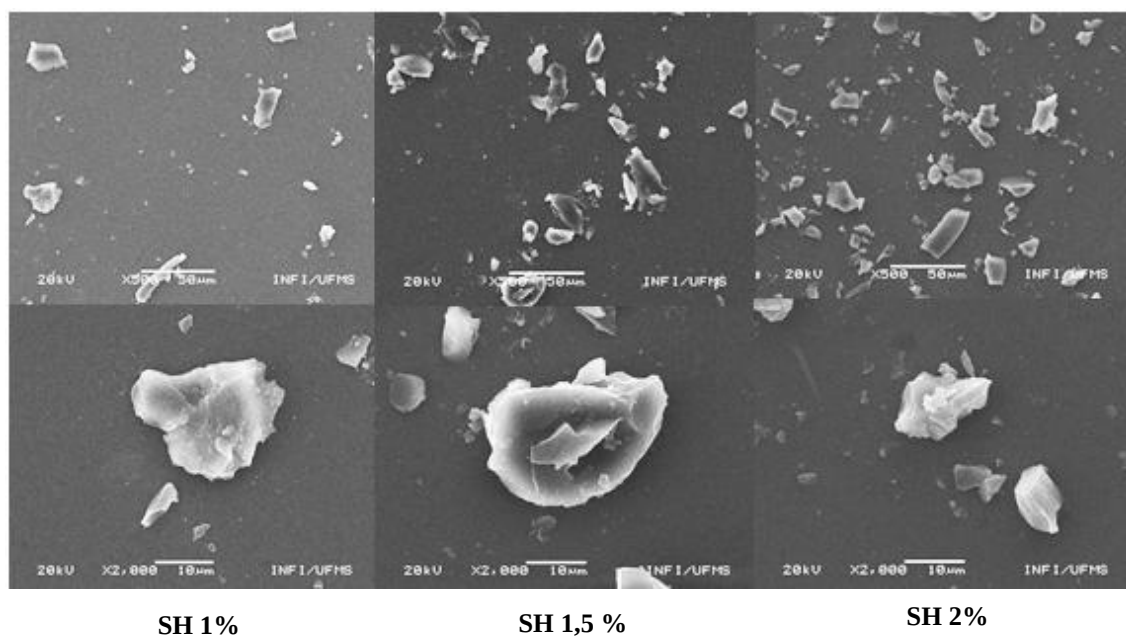
Cumbaru tratada

As análises por MEV (Figura 6) evidenciam as diferenças morfológicas fundamentais entre a sílica, o Cumbaru e o Cumbaru tratado. A sílica se distingue por uma estrutura em que as partículas individuais, de tamanho homogêneo, aparecem finamente dispersas

e relativamente espaçadas, formando uma rede porosa e integrada, uma morfologia ideal para aplicações que requerem alta área de superfície específica e boa acessibilidade. É ela que apresenta a diferença mais marcante. Em oposição, o Cumbaru apresenta uma arquitetura fibrosa e densa, onde as partículas estão fortemente aglomeradas em feixes compactos e conglomerados, deixando pouco espaço livre entre elas, uma estrutura representativa da matéria lignocelulósica bruta. Quanto ao Cumbaru tratado, ele se aproxima mais da morfologia do Cumbaru do que da sílica, mantendo uma estrutura aglomerada, fragmentada e desagregada. No entanto, observa-se uma tendência em direção a uma melhor dispersão, com uma distribuição e um tamanho de partículas que se aproximam aqueles da sílica de referência. Dessa forma, o tratamento permitiu que o biomaterial se orientasse para um estado de dispersão similar, tornando-o morfologicamente mais apto para servir como suporte.

Na Figura 7 são apresentadas as imagens dos suportes híbridos preparados com sílica e diferentes proporções de endocarpo de cumbaru 1%, 1,5% e 2% (SH 1%, SH 1,5%, SH 2%).

Figura 6- Imagens ampliadas (500x e 2000x) dos suportes híbridos com sílica e diferentes proporções de endocarpo de cumbaru (1%, 1,5% e 2%).

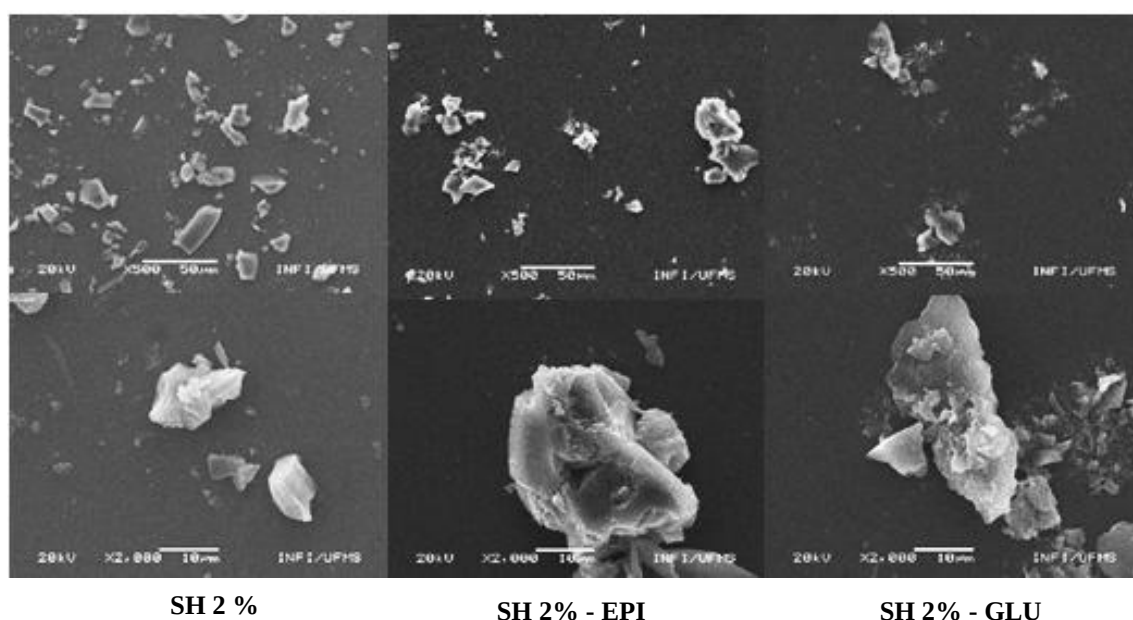


Conforme ilustrado na Figura 7, a superfície dos suportes exibe pouca variação morfológica significativa em função do percentual de endocarpo de cumbaru. Portanto,

a seleção recaiu sobre a formulação com 2% para as ativações posteriores. O critério baseou-se no potencial de valorizar ao máximo o resíduo lignocelulósico, uma vez que a similaridade observada indica que propriedades físico-estruturais adequadas são mantidas mesmo na maior concentração testada.

As imagens dos suportes híbridos preparados com sílica e 2% de endocarpo de cumbaru (SH 2%) e posteriormente ativados com epicloridrina (SH 2%-EPI) e glutaraldeído (SH 2%-GLU) são mostrados na Figura 8.

Figura 7 - Imagens ampliadas (500x e 2000x) dos suportes preparados com sílica e 2% de endocarpo de cumbaru sem tratamento (SH 2%) e ativados com epicloridrina (SH 2%-EPI) e glutaraldeído (SH 2%-GLU).



