

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ANA LUIZA PESSANHA DA SILVA

AVALIAÇÃO DE SISTEMAS REACIONAIS PARA FOTODESCARBOXILAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS MEDIADOS POR CvFAP

DUQUE DE CAXIAS
2023

Ana Luiza Pessanha da Silva

AVALIAÇÃO DE SISTEMAS REACIONAIS PARA FOTODESCARBOXILAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS MEDIADOS POR CvFAP

Dissertação de Bacharelado apresentada ao Programa de Graduação em Ciências
Biológicas (Biotecnologia), Duque de Caxias, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
requisitos parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas (Biotecnologia).

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza (UFRJ)

Duque de Caxias
2023

CIP - Catalogação na Publicação

P532a Pessanha da Silva, Ana Luiza
Avaliação de sistemas reacionais para
fotodescarboxilação de ácidos graxos mediados por
CvFAP. / Ana Luiza Pessanha da Silva. -- Rio de
Janeiro, 2023.
31 f.

Orientador: Rodrigo Octavio Mendonça Alves de
Souza.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus
Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel
em Ciências Biológicas: Biotecnologia, 2023.

1. Biocatálise. 2. Fotodescarboxilase. 3. CvFAP.
4. Descarboxilação fotoenzimática. 5. Ácidos graxos.
I. Mendonça Alves de Souza, Rodrigo Octavio, orient.
II. Título.

Aluno(a): **Ana Luiza Pessanha da Silva**

Registro na DRE: **118171117**

Título: "Avaliação de sistemas reacionais para fotodescarboxilação de ácidos graxos mediados por CvFAP "

MEMBRO DA BANCA	NOTA
Ivaldo Itabaiana Júnior	8,0
Fabiana Avila Carneiro	8,5
Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza (Orientador)	8,0
Ana Luiza Pessanha da Silva	
Nota Final	8,15

Declaro que a aluna **Ana Luiza Pessanha da Silva** foi aprovada com nota 8,15, por esta banca.

Duque de Caxias, 04 de agosto de 2023.



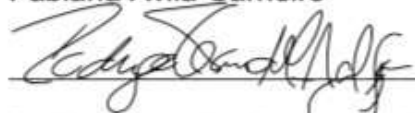
Ivaldo Itabaiana Júnior



Documento assinado digitalmente

FABIANA AVILA CARNEIRO
Data: 04/08/2023 15:49:11-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Fabiana Avila Carneiro



Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza

Documento assinado digitalmente



ANA LUIZA PESSANHA DA SILVA
Data: 04/08/2023 16:35:51-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Ana Luiza Pessanha da Silva



2023.08.04
17:19:55
-03'00'

Coordenador Luiz Gustavo Feijó Dubois
Curso de Ciências Biológicas: Biotecnologia

Dedico
este trabalho
à minha família.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por ter permitido que eu tivesse saúde, força e determinação para não desanimar durante todos esses anos de graduação, fazendo com que meus objetivos fossem alcançados.

A minha mãe Selma Cristina, meu pai Fernando César e meu irmão Luiz Fernando, que lutaram pela minha educação, me incentivaram nos momentos difíceis e estiveram ao meu lado durante toda minha trajetória.

Aos meus orientadores Rodrigo, Raquel, Alexandre e Gabriela, que foram essenciais na finalização da minha graduação, por se dedicarem a mim, me orientando durante a pesquisa.

Aos meus amigos, que sempre estiveram presentes com palavras de encorajamento e força, me proporcionando grandes momentos de alegria.

Aos amigos do BOSS GROUP, pelo carinho, apoio e momentos que me proporcionaram grandes aprendizagens.

**O tempo é um químico invisível,
que dissolve, compõe, extrai e,
transforma todas as substâncias morais.**

Machado de Assis

RESUMO

SILVA, Ana Luiza Pessanha. Avaliação de sistemas reacionais para fotodescarboxilação de ácidos graxos mediados por CvFAP. Duque de Caxias, 2023. Dissertação (Bacharel em Ciências - Biotecnologia)- Campus Duque de Caxias, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, 2023.

A descarboxilação fotoenzimática de ácidos graxos a alcanos tem sido difundida como uma alternativa para a síntese de biocombustíveis por meio de processos biocatalíticos. O presente projeto utilizou, a recentemente descoberta, fotodescarboxilase de *Chlorella variabilis* NC64A (CvFAP), capaz de converter irreversivelmente ácidos graxos (C_n) em seus respectivos hidrocarbonetos (C_{n-1}). Para isso, a enzima foi expressa em *Escherichia coli*, e a célula foi lisada para obtenção do extrato bruto. As condições reacionais foram otimizadas, almejando-se melhores tempos reacionais e fontes luminosas mais eficientes ao processo avaliado. A influência do comprimento de onda da fonte luminosa foi avaliada com a utilização de lâmpadas de LED azul 300 W e violeta 50 W, aplicadas em sistemas fotocatalíticos com diferentes ácidos graxos como substratos. A transformação dos substratos ácidos avaliados à hidrocarbonetos foi observada com conversões próximas superiores a 99% para o ácido esteárico, ácido palmítico e ácido araquídico em 30 e 60 minutos de reação utilizando luz azul, e em tempos significativamente mais curtos, com apenas 10 minutos na presença da luz violeta, obteve conversões acima de 99%

Palavras-chave: Biocatálise, Fotodescarboxilase, CvFAP, Descarboxilação fotoenzimática, Ácidos graxos.