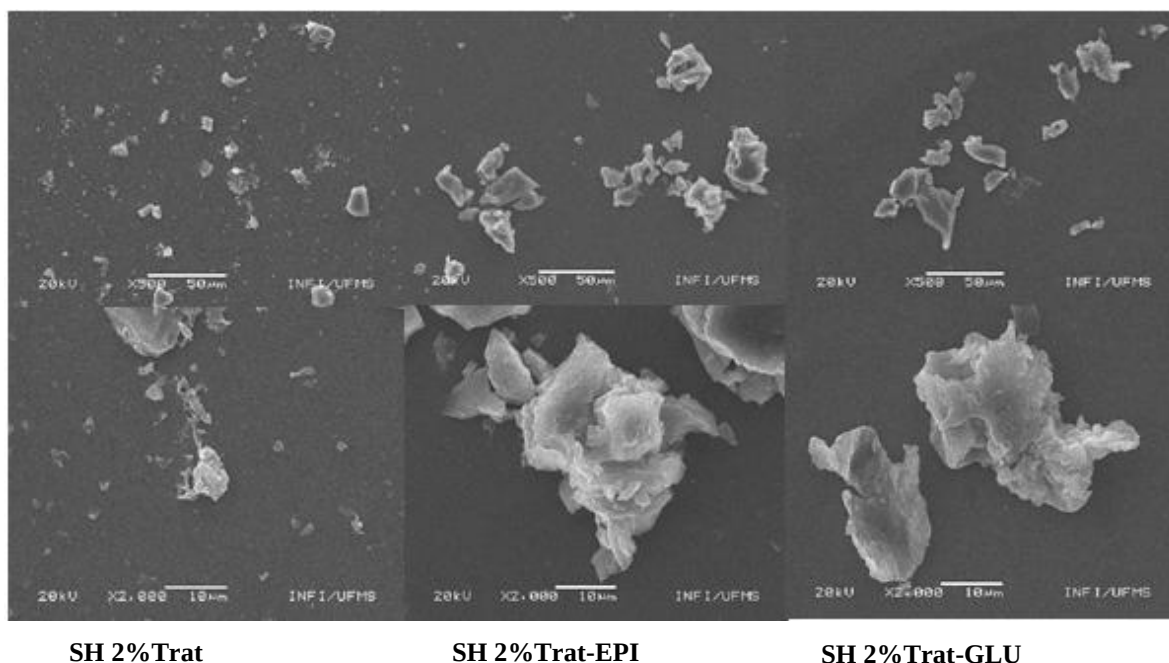
A ativação química com epicloridrina e glutaraldeído induz alterações morfológicas nos suportes híbridos.

Ao comparar os suportes contendo 2% de endocarpo de cumbaru, observa-se uma similaridade marcante entre as amostras, caracterizada pela forte tendência de aglomeração das partículas, independentemente do tipo de tratamento empregado. Nas três formulações (SH 2%, SH 2%-EPI e SH 2%-GLU) ocorre a formação de aglomerados compactos, confirmando que a presença do resíduo lignocelulósico influencia de maneira significativa a organização das estruturas. Entretanto, algumas distinções podem ser notadas: o tratamento com epicloridrina (SH 2%-EPI) promove a

formação de partículas mais volumosas, enquanto o tratamento com glutaraldeído (SH 2%-GLU) resulta em uma organização mais uniforme e estável. Essa maior homogeneidade estrutural, aliada à eficácia da ativação química, torna o suporte SH 2%-GLU mais promissor para aplicações posteriores, especialmente por favorecer uma melhor distribuição dos sítios ativos disponíveis para a imobilização enzimática.

Na Figura 9 são apresentadas as imagens dos suportes híbridos preparados com sílica e 2% de endocarpo de cumbaru com tratamento (SH 2%Trat) e posteriormente ativados com epícloridrina (SH 2%Trat-EPI) e glutaraldeído (SH 2%Trat-GLU).

Figura 8- Imagens ampliadas (500x e 2000x) do suporte híbrido preparado com sílica e 2% de endocarpo de cumbaru tratado (SH 2%Trat), ativado com epícloridrina (SH 2%Trat-EPI) e glutaraldeído (SH 2%Trat-GLU).



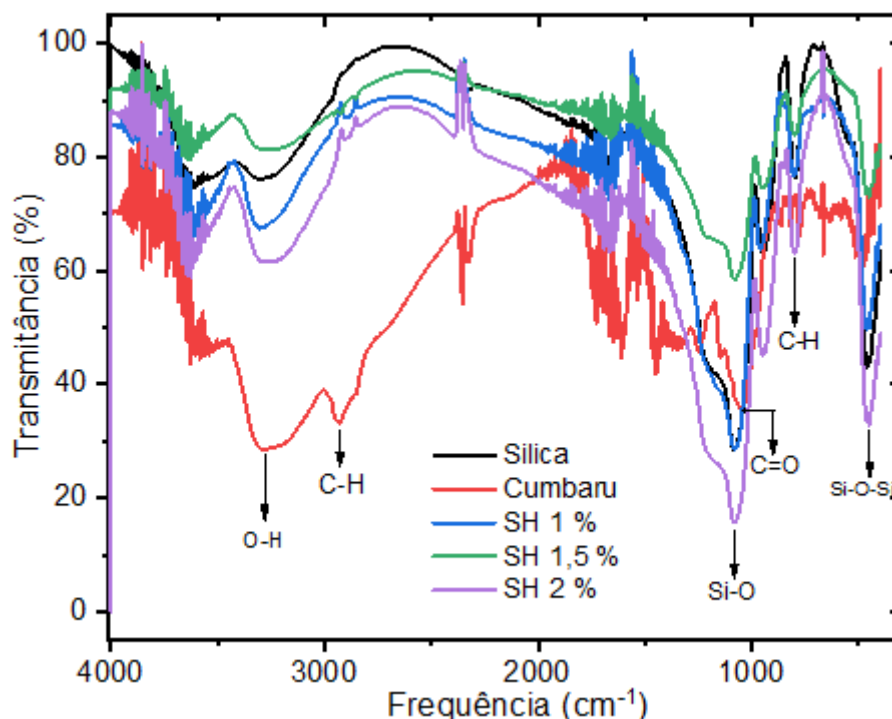
Conforme observado nas Figuras 8 e 9, não há diferenças significativas entre as superfícies dos suportes híbridos preparados com sílica e 2% de endocarpo de cumbaru, tanto sem tratamento (Figura 8), quanto com tratamento (Figura 9), após ativação com epícloridrina e glutaraldeído. Consequentemente o suporte híbrido preparado com 2% de endocarpo de cumbaru ativado com glutaraldeído foi selecionado inicialmente para imobilização da enzima. Esta escolha fundamenta-se na reconhecida eficiência do glutaraldeído em processos de fixação de enzimas, proporcionando condições ideais para avaliar o potencial do biomaterial.

Para compreender melhor as modificações químicas induzidas por essa ativação, foi realizada uma análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros obtidos permitem identificar os grupos funcionais envolvidos no processo e confirmar a eficácia da ativação do suporte.

5.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros obtidos inicialmente foram das amostras de sílica e endocarpo de cumbaru como referências e suportes híbridos preparados com sílica e 1%, 1,5% e 2% de partículas de cumbaru (SH 1%, SH 1,5%, SH 2%), cujos resultados são mostrados na Figura 10.