ABSTRACT

SILVA, Ana Luiza Pessanha. Evaluation of CvFAP-mediated fatty acid photodecarboxylation reaction systems. Duque de Caxias, 2023. Dissertation (Bachelor of Science - Biotechnology) - Campus Duque de Caxias, Federal University of Rio de Janeiro, Duque de Caxias, 2023.

The photoenzymatic decarboxylation of fatty acids to alkanes has been disseminated as an alternative for the synthesis of biofuels through biocatalytic processes. The present project used the recently discovered photodecarboxylase from *Chlorella variabilis* NC64A (CvFAP), capable of irreversibly converting fatty acids (C_n) into their respective hydrocarbons (C_{n-1}). For this, the enzyme was expressed in *Escherichia coli*, and the cell was lysed to obtain the crude extract. The reaction conditions were optimized, aiming for better reaction times and more efficient light sources for the evaluated process. The influence of the wavelength of the light source was evaluated using 300 W blue and 50 W violet LED lamps, applied in photocatalytic systems with different fatty acids as substrates. The transformation of the evaluated acid substrates to hydrocarbons was observed with close conversions greater than 99% for stearic acid, palmitic acid and arachidic acid in 30 and 60 minutes of reaction using blue light, and in significantly shorter times, with only 10 minutes in the presence of violet light, obtained conversions above 99%.

Keywords: Biocatalysis, Photodecarboxylase, CvFAP, Photoenzymatic decarboxylation, Fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2 — Esquema representativo do ciclo catalítico do FAD.....	16
Figura 2 — Representação da estrutura CvFAP, dando ênfase aos seus dois domínios	18
Figura 3 — Sistema reacional para descarboxilação fotoenzimática de ácidos graxos mediada por CvFAP.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Conversão da reação de descarboxilação fotoenzimática na luz azul...21	
Tabela 2 — Conversão da reação de descarboxilação fotoenzimática na luz violeta.....22	

LISTA DE ABREVIATURAS

CvFAP	Fotodescarboxilase de <i>Chlorella variabilis</i> NC64A.
FAPs	Fotodescarboxilases.
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo.
GMC	Oxirredutases glicose-metanol-colina.
HOMO	Orbital molecular ocupado mais alto.
LUMO	Orbital molecular não ocupado mais baixo.
LAMMP	Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
LED	Diodo emissor de luz.
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto.
Tris-HCl	Hidroximetil Aminometano cloridrato.
BCA	Ácido bicinonínico.
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Biocatálise	14
1.2 Fotocatálise enzimática	14
1.3 Fotodescarboxilases de ácidos graxos	17
2. OBJETIVO	18
2.1 Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Preparo do extrato enzimático	18
3.2 Reações cinéticas em luz azul e violeta	19
3.3 Análise por cromatografia gasosa	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	22
6. REFERÊNCIAS	23
7. ANEXOS	26

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOCATÁLISE

Desde a Primeira Revolução Industrial em 1760, a mão de obra utilizada em diversos setores da sociedade sofreu gradativas e intensas modificações pelo processo de mecanização, o que tornou o uso de combustíveis fósseis para o funcionamento das máquinas e geração de energia mais intensa com o passar do tempo (BORNSCHEUER et. al, 2012). Em contrapartida, os combustíveis derivados de petróleo são responsáveis por diversas injúrias ambientais, como emissão de gases de efeito estufa e contaminação de águas, sendo necessária utilização de matrizes energéticas alternativas, como biocombustíveis, extremamente importantes para gerar processos ambientalmente sustentáveis (FARIAS et. al, 2011; OLIVEIRA et. al, 2020; BAIRD et. al, 2011).

O aumento do investimento na pesquisa em prol dos biocombustíveis, nos últimos anos, fomenta consequentemente a pesquisa científica na busca por novos processos biocatalisados que proponham estratégias eficientes para a obtenção desses bioprodutos, tais como fotoprocessos associados a catálise enzimática (BORNSCHEUER et. al, 2012; RUEDA et. al, 2020)

Nestes processos se faz necessária a presença de enzimas, biomoléculas que possuem função de regulação do metabolismo através da catálise de reações, possuem estrutura tridimensional, que são determinantes para seu funcionamento e atuam sobre moléculas específicas, substratos enzimáticos, através da formação de um complexo enzima-substrato. A ligação oriunda entre a biomolécula e o substrato ocorre em uma região específica denominada de sítio ativo (LEHNINGER, 2014).

1.2 FOTOCATÁLISE ENZIMÁTICA

As reações fotocatalíticas enzimáticas utilizam enzimas como catalisadores sob condições de iluminação específica, caracterizam a fotocatalise enzimática, que se destaca como estratégia sustentável e segura, em comparação aos processos químicos tradicionais, produtos os quais fazem uso de condições mais bruscas como elevada temperatura e condições de acidez (ALEKSENKO et. al, 2020).

As fotoenzimas, enzimas ativadas pela luz, são responsáveis pela catálise de reações bioquímicas, porém dependentes da irradiação luminosa, de modo que, a

interrupção do fluxo de fótons ou a inexistência do mesmo inviabiliza a reação. Para que ocorra a absorção da luz, a molécula deve conter ou estar associada a outra que contenha em sua estrutura grupos cromóforos, os quais podem ser encontrados como cofator enzimático (BJORN et. al, 2015; HEDISON et. al, 2022; SCRUTTON et. al, 2017).

A transferência de elétrons é a principal reação gerada por catalisadores em processos fotobiocatalíticos (FAGNONI et. al, 2007). O deslocamento de elétrons, nestes processos pode ocorrer de duas maneiras, direta ou indireta, de forma direta eles são transferidos para a enzima, ou seu cofator, e indiretamente, através de outro composto do meio reacional, definido como mediador (SEEL et. al, 2019). A luz por ser uma fonte energética susceptível à absorção pela matéria, gera alterações energéticas e vibracionais, de acordo com a quantidade de energia emitida e absorvida. A emissão de radiação no espectro visível de uma determinada molécula estará, portanto, passível de sofrer um processo de fotoexcitação ou excitação eletrônica, tendo a radiação em questão constituída por fótons com energia equivalente à diferença de energia entre o estado fundamental da molécula, representado pelo orbital molecular ocupado com maior quantidade de energia, o HOMO, e o seu estado excitado, representado pelo orbital molecular de mais baixa energia, o LUMO, ocorrendo a transição de um elétron do HOMO para o LUMO, (SKUBI et. al, 2016). A fotoexcitação gerada pelo processo de absorção de radiação gera um elétron excitado altamente energético, com potencial redutor, e uma vacância eletrônica em um nível de energia inferiores, de modo oxidante (HOFFMANN et. al, 2012;RAVELLI et. al, 2009;ZHANG et. al, 2014).

O ciclo catalítico do FAD representado na Figura 2, se inicia com a ligação do substrato no sítio ativo, conseqüentemente ocorre sua desprotonação, favorecendo sua interação. A incidência da luz azul promove a excitação do FAD, que possui um grupo cromóforo em sua estrutura, favorecendo a transferência de elétrons para o substrato, formando um carboxilato. Nesta etapa o FAD se encontra em seu estado mais excitado, e para que ele vá para um estado de mais baixa energia, é necessário que ocorra uma descarboxilação, que terá a liberação de CO₂ e a protonação do alceno, este por fim irá sair do sítio ativo em concomitância com a regeneração do FAD. de uma alceno sintase (HEYES et., al 2020).

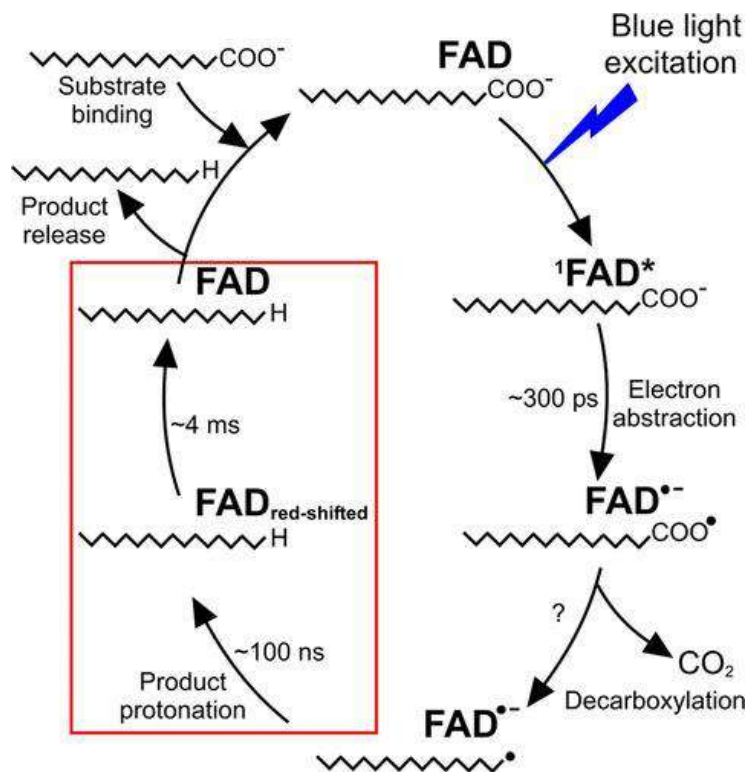


Figura 1: Esquema representativo do ciclo catalítico do FAD (HEYES et. al., 2020).

A resultante desse modelo, um intermediário excitado altamente instável e reativo, ao retornar para o seu estado fundamental, transfere a energia absorvida a outras moléculas por meios físicos ou químicos, sendo o segundo tipo de transferência, que ocorre como resultado da instabilidade citada, envolve a transferência de elétrons ou átomos entre as moléculas presentes (FAGNONI et. al, 2007; ROMERO et. al, 2016; XI et. al, 2013).