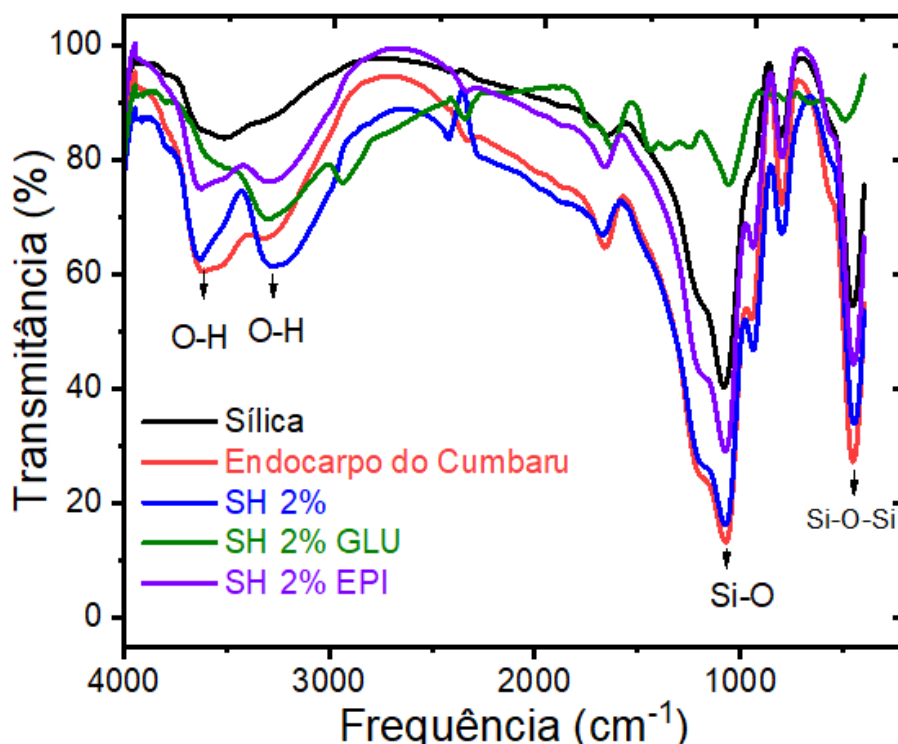
Figura 9- Espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier da sílica, do endocarpo de cumbaru e dos suportes híbridos preparados com sílica e 1%, 1,5% e 2% de endocarpo de cumbaru.



Como pode ser observado na Figura 10 somente os espectros da sílica e cumbaru puros apresentam diferenças características, enquanto os suportes híbridos preparados com sílica e diferentes porcentagens de endocarpo de cumbaru não mostram diferenças significativas quanto aos picos, somente variando a intensidade; confirmando-se a selecionado da preparação com a maior proporção (2%) do resíduo de endocarpo de cumbaru como suporte híbrido para estudos posteriores.

Nas Figuras 11 e 12 são apresentados os espectros obtidos das amostras de sílica e endocarpo de cumbaru como referências e suportes híbridos preparados com sílica e 2% de partículas de cumbaru (SH 2%) e posteriormente ativados com glutaraldeído e epícloridrina (SH 2% GLU e SH 2% EPI) e suportes híbridos preparados com sílica e 2% de partículas de cumbaru com tratamento (SH 2%Trat) e posteriormente ativados com glutaraldeído e epícloridrina (SH 2%Trat-GLU e SH 2%Trat-EPI).

Figura 10- Espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier dos suportes híbridos preparados com sílica e 2% de endocarpo de cumbaru, ativados com epícloridrina e glutaraldeído.

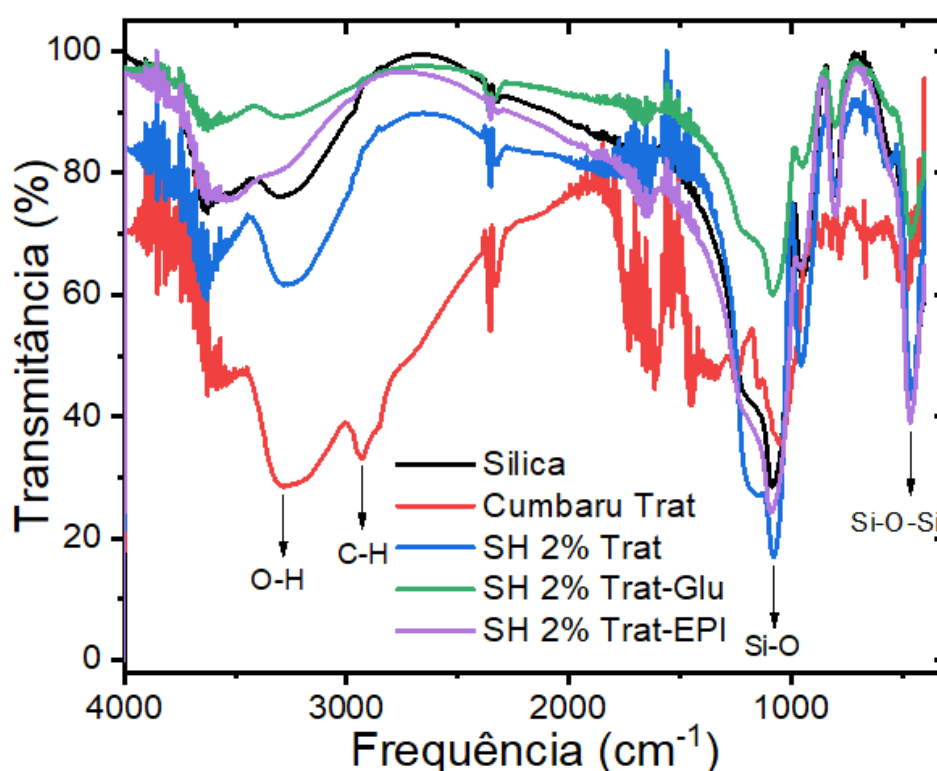


Como observado na Figura 11 do espectro FT-IR, destaca-se diversas bandas características que indicam modificações químicas induzidas pelos tratamentos aplicados. A banda em torno de 3321 cm^{-1} é atribuída a vibrações de alongamento do grupo O-H resultante de água adsorvida ou hidroxilas de superfície (Silverstein; Webster, 1998), enquanto a banda em torno de 3641 cm^{-1} sugere a presença de hidroxilas livres, frequentemente associadas a silicatos (Madejová, 2003). Na nossa interpretação do espectro, atribuímos a banda a 1662 cm^{-1} , localizada na região de números de onda intermediários, às vibrações de deformação da água adsorvida e dos grupos C=O das estruturas carboniladas. A presença de uma banda em torno de 1090 cm^{-1} confirma a vibração das ligação Si-O, características de silicatos ou

polissacarídeos (Liu et al., 2017), enquanto o sinal em 804 cm^{-1} está associado a deformações fora do plano das ligações C-H aromáticas (Coates, 2000).

Finalmente, na região de baixo número de onda, a banda em aproximadamente 467 cm^{-1} corresponde às vibrações de deformação das ligações Si-O-Si, destacando uma estrutura de silicato (Liu et al., 2017). A banda em 2603 cm^{-1} , por outro lado, é frequentemente atribuída a vibrações assimétricas de ligações O-H (Colthup et al., 1990).

Figura 11- Espectro das amostras de suportes híbridos preparados com sílica e 2% de endocarpo de cumbaru com tratamento.



Essas observações (Figuras 11 e 12) confirmam que as ativações com epícloridrina e glutaraldeído introduziram grupos funcionais orgânicos e modificaram a estrutura da superfície, mantendo a matriz de sílica.