Esses compostos que apresentam alterações químicas ou físicas em outros componentes, após absorverem luz, retornam ao seu estado fundamental através de um processo exclusivamente químico. Esse retorno ativará outros compostos presentes no ambiente e modificará a energia ou a velocidade das reações químicas (XI et. al, 2013). A configuração eletrônica de mais alta energia possibilita transferências de elétrons ou átomos, portanto, a reatividade dos fotocatalisadores está relacionada à eficiência desse deslocamento eletrônico. A luz, portanto, se apresenta como fonte de energia fundamental para a ocorrência da reação biocatalítica, e para que ocorra a absorção de luz, se faz necessária a presença de proteínas que devem estar associadas a moléculas que contenham em sua estrutura grupos cromóforos, que atuem como cofator enzimático ou como substrato da

reação, como exemplo temos as fotodescarboxilases (FAPs) (HISATOMI et. al, 2014; KUMAR et. al, 2019; KAMADA et. al, 2019).

1.3 FOTODESCARBOXILASES DE ÁCIDOS GRAXOS

As FAPs, enzimas de grande relevância para o setor biotecnológico, pertencem à família das GMC oxidorreduções (oxidorreduções de glicose-metanol-colina), e são classificadas como flavoenzimas homólogas de diferentes atividades catalíticas em algas, fungos, leveduras e bactérias (ALEKSENKO et. al, 2020; IIDA et. al, 2007). Em sua composição encontram-se cerca de 654 aminoácidos, que integram a família de proteínas Pfam, que possuem dois domínios. Sendo eles, o GMC_oxred_N, responsável fazer ligação com o substrato, apresentando sequência e estrutura menos conservadas, comparada às outras; e o GMC_oxred_C, composto por uma sequência conservada de 30 aminoácidos, podendo apresentar, ou não, ligação covalente com dinucleotídeo de flavina e adenina (sigla proveniente do inglês, *Flavin Adenine Dinucleotide* - FAD) (ALEKSENKO et. al, 2020; SUTZL et. al, 2019).

A fotodescarboxilase de *Chlorella variabilis* (EC:4.1.1.106), conhecida pela sigla CvFAP, faz parte do grupo mais abundante da família de glicose-metanol-colina, grupo representado pela cor amarela na Figura 2. A CvFAP possui capacidade de transformar ácidos monocarboxílicos em alcanos, de modo irreversível, mediante a ativação fotoquímica do FAD. Essa coenzima, está presente no processo de absorção do fóton de luz, responsável por elevar o nível de energia, a colocando num estado eletronicamente excitado, seguido da absorção energética gerada, e posteriormente armazenada. Ao sofrer fotoexcitação, ocorre uma mudança conformacional na enzima, de modo que sua atividade catalítica ou função biológica, sofrem alterações, concomitantemente a cascatas de reações químicas intracelulares, originando processos essenciais para a fotossíntese, respiração celular ou outras vias metabólicas dependentes de atividade fotoenzimática (SORIGUÈ et. al, 2016; SORIGUÈ et. al, 2017).

Como muitas outras oxidoreduções GMC, os FAPs contêm dois domínios. O qual o cofator FAD está ligado ao domínio N-terminal da fotodescarboxilase, enquanto o domínio C-terminal coordena o substrato. A CvFAP desenvolveu um hidrofóbico canal de entrada do substrato para acomodar a cadeia alquila de substratos ácidos,

e posicionar o grupo carboxila do substrato próximo ao cofator FAD, como representados na figura 2 nas cores de azul a vermelho (SORIGUÈ et. al, 2017).

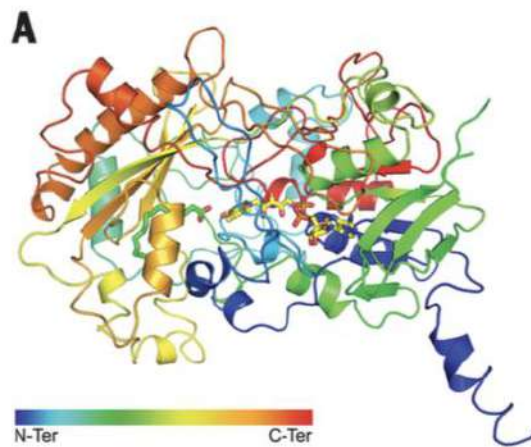


Figura 2: Representação da estrutura CvFAP, dando ênfase aos seus dois domínios(SORIGUÈ et. al, 2017).

2. Objetivo

Avaliar a eficiência de CvFAP em processos de fotodescarboxilação utilizando diferentes substratos ácidos de cadeia longa na presença de diferentes fontes luminosas.

2.1 Objetivo específico

Realizar reações fotocatalíticas na luz azul 300 W e luz violeta 50 W, tendo como substrato o ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido araquídico em curtos intervalos de tempo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARO DE EXTRATO ENZIMÁTICO

A expressão da enzima na bactéria *Escherichia coli* foi obtida em colaboração com o laboratório de microbiologia molecular e proteínas (LAMMP), onde foi utilizado o protocolo descrito por Benincá *et al.* 2022, e obtidas alíquotas de suspensão celular armazenadas em -80 °C. As alíquotas de suspensão celular contendo CvFAP expressa de forma intracelular foram centrifugadas a 11000 g e 4 °C por 10 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e as células foram ressuspendidas em

tampão Tris-HCl (100 mM; pH 8,5; 1 mM PMSF; 5 % (m/v) glicerol) para uma densidade óptica de 15 medida em espectrofotômetro (600 nm). O rompimento das células foi realizado através de um sonicador de ponta na presença de banho de gelo, com uma amplitude de 30 %, por um total de 10 ciclos de 90 segundos de sonicação cada, realizados com intervalos de 10 segundos de sonicação ligada e 30 segundos de pausa, tendo intervalo de 90 segundos entre cada ciclo. Após o rompimento das células, o extrato enzimático bruto obtido foi submetido a quantificação de proteínas totais por método colorimétrico através do kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit da marca ThermoScientific seguindo o protocolo do fornecedor e armazenado a -80 °C para ser utilizado nas reações fotobiocatalíticas.

3.2 REAÇÕES CINÉTICAS EM LUZ AZUL E VIOLETA

Em um vial com volume de 1,5 mL, foi adicionado tampão Tris-HCl (pH 8,5, 100 mM) contendo extrato celular (5,1 mg. mL⁻¹ de proteína total), 30% de DMSO como co-solvente, e o substrato ácido na concentração final de 13 mM. O sistema reacional foi exposto a uma lâmpada LED (300 W azul ou 50 W violeta), sob agitação magnética constante e temperatura de 37 °C. Após o tempo estipulado, realizou-se a extração com 900 microlitros de acetato de etila, a secagem do solvente com sulfato de sódio anidro e a filtragem com auxílio de seringas.

3.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As amostras foram compostas por 100 µL da reação bruta diluída, em 900 µL de acetato de etila. As porcentagens de conversão foram analisadas por áreas do cromatograma usando a coluna DB5- HT (30 m x 0,25 mm x 0,10 µm) utilizando Hélio como gás de arraste, a uma vazão cuja velocidade linear corresponde a 36.9 cm/s. Injetou-se 1 µL de amostra a 250 °C e divisão de fluxo de 10:1. A fonte de íons do espectrômetro de massas foi mantida a 200 °C e a interface com o cromatógrafo a 280 °C, rampa de temperatura de 110 °C.min⁻¹ foi mantida por 2,00 minutos, o forno foi, então, aquecido a uma taxa de 10 °C/minutos até 280 °C, temperatura que foi mantida por 2 minutos. A identificação dos compostos de interesse foi feita baseada em seus respectivos tempos de retenção (t_R) e a identificação dos produtos por área percentual.

4. RESULTADOS

Para o estudo da fotodescarboxilação, foram utilizados ácidos graxos de cadeia longa, o ácido mirístico ($C_{14}H_{28}O_2$), ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$), ácido esteárico ($C_{18}H_{36}O_2$) e o ácido araquídico ($C_{20}H_{40}O_2$), dado que a fotoenzima apresenta grande afinidade com substratos compostos por mais de 14 carbonos em sua cadeia (HUJIBERS et. al, 2018). A reação foi realizada segundo o esquema representado na Figura 3, gerando alcanos.