A análise dos espectros de FTIR evidencia as transformações estruturais dos suportes híbridos após sua funcionalização. Observa-se uma banda larga característica das ligações O-H entre 3200 e 3600 cm^{-1} , cuja intensidade varia levemente após o tratamento, indicando a participação dos grupos hidroxila nas reações químicas. Além disso, as bandas C-H, localizadas entre 2800 e 3000 cm^{-1} , ganham intensidade, especialmente para a amostra modificada com epícloridrina (SH 2% Trat-EPI),

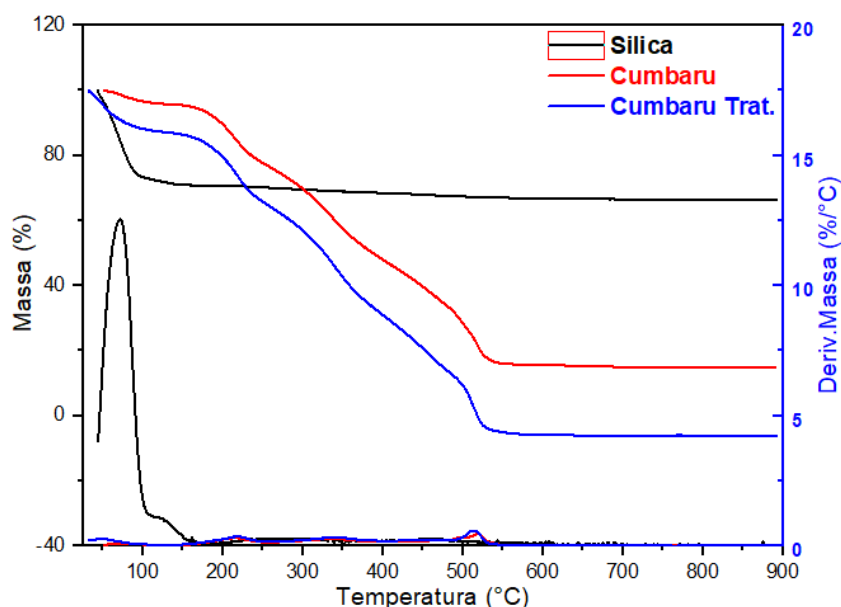
sinalizando a ancoragem de cadeias orgânicas na superfície do material. A banda intensa Si-O-Si, centrada em torno de 1100 cm^{-1} e típica da matriz de sílica, apresenta um alargamento e um ligeiro deslocamento para a amostra SH 2% Trat-EPI, um fenômeno compatível com a formação de ligações éter C-O-C. Por fim, a presença da vibração Si-O por volta de 800 cm^{-1} complementa o perfil espectral. Essas alterações confirmam a eficácia dos processos de modificação química empregados

A seleção do suporte híbrido com 2% de endocarpo de cumbaru ativado com glutaraldeído como matriz ideal para imobilização, conforme ilustrado nas Figuras 11 e 12, justifica-se principalmente pela eficiência superior do glutaraldeído em formar ligações covalentes estáveis com os grupos amina das enzimas. Embora os espectros de FTIR não mostrem diferenças significativas entre os suportes com e sem tratamento, o suporte selecionado representa o melhor equilíbrio entre a sustentabilidade proporcionada pelo material lignocelulósico e o desempenho funcional da matriz. Esta configuração específica, validada experimentalmente, demonstra ser assim a mais adequada para aplicações em biocatálise.

5.1.2 Análise Termogravimétrica

As análises do comportamento térmico das amostras foram realizadas utilizando termogravimetria (TGA) e a curva derivada (DTGA). Na Figura 13 são mostradas as curvas TGA e DTGA de sílica e endocarpo de cumbaru sem e com tratamento.

Figura 12- Curvas de TGA e DTGA da sílica e do endocarpo de cumbaru, sem e com tratamento.



Os resultados apresentados na Figura 13 destacam variações significativas na perda de massa e no resíduo das amostras de sílica, cumbaru e cumbaru tratada em diferentes faixas de temperatura, evidenciando suas distintas estabilidades térmicas.

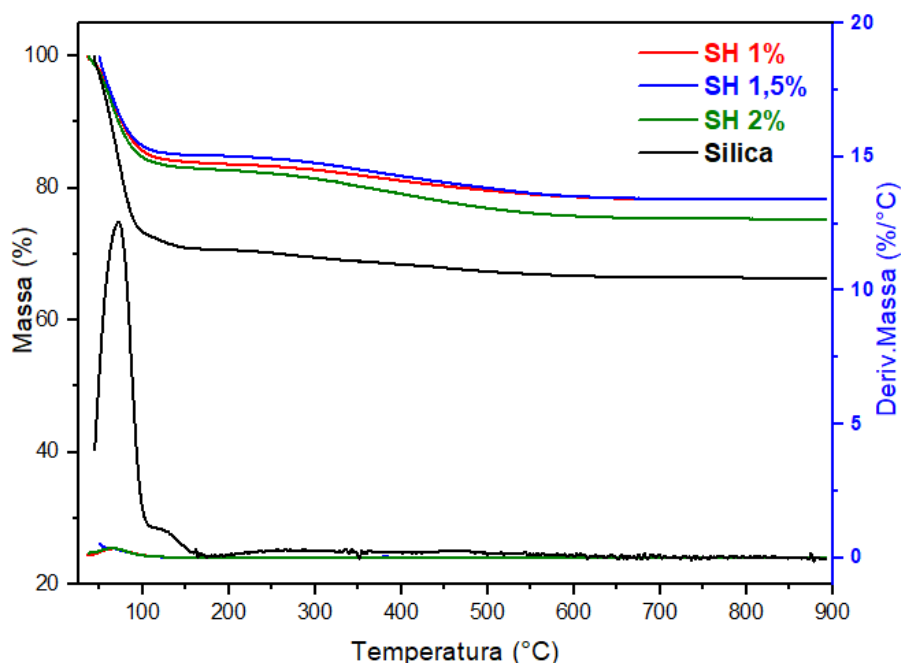
A sílica apresenta uma perda de massa considerável de 29,18% entre 43 e 171 °C, seguida por uma redução mais moderada de 4,15% entre 171 e 616 °C, com um resíduo final de 66,67%, indicando alta resistência térmica, condizente com as propriedades amplamente conhecidas desse material. Em contrapartida, o cumbaru exibe uma degradação mais pronunciada em temperaturas elevadas, com perdas consecutivas de 27,33% (entre 258 e 392 °C) e 33,50% (entre 392 e 581 °C), resultando em um resíduo final significativamente inferior de apenas 15,67%.

Esse comportamento é atribuído predominantemente à decomposição de compostos orgânicos voláteis em sua estrutura. Por fim, o cumbaru ativado apresenta perdas de massa ainda mais acentuadas em temperaturas superiores, com valores de 34,46% no intervalo de 261 a 407 °C e 35,30% entre 407 e 587 °C, reforçando a influência do tratamento na sua susceptibilidade térmica.

Dessa forma, esses resultados destacam a influência da composição química na estabilidade térmica dos materiais. Estudos adicionais, incluindo análises espectroscópicas, poderiam contribuir para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos de degradação térmica (Oliveira et al., 2020).

Na Figura 14 são apresentadas as curvas TGA e DTGA dos suportes híbridos preparados com sílica e 1%, 1,5% e 2% de partículas de endocarpo de cumbaru (SH 1%, SH 1,5%, SH 2%). Assim como o suporte de sílica pura para comparação.