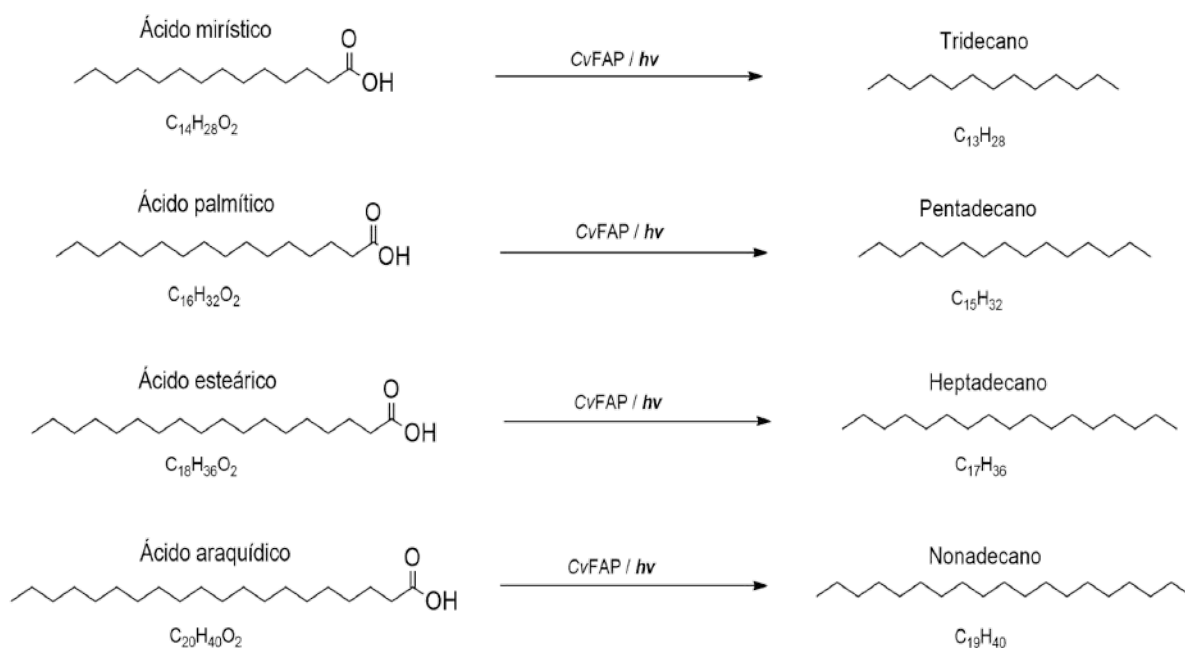


Figura 3: Sistema reacional para descarboxilação fotoenzimática de ácidos graxos mediada por CvFAP. Condições reacionais descritas nas seções 3.3 e 3.4.

A conversão de ácidos graxos em hidrocarbonetos foi confirmada por cromatografia gasosa. Os ácidos foram consumidos, obtendo conversões a partir de 97 %, apresentando a perda do grupo carboxila em seus respectivos produtos, mediante exposição à luz azul 300W. O ácido mirístico foi convertido em tridecano, o ácido palmítico em pentadecano, em concomitância, com a descarboxilação dos ácidos esteárico e araquídico, formando um heptadecano e nonadecano, respectivamente, demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Conversão da reação de descarboxilação fotoenzimática na luz azul.

Substrato	Conversão (%)	
	30 min	60 min
Mirístico (C ₁₄)	>99	>99
Palmítico C ₁₆)	>97	>99
Esteárico C ₁₈)	>99	>99
Araqúidico (C ₂₀)	>99	>99

Condições reacionais: Substrato [13 mM], CvFAP [5,1 mg.mL⁻¹], Tampão Tris-HCl (pH 8,5), DMSO 30%, iluminação com luz azul (300W) por 30 e 60 minutos. Ácido mirístico (C₁₄H₂₈O₂) MM= 228,53g/mol; Ácido palmítico (C₁₆H₃₂O₂) MM= 256,4 g/mol; Ácido esteárico (C₁₈H₃₆O₂) MM= 284,48 g/mol; Ácido araquídico (C₂₀H₄₀O₂) MM= 312,5304 g/mol.

Reações de fotodescarboxilação catalisadas por essa enzima comumente requerem altas concentrações de biocatalisador e longos períodos de reação para que conversões satisfatórias possam ser alcançadas. Entretanto, não temos conhecimento de uma reação catalisada pela CvFAP na qual tenha sido utilizada uma lâmpada de luz violeta, cuja emissão abranja todo o espectro do visível. Dessa forma, este trabalho realizou o estudo de otimização das condições reacionais, tais como a potência do LED e tempo de reação, acelerando a formação de alcanos, saindo de 60 min para 10 minutos. Analisando a Tabela 2, em 60 minutos, observa-se a conversão superior a 99% em todos os ácidos utilizados com cadeia acima de 16 carbonos. Porém, pode-se observar que, em 10 min, com exceção novamente do ácido mirístico, todas as reações alcançaram um nível próximo ao da conversão completa. A resistência do ácido mirístico na luz violeta, confirma a preferência da CvFAP em ácidos de cadeia longa, como já citado na literatura por HUIBERS et. al, 2018, e nos leva a pensar na necessidade de uma maior potência de luz para ocorrer sua conversão.

Tabela 2: Conversão da reação de descarboxilação fotoenzimática na luz violeta.

Substrato	Conversão (%)	
	10 min	60 min
Mirístico (C ₁₄)	-	-
Palmítico (C ₁₆)	>99	>99
Esteárico (C ₁₈)	>99	>99
Araquídico (C ₂₀)	>99	>99

Condições reacionais: Substrato [13 mM], CvFAP [5,1 mg.mL⁻¹], Tampão Tris-HCl (pH 8,5), DMSO 30 %, iluminação com luz violeta (50W) por 10 e 60 min. Ácido mirístico (C₁₄H₂₈O₂) MM= 228,53g/mol; Ácido palmítico (C₁₆H₃₂O₂) MM= 256,4 g/mol; Ácido esteárico (C₁₈H₃₆O₂) MM= 284,48 g/mol; Ácido araquídico (C₂₀H₄₀O₂) MM= 312,5304 g/mol.

5. CONCLUSÃO

Nesta seção final, destaca-se o estudo que fornece altas conversões para fotodescarboxilação de diferentes ácidos graxos na presença de uma alceno sintase, a CvFAP, estabelecendo um novo modelo de atividade para formação desses hidrocarbonetos, utilizando LEDs alternativos com diferentes substratos. Dois tempos reacionais foram utilizados e a descarboxilação fotoenzimática se mostrou eficiente tanto em substratos ácidos com cadeia de 14 carbonos, quanto ácidos de cadeia composta por 20 carbonos, ampliando a gama de substratos que podem ser utilizados nestas reações de fotodescarboxilação.

A reação efetuada na luz LED (300W), apresentou conversões acima de 99 % para todos os ácidos utilizados no intervalo de 1 hora, comprovando sua eficiência na descarboxilação fotoenzimática de ácidos graxos de cadeia entre 14-20 carbonos. Embora no tempo de 30 minutos o ácido palmítico tenha apresentado conversão acima de 97 %, os demais ácidos apresentaram conversões acima de 99 %, assegurando a luz azul como uma interessante fonte de energia. Altas conversões foram observadas em apenas 10 minutos de reação na presença de luz violeta para os substratos utilizados, com exceção do ácido mirístico. Ademais, no tempo de 60 minutos foram totalmente convertidos em alcanos, os substratos com cadeia acima de 16 carbonos.

Comparando-se com resultados previamente reportados na literatura, essa metodologia demonstra a eficiência da CvFAP em processos catalíticos, apontando novos métodos de conversão de diferentes substratos ácidos. Deve ser considerado para os próximos passos a utilização de maiores concentrações de substrato, mas

levando em conta o objetivo de estabelecer um tempo reacional curto, superando os desafios para obter o uso mais amplo dessa família de enzimas, para aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

ALEKSENKO, V. A., ANAND, D., REMEEVA, A., et al. **“Phylogeny and Structure of Fatty Acid Photodecarboxylases and Glucose-Methanol-Choline Oxidoreductases”**, Catalysts, v. 10, n. 9, 2020.

BAIRD, C.; CANN, M. **“Química ambiental”**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.

BJÖRN, L. O. “Photoactive Proteins. **Photobiology: The Science of Light and Life**”, Third Edition, 3. ed. Nova Iorque, Springer-Verlag New York, 2015.

BONRNSHEUR UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. **“Engineering the third wave of biocatalysis”**. Nature. 2012 May 9;485(7397):185-94. doi: 10.1038/nature11117. PMID: 22575958.

HEYES, DERREN J.;LAKAVATH, BALAJI;HARDMAN, SAMANTHA J. O.;SAKUMA, MICHIO;HEDISON, TOBIAS M.;SRUTION, NIGELI S. **“Photochemical Mechanism of Light-Driven Fatty Acid Photodecarboxylase”**. ACS Catalysis. 2020. doi: 10.1021/acscatal.0c01684

SEEL CJ, T. Gulder, ChemBioChem 2019 , 20 , 1871. SKUBI, K. L., BLUM, T. R., YOON, T. P. **“Dual Catalysis Strategies in Photochemical Synthesis”**, Chemical Reviews, v. 116, n. 17, p. 10035–10074, 2016.

SKUBI, K. L., BLUM, T. R., YOON, T. P. **“Dual Catalysis Strategies in Photochemical Synthesis”**, Chemical Reviews, v. 116, n. 17, p. 10035–10074, 2016.”

FAGNONI. M, Dondi D, Ravelli D, Albin A. **“Photocatalysis for the formation of the C-C bond”**. Chem Rev. 2007 Jun;107(6):2725-56. doi: 10.1021/cr068352x. Epub 2007 May 27. PMID: 17530909.

FARIAS,Luciana A.I;FAVARO,Déborah I. T. **“Vinte anos de química verde:**

conquistas e desafios". Quím. Nova 34. 2011. [https://doi.org/ 10.1590/S01004042201100060 0030](https://doi.org/10.1590/S010040422011000600030)

FRANÇA Alexandre S., Breda Gabriela C., De Oliveira Kleber T., Almeida Rodrigo V., Hollmann Frank, De Souza Rodrigo O. M. A. **"Impact of sunlight irradiation on CvFAP photodecarboxylation"**. Frontiers in Catalysis. 3, 2023

HEDISON, T. M., HAYES, D. J., SCRUTTON, N. S. **"Making molecules with photodescarboxylase: A great start or a false dawn?"**, Current Research in Chemical Biology, v. 2, 2022

HISATOMI, T., KUBOTA, J., DOMEN, K. **"Recent advances in semiconductors for photocatalytic and photoelectrochemical water splitting"**. Chemical Society Reviews.[S.I.], Royal Society of Chemistry., 21 nov. 2014

HOFFMANN, N. **"Photochemical reactions of aromatic compounds and the concept of the photon as a traceless reagent"**. Photochemical & Photobiological Sciences, v. 11, n. 11, p.1613–1641, 17 out. 2012. DOI: 10.1039/C2PP25074H.

HUIJBERS, M. M. E., ZHANG, W., TONIN, F., et al. **"Light-Driven Enzymatic Decarboxylation of Fatty Acids"**, Angewandte Chemie - International Edition, v. 57, n. 41, p. 13648–13651, 2018.

IIDA, K., COX-FOSTER, D. L., YANG, X., et al. **"Expansion and evolution of insect GMC oxidoreductases"**, BMC Evolutionary Biology, v. 7, n. 75, 2007.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).

KAMADA, K. **"Photo-manipulation of activity of enzymes bound to inorganic nanomaterials"**, Journal of Solid State Chemistry, v. 280, n. July 2018, p. 120996, 2019.

KUMAR, A., SHARMA, S. K., SHARMA, G., et al. **"Wide spectral degradation of Norfloxacin by nano-assembly: Elucidating the photocatalytic mechanism under different light sources"**, Journal of Hazardous Materials, v. 364, p.429–440,

15 fev. 2019.