Figura 13- **Curvas de TGA e DTGA dos suportes híbridos preparados com sílica e 1%, 1,5% e 2% de endocarpo de cumbaru.**

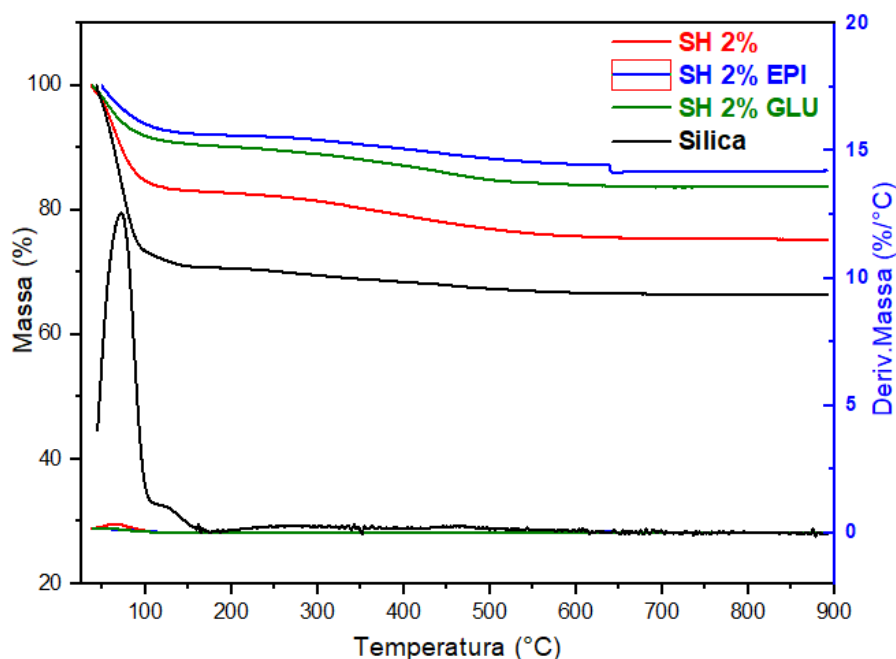


Conforme observado na Figura 14 às curvas TGA e DTGA dos suportes híbridos preparados com diferentes porcentagens de endocarpo de cumbaru (1%, 1,5% e 2%) apresentam comportamentos similares. Essa tendência também foi observada para os espectros do FTIR. Confirmando-se dessa forma a seleção do suporte híbrido com 2% de endocarpo de cumbaru.

Comparado com o comportamento termogravimétrico da sílica pura pode-se observar claramente que os suportes híbridos preparados com sílica/endocarpo de cumbaru apresentam menor perda de massa e consequentemente maior estabilidade térmica.

A Figura 15 mostra as curvas TGA e DTGA dos suportes híbridos preparados com sílica e 2% de endocarpo de cumbaru (SH 2%) e posteriormente ativados com epícloridrina e glutaraldeído (SH 2%-EPI e SH 2%-GLU). Assim como o suporte de sílica pura para comparação.

Figura 14- Curvas de TGA e DTGA dos suportes híbridos de sílica com 2% de endocarpo de cumbaru, ativados com epicloridrina e glutaraldeído.

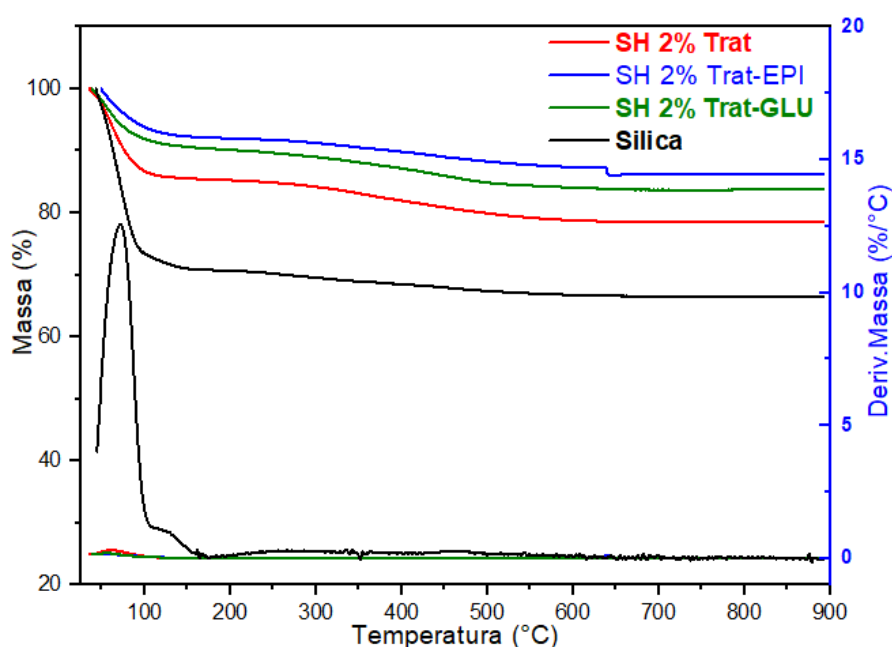


A Figura 15 apresenta os resultados da análise termogravimétrica (TGA) para a sílica pura e as amostras funcionalizadas SH 2%, SH 2% EPI e SH 2% GLU. A sílica pura exibe a maior estabilidade térmica, com uma perda de massa total de apenas aproximadamente 5% (até 900°C), majoritariamente atribuída à dessorção de água fisicamente adsorvida em baixas temperaturas, resultando em um resíduo final de 95%. Em comparação, a amostra SH 2% apresenta uma perda de massa significativa de cerca de 21%, com uma primeira perda de 12% entre 35 e 175°C (evaporação de água e voláteis) e uma segunda perda crítica de 9% entre 175 e 672°C, correspondente à degradação térmica dos grupos tiol não estabilizados, resultando em um resíduo de 79%. As amostras ativadas SH 2% EPI e SH 2% GLU demonstram uma estabilidade térmica intermediária e superior à SH 2%, com perdas de massa totais de 14% e 16%, respectivamente. Ambas apresentam sua principal fase de decomposição orgânica no intervalo de 175 a 672°C, com perdas de 10% (EPI) e 11% (GLU). O maior resíduo final da SH 2% EPI (86%) em relação à SH 2% GLU (83%) e à SH 2% (79%) indica que a ativação com epicloridrina confere uma ligeira vantagem na estabilidade térmica em comparação com o glutaraldeído. Esses dados corroboram que os processos de reticulação com ambos os agentes são eficazes para aumentar a resistência térmica do

material funcionalizado, tornando-o mais adequado para aplicações que envolvam estresse térmico.

As curvas TGA e DTGA dos suportes híbridos preparados com sílica e 2% de endocarpo de cumbaru tratado (SH 2%Trat) e posteriormente ativados com epícloridrina e glutaraldeído (SH 2%Trat-EPI e SH 2%Trat-GLU), assim como o suporte de sílica pura para comparação são apresentadas na Figura 16.

Figura 15- Curvas de TGA e DTGA dos suportes híbridos de sílica com 2% de endocarpo de cumbaru tratado, ativados com epícloridrina e glutaraldeído.



A Figura 16 apresenta os resultados da análise termogravimétrica (TGA) aplicada a três amostras tratadas: 2% Tratada, 2% Trat-EPI e 2% Trat-GLU. A amostra 2% Tratada exibe uma redução de massa de 14,60% entre 35 e 175°C, atribuída à evaporação da água e de compostos voláteis, seguida por uma segunda perda de 6,88% entre 175 e 672°C, correspondente à degradação de polímeros ou matéria orgânica, resultando em um resíduo final de 78,51%. Por sua vez, a amostra 2% Trat-EPI apresenta uma perda de massa total de 13,76%, distribuída em três etapas: 9,46% entre 49 e 353°C, 3,22% entre 353 e 621°C e 1,08% entre 621 e 861°C. Esse material demonstra uma estabilidade térmica aprimorada, com um resíduo de 86,21%, destacando a eficiência da ativação com epícloridrina. Já a amostra 2% Trat-GLU

registra uma perda de massa de 16,32%, sendo 9,70% entre 38 e 180°C e 6,62% entre 180 e 697°C, com um resíduo final de 83,69%. Esses dados indicam que a ativação com glutaraldeído também melhora a estabilidade térmica, embora ligeiramente menor em comparação com o ativado com epícloridrina. Esses resultados confirmam o impacto positivo dos suportes ativados com epícloridrina e glutaraldeído na resistência térmica dos materiais, um fator essencial para suas aplicações industriais. De acordo com De Camargo; Saron, (2020), as modificações químicas aplicadas a polímeros influenciam diretamente seu comportamento térmico, reduzindo a degradação e aumentando a proporção de resíduos termicamente estáveis.

Nas Figuras 15 e 16 podem ser observados comportamentos térmicos semelhantes para os suportes híbridos preparados sem (Figura 15) e com tratamento (Figura 16) do endocarpo de cumbaru e ativados com epícloridrina e glutaraldeído. Corroborando-se uma vez mais a seleção do suporte híbrido com 2% de endocarpo de cumbaru ativado com glutaraldeído como matriz para a imobilização da enzima.

Curva de calibração do 6-APA

Com os dados de absorvância obtidos para todas as concentrações de solução de 6-APA foram plotados no software ORIGIN e ajustados a uma reta (Figura A1)

O ajuste linear dos dados experimentais apresentou um bom ajuste com $R^2 = 0,988$ e representada pela Equação 4.

$$y = 0,1748 + 506,9x \quad (4)$$

Com a equação acima, é possível calcular as concentrações de 6-APA produzida na reação de hidrólise, utilizando apenas o valor da absorvância das amostras coletada durante determinados períodos de tempo.

5.2. Atividade enzimática e rendimento de imobilização

Com os valores das absorvâncias obtidas em diferentes intervalos de tempo durante a reação da hidrólise enzimática foram calculadas as concentrações mediante a Eq. 4. Logo foi traçada uma curva concentração vs tempo, é encontrado o valor do

coeficiente angular, cujo valor foi utilizado para realizar o cálculo da atividade da PGA antes e após a imobilização mediante a Equação 2, como mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores das atividades enzimáticas antes e após a imobilização.

Atividade enzima livre (UI/mL)	Atividade sobrenadante da enzima (UI/mL)
50,80	36,02

Fonte: Autor

Os resultados obtidos para a atividade da enzima livre e do sobrenadante após a imobilização (Tabela 2) foram utilizados para calcular o rendimento da imobilização, utilizando a Eq. 3, que foi de 29%. Esse resultado indica que apenas uma fração da atividade enzimática inicial foi efetivamente retida no suporte de imobilização, enquanto a maior parte (71%) permaneceu no sobrenadante, não sendo imobilizada.

O baixo rendimento observado (29%) pode estar relacionado a fatores como a eficiência do suporte, perdas durante o processo de imobilização ou condições não otimizadas de reação.

Rendimentos de imobilização para PGA podem variar conforme o método utilizado. Adriano et al. (2005) relataram rendimentos de 40-60% para imobilização de PGA em suportes de quitosana ativada com glutaraldeído, enquanto Sheldon (2007) destacou que protocolos com funcionalização química adequada podem superar 70% de eficiência. O valor obtido neste trabalho (29%) sugere que há oportunidades para otimização, seja na escolha do suporte ou nas etapas de ativação.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram o sucesso no desenvolvimento de um novo material híbrido à base de sílica e 2% endocarpo de cumbaru para imobilização da penicilina G acilase (PGA). As caracterizações realizadas revelaram propriedades adequadas para aplicações biotecnológicas.

As análises por FTIR validaram a integração eficaz dos grupos funcionais essenciais siloxano na matriz de sílica, preservando sua integridade estrutural enquanto permitia uma funcionalização ideal. A microestrutura do material, apresentando rugosidade e porosidade controladas, mostrou-se perfeita para a fixação enzimática.

Os ensaios termogravimétricos evidenciaram uma estabilidade térmica superior dos suportes ativados com epicloridrina e glutaraldeído com redução significativa da perda de massa em comparação com suportes não funcionalizados. Essa robustez térmica constitui uma vantagem determinante para aplicações industriais exigentes. Entre os agentes de funcionalização avaliados, o glutaraldeído destacou-se como a escolha ideal, combinando eficácia comparável à epicloridrina com um perfil ambiental mais favorável.

O rendimento de imobilização obtido de 29%, embora passível de melhoria, confirma a viabilidade desta abordagem. Esse resultado abre caminho para otimizações futuras do suporte híbrido desenvolvido na presente pesquisa.

Em síntese, este suporte híbrido sílica/cumbaru ativado com glutaraldeído representa uma solução inovadora e sustentável para imobilização enzimática, combinando estabilidade térmica, propriedades estruturais adequadas e compatibilidade ambiental. Essas características o tornam um candidato promissor para diversas aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

ABIAN, O. et al. **Improving the industrial production of 6-APA: Enzymatic hydrolysis of penicillin G in the presence of organic solvents.** *Biotechnology Progress*, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 1639–1642, 2003. Lactamases. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(4), 577–599. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000400002>

ABRAHAM, E. P. The chemistry of the new antibiotics. *The American Journal of Medicine*, New York, v. 39, n. 5, p. 692-707, nov. 1965.

ADRIANO, W. S.; FILHO, E. H. C.; SILVA, J. A.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. **Stabilization of Penicillin G Acylase by Immobilization on Glutaraldehyde-Activated Chitosan.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22, n. 4, p. 529-538, 2005.

AHSAIE, F. G.; PAZUKI, G. **Separation of phenyl acetic acid and 6-aminopenicillanic acid applying aqueous two-phase systems based on copolymers and salts.** *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 3489, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82476-x>.

Alves, M. M. R., Lara, M. A. G., Gomes, A. P., Gazineo, J. L. D., Braga, L. M., Castro, A. S. B., & Siqueira-Batista, R. (2022). **Penicilina G: atualização.** *SAÚDE DINÂMICA*, 4(3), 66-89.

ARROYO, M.; DE LA MATA, I.; ACEBAL, C.; CASTILLÓN, M. P. **Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, p. 507-514, 2003.

Bahr, G., González, L. J., & Vila, A. J. (2021). **Metallo- β -lactamases in the Age of Multidrug Resistance: From Structure and Mechanism to Evolution, Dissemination, and Inhibitor Design.** *Chemical Reviews*, 121(13), 7957–8094. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00138>

BALASINGHAM, K.; WARBURTON, D.; DUNNIL, P.; LILLY, M. D. **The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, Amsterdam, v. 276, p. 250-256, 1972.

BALL, A. P. et al. *The Natural Penicillins Benzylpenicillin (Penicillin G) and Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V)*. In: Antibacterial Drugs Today, p. 6-18, 1978.

BARROS, A. N. C. de. *Purificação de penicilina G por adsorção em resinas hidrofóbicas*. 2008.

Batchelor, F. R., Doyle, F. P., Nayler, J. Herbert C., & Rolinson, G. N. *Synthèse de la pénicilline : acide 6-aminopénicillanique dans les fermentations de la pénicilline*. Nature, 183(4656), 257–258. <https://doi.org/10.1038/183257b0>

BEM, Y. S. *As beta-lactaminas*. Sidi Thabet: Escola Nacional de Medicina Veterinária, 2003. Polycopié.

BENVENUTTI, Edilson V. et al. *Matériau hybride à base de silice obtenu par méthode sol-gel*. Química nova , v. 32, p. 1926-1933, 2009.

BENVENUTTI, Edilson V.; MORO, Celso C.; COSTA, Tania M. H.; GALLAS, Marcia R. *Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel*. Química Nova, v. 32, n. 7, p. 1926-1933, 2009.

Bertoncheli, C. M., & Hörner, R. (2008). *Uma revisão sobre metalo-β-l*

Boudrant, J.; Woodley, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation*. Process Biochemistry, v. 90, p. 66-80, 2020. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>.

BRAUN, J.; LE CHANU, P.; LE GOFFIC, F. *The immobilization of penicillin G acylase on chitosan*. Biotechnology and Bioengineering, v. 33, n. 2, p. 242–246, jan. 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.260330217>. Acesso em: 13 mar. 2024

BROWN, T. et al. *Anomalies in Thermal Gravimetric Analysis: Identification and Interpretation*. Analytical Chemistry, v. 91, n. 15, p. 9876-9884, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01567>

BRUGGINK, A.; ROOS, E. C.; DE VROOM, E. *Penicillin acylase in the industrial production of β-lactam antibiotics*. Organic Process Research & Development, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 128-133, fev. 1998.

BRUGGINK, A.; ROOS, E. C.; DE VROOM, E. ***Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics***. *Organic Process Research & Development*, v. 2, n. 2, p. 128-133, 1998.

CARVALHO, Adriana et al. ***Consumo, liberdade e saúde: as inovações da indústria do tabaco e as pautas regulatórias***. [S. l.]: Letramento, 2025.

CARVALHO, Nayara B.; LIMA, Álvaro S.; SOARES, Cleide M. F. ***Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases***. *Química Nova*, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140304>. Acesso em: 14/09/2025.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. ***Espécies Arbóreas Brasileiras. v. 1. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas***, 2003.

CHEMELLE, J. A. ***Modelação molecular do efeito alergénico imediato e retardado dos antibióticos beta-lactâmicos***. 2010. Tese (Doutorado) Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, França, 2010.

CIESIELCZYK, F.; NOWACKA, M.; PRZYBYLSKA, A.; JESIONOWSKI, T. ***Dispersive and electrokinetic evaluations of alkoxysilane-modified MgO-SiO₂ oxide composite and pigment hybrids supported on it***. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 376, p. 21–30, 2011.

COATES, J. ***Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry***: Wiley, 2000. p. 10815–10837.

Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E. ***Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy***. 3. ed. Boston: Academic Press, 1990.

CORRÊA, M. P. ***Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas***. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1931. v. 2.

DA SILVA, Ana Teresa Teixeira. ***SAILing around the most abundant chemical elements in Life: development of bioactive Surface-Active Ionic Liquids by combination of antimalarial drugs with natural lipids***. 2024.

DE CAMARGO, Rayane Veloso; SARON, Clodoaldo. ***Recyclage mécano-chimique des déchets de polyéthylène basse densité avec du polypropylène***. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 28, n. 3, p. 794-802, mar. 2020.

DÍAZ, Verônica Steinbach. ***Principais patologias, diagnósticos e tratamentos de lesões tendíneas em equinos***. 2014.

DIENDER, M. B. et al. ***Modelação do equilíbrio da hidrólise enzimática extractiva da penicilina G com cristalização concomitante do ácido 6-aminopenicilânico***. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 77, p. 395-401, 2002.

EL KADIB, A. et al. ***Chitosan-silica hybrid materials: A comprehensive review on synthesis, properties, and applications***. *Chemical Society Reviews*, v. 44, n. 19, p. 7057-7091, 2015.

Elander, R.P. ***Industrial production of beta-lactam antibiotics***. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 385–392 (2003). <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1274-y>

FAUCI, A. S. ***Doenças infecciosas: considerações para o século XXI***. *Clinical Infectious Diseases*, v. 32, p. 675-685, 2001.

FERREIRA, J. S. ***Processo intensificado de hidrólise de penicilina G e purificação dos produtos em reator multi-estágio e contra-corrente***. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

FERSHT, A.; DAGGETT, V. ***Protein folding and unfolding at atomic resolution***.v. 108, n. 4, p. 573-582, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00620-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00620-7)

FIGUEIREDO, Patrícia; LINTINEN, Kalle; HIRVONEN, Jouni T.; KOSTIAINEN, Mauri A.; SANTOS, Hélder A. ***Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications***. *Progress in Materials Science*, v. 93, p. 233-269, abr. 2018.

GAYNES, R. ***The Discovery of Penicillin New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use***. *Emerging Infectious Diseases*, v. 23, n. 5, p. 849-853, 2017. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>

GONZATTI, E. ***Desenvolvimento de um catalisador enzimático para a valorização de resíduos domésticos de alimentos***. 2024.

GUILLOT, J. F. *Aparecimento e evolução da resistência bacteriana aos antibióticos*. Annales de Recherches Vétérinaires, v. 20, n. 1, p. 3-16, 1989.

JACQUES, B.; SÉBASTIEN, F. *Penicilinas*. *Actualités Pharmaceutiques*, v. 59, p. 23-25, 2020.

JONES, R. et al. *Thermal Decomposition of Organic Compounds in Biomass*. *Biomass and Bioenergy*, v. 135, 105489, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105489>

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. *Materiais Híbridos Orgânico-Inorgânicos: Preparação e Algumas Aplicações*. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005. DOI: [10.1590/S0100-40422005000200023](https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000200023)

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. *Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações*. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.

KANDIMALLA, V. B.; TRIPATHI, V. S.; JU, H. *Immobilization of Biomolecules in Sol-Gels: Biological and Analytical Applications*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 36, n. 2, p. 73-106, 2006. DOI: 10.1080/10408340600713652.

KHALID, E. A. *Céphalosporines orales criteres de choix*. 1995. Université Joseph Fourier Grenoble 1, Grenoble, França, 1995.

KLAPIKOWSKI, L.; MADRAWKA, M.; JESIONOWSKI, T. *Preparation and characterisation of hydrated silica/lignin biocomposites*. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, v. 48, p. 463–473, 2012.

KONE, S. M. *Avaliação da prescrição de antibióticos em consulta externa ao serviço de pediatria*. 2007. Tese (Farmácia) Bamako, 2007.

LEITE, Larissa Nayhara Soares Santana. *Imobilização e Estabilização de β -Galactosidase por Ligações Multipontuais em Duolite A568*. 2009. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

LIU, P.; ZHANG, L.; WANG, L. *Functionalization of silica for metal adsorption: A review*. *Journal of Materials Science*, v. 52, n. 5, p. 2521–2535, 2017.

LIU, Y. et al. ***Lignin-silica hybrid materials: Synthesis, characterization, and applications in catalysis***. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, v. 7, n. 5, p. 5123-5132, 2019.

LOBANOVSKA, Mariya; PILLA, Giulia. ***A descoberta da penicilina e a resistência aos antibióticos: lições para o futuro?*** Yale Journal of Biology and Medicine, v. 90, n. 1, p. 135-145, 2017.

MADEJOVÁ, J. ***FTIR techniques in clay mineral studies***. Vibrational Spectroscopy, v. 31, n. 1, p. 1–10, 2003.

Melo, S. A. B. X. de; Silva, F. S. da; Melo, A. X. de; Bento, T. S. ***Cadeia produtiva do cumbaru (Dipteryx alata Vogel) em Poconé, Mato Grosso***. Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v. 34, n. 1, p. 37-58, jan./abr. 2017

MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C. de; CASTRO, Heizir F. de; GIORDANO, Raquel de L. C. ***Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial***. Química Nova, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

Messing, Ralph A. ***Adsorption de protéines sur des surfaces de verre et paramètres pertinents pour l'immobilisation d'enzymes dans les pores de supports inorganiques***, p 277-283, 1975 . Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7204-0419-7.50031-7> acesso em: 14/09/2025

NAGHAVI, M. et al. ***Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050***. The Lancet, London, v. 404, n. 10448, p. 1199-1226, set. 2024. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1). Acesso em: 04 mar 2024.

NOWACKA, M.; KLAPISZEWSKI, Ł.; NORMAN, M.; JESIONOWSKI, T. ***Dispersive evaluation and surface chemistry of advanced, multifunctional silica/lignin hybrid biomaterials***. Central European Journal of Chemistry, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1850–1868, 2013. DOI: [10.2478/s11532-013-0322-4](https://doi.org/10.2478/s11532-013-0322-4). Disponível em: <http://doi.org/10.2478/s11532-013-0322-4>.

OLIVEIRA, R. M. et al. ***Dinâmica e Espectroscopia dos Complexos de van der Waals D₂O-D₂, D₂O-N₂, D₂O-O₂, D₂O-CH₄, ND₃-D₂, ND₃-O₂ e ND₃-CH₄***. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 12, p. 94455-94464, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-057>

PAULA, Ariela V. de; MOREIRA, Ana B. R.; BRAGA, Luciana P.; CASTRO, Heizir F. de; BRUNO, Laura M. **Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias.** Química Nova, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008. Disponível em: <https://quimicanova.sbq.org.br/>.

PAULING, L.; COREY, R. B. **Compound helical configurations of polypeptide chains: Structure of proteins of the α -keratin type.** Nature, v. 171, n. 4341, p. 59-61, 1953. <https://doi.org/10.1038/171059a0>

PEDRA, Y. et al. Antibióticos: **Mecanismos e desafios.** Ciências Biológicas e da Saúde: Integrando Saberes em Diferentes Contextos, v. 4, p. 83-103.

PEREIRA, Erlon Lopes; OLIVEIRA, Ana Flávia Alves. **A produção de antibióticos por processos fermentativos aeróbios.** Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 1058–1078, ago./dez. 2016.

PEREIRA, Ernandes Benedito. **Lipase livre e imobilizada em quitosana: caracterização e potencial de aplicação em reações de hidrólise e síntese.** 1999. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1999.

PUYT, J. D. **Beta-lactâmicos. In: Anti-infecciosos em medicina veterinária, bases da antibioticoterapia.** Nantes: ONIRIS, 2006. p. 204.

RAMÍREZ-RENDON, Dulce et al. Impact of novel microbial secondary metabolites on the pharma industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 106, n. 5, p. 1855–1878, fev. 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-022-11821-5>.

SANO, S. M.; BRITO, M. A.; RIBEIRO, J. F. ***Dipteryx alata* Vog.** In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de; RIBEIRO, J. F. (Ed.). **Espécies Nativas dos Cerrados: Caracterização e Uso. 2. ed.** Brasília, DF: Embrapa, 2010. p. 203-219.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. **Baru: biologia e uso.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. (Documentos, 116).

SANTO, Christian B. **Antibióticos: quando as bactérias se tornam resistentes.** Revista LE DOSSIER, 2014.

SANTOS, B. L. et al. **Diferentes técnicas de imobilização enzimática para obtenção de catalisadores**. Trends in Bioscience & Biotechnology, v. 1, p. 1-20, 2014.

SANTOS, Bruna Leal dos. **Imobilização de lipase por diferentes técnicas para obtenção de catalisadores estáveis**. 2014.

SAWANT, Amol M.; SUNDER, Avinash Vellore; VAMKUDOTH, Koteswara Rao; RAMASAMY, Sureshkumar; PUNDLE, Archana. **Process Development for 6-Aminopenicillanic Acid Production Using Lentikats-Encapsulated Escherichia coli Cells Expressing Penicillin V Acylase**. ACS Omega, [S. l.], v. 5, n. 45, p. 28972–28976, 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.0c02813>. Acesso em: 19 ago. 2024.

SENNA, André M.; MENEZES, Aparecido J. de; BOTARO, Vagner R. **Estudo da densidade de ligações cruzadas em géis superabsorventes obtidos do acetato de celulose**. Polímeros, São Carlos, v. 23, n. 1, p. 59-64, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000078>. Acesso em: 14/06/2025

SHELDON, R. A. **Enzyme immobilization: the quest for optimum performance**. Advanced Synthesis & Catalysis, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

Shewale, J. G. and Sivaraman, H. (1989), **Penicillin Acylase: Enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA**, Proc. Biochem., 146-154. Voet, J. G. (1995), Biochemistry. 2.ed. NY, USA : John Wiley and sons.

SHEWALE, J. G.; SUDHAKARAN, V. K. **Penicillin acylase: enzyme, molecular biology and applications**. Enzyme and Microbial Technology, v. 20, n. 7, p. 402-410, 1997.

Shewale, J. G.; Sudhakaran, V. K. **Penicillin V acylase: Its potential in the production of 6-aminopenicillanic acid**. Enzyme and Microbial Technology, v. 20, n. 5, p. 402–410, 1997. Disponível em: [DOI: 10.1016/S0141-0229\(96\)00176-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00176-7).

SILVA, JOÃO; PEREIRA, MARIA; ALMEIDA, CARLOS. **A aplicação de tecnologias emergentes na otimização de processos industriais: revisão bibliográfica**. Revista Brasileira de Engenharia Química, v. 45, n. 2, p. 123-140, 2023.

SILVA, M. C. H. da; SILVA, L. H. M. da; PAGGIOLI, F. J.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. **Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de**

íons. Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1332-1339, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600031>. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/qn/a/4w7Qn8v5Qyq7j8k8c8g9k9yL/?lang=pt>. Acesso em: 19 set. 2024.

SILVERSTEIN, R. M. et al. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 8. ed. [S. l.]: Wiley, 2014.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 6. ed. New York: John Wiley & Sons, 1998.

SMITH, J. et al. *Thermal Stability of Silica-Based Materials*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v. 132, n. 2, p. 1234-1245, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7033-1>

SOUSA, Andreia Sofia Oliveira de. *A inclusão de indicadores não-financeiros na prestação de informação e serviço de gabinetes de contabilidade*. 2016. Relatório (Estágio) – Instituto Politécnico de Tomar, Tomar, 2016.

Souza, L. T. A., Veríssimo, L. A. A., Pessela, B. C., Santoro, M. M., Resende, R. R., & Mendes, A. A. (2017). *Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte*. In *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria* (Vol. 4, Cap. 15, pp. 531-568). <https://doi.org/10.3515/978802121150-15>

SRIRANGAN, K. et al. *Avanços biotecnológicos na penicilina G acilase: implicações farmacêuticas mecanismo de expressão único e estratégias de produção*. Biotechnology Advances, v. 31, p. 1319-1332, 2013.

STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. [S. l.] John Wiley & Sons, 2004.

TAKEMOTO, E. et al. *Composição química da semente e do óleo de baru (Dipteryx alata Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás*. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 60, n. 2, p. 113-117, 2001.

Tavares W. *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico*. 4a ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2020.

TISHKOV, V. I.; SAVIN, S. S.; YASNAYA, A. S. **Protein Engineering of Penicillin Acylase**. *Acta Naturae*, v. 2, n. 3, p. 47-59, 2010.

VALLILO, M. I.; TAVARES, M.; AUED, S. **Composição química da polpa e da semente do fruto do cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.) - Caracterização do óleo e da semente**. *Revista do Instituto Florestal*, v. 2, p. 115-125, 1990.

VERSPORTEN, A. et al. **Consumo e resistência antimicrobiana em pacientes adultos internados em hospitais de 53 países: resultados de um inquérito global de prevalência pontual baseado na Internet**. *The Lancet Global Health*, p. 619-629, 2018.

WALSH, C. *Antibiotics: actions, origins, resistance*. Washington, D.C.: ASM Press, 2003.

WANG, Wenjie; XUE, Changhu; MAO, Xiangzhao. **Chitosan: Structural modification, biological activity and application**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 164, p. 4532-4546, 1 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042>. Acesso em:15/09/2025

ZDARTA, J. et al. **Aperçu général des matériaux de support pour l'immobilisation des enzymes : caractéristiques, propriétés, utilité pratique**. *Catalysts*, v. 8, n° 2, p. 92, 2018.

ZHOU, Yu; HAN, Yanming; LI, Gaiyun; YANG, Sheng; XIONG, Fuquan; CHU, Fuxiang. **Preparation of Targeted Lignin-Based Hollow Nanoparticles for the Delivery of Doxorubicin**. *Nanomaterials*, v. 9, n. 2, p. 188, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano9020188>. Acesso em: 15 set. 2024.

ANEXO

Figura A1. Curva de calibração 6-APA