BENNINCA Luiza A.D., Alexandre S. França, Gabriela C. Brêda, Raquel A.C. Leão, Rodrigo V. Almeida, Frank Hollmann, Rodrigo O.M.A. de Souza. **“Continuous-flow CvFAP photodecarboxylation of palmitic acid under environmentally friendly conditions”**, Molecular Catalysis, Volume 528, 2022.

OLIVEIRA, R. C. de .;JUNGER, A. P.. **“Use of fossil fuels in Brazil and their environmental consequences. Research, Society and Development”**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e466997537, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i9.7537.

RAVELLI, D., DONDI, D., FAGNONI, M., et al. **“Photocatalysis. A multi-faceted concept for green chemistry”**, Chemical Society Reviews, v. 38, p. 1999–2011, 2009. DOI:10.1039/b714786b.

RUEDA-MARQUEZ, JJ; Levchuk, I.; Fernández Ibañez, P.; Sillanpää, M. **“Uma revisão crítica sobre a aplicação da fotocatalise para redução da toxicidade de águas residuais reais”**. J. Limpo. Prod. 2020 , 258 , 120694.

SCRUTTON, N. S. **“Enzymes make light work of hydrocarbon production”**, Science, v. 357, n. 6354, p. 872–873, 2017.

SORIGUÉ, D., LÉGERET, B., CUINÉ, S., et al. **“Microalgae Synthesize Hydrocarbons from Long-Chain Fatty Acids via a Light-Dependent Pathway”**, Plant physiology, v. 171, n. 4, p.2393–2405, 2016

SORIGUÉ, D., LÉGERET, B., CUINÉ, S., et al. **“An algal photoenzyme converts fatty acids to hydrocarbons”**, Science , v. 357, n. 6354, p. 903–907,2017.

SÜTZL, L., FOLEY, G., GILLAM, E. M. J., et al. **“The GMC superfamily of oxidoreductases revisited: analysis and evolution of fungal GMC oxidoreductases”**, Biotechnology for Biofuels, v. 12, n. 118, 2019.

XI, Y., YI, H., LEI, A. **“Synthetic applications of photoredox catalysis with visible light”**,Organic and Biomolecular Chemistry, v. 11, n. 15, p. 2387–2403, 2013.

ZHANG, P., ZHANG, J., GONG, J. **“Tantalum-Based Semiconductors for Solar Water Splitting”**, Chemical Society Reviews, v. 43, p. 4395–4422, 2014.

ANEXOS

Cromatogramas referentes às reações realizadas na azul e violeta, descritos na seção 3.3 e 3.4.

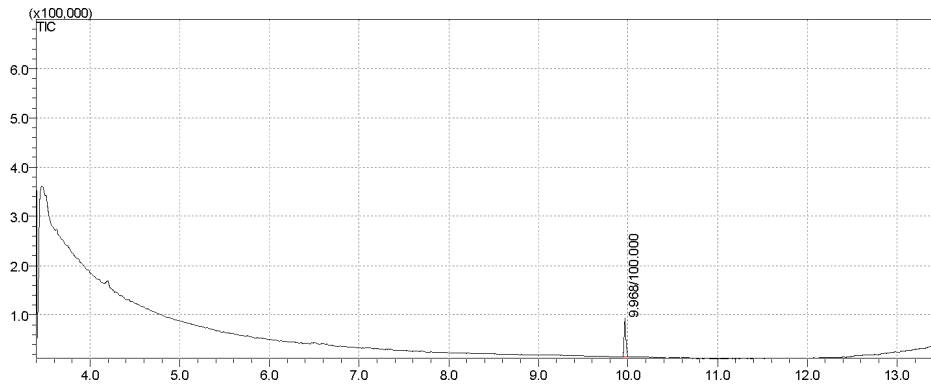


Figura 1: Padrão mirístico, tempo de retenção: 9.9.

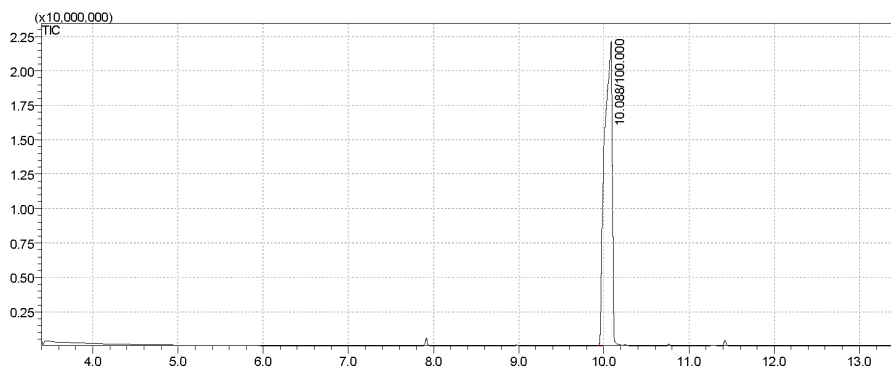


Figura 2: Padrão palmítico, tempo de retenção: 10.0.

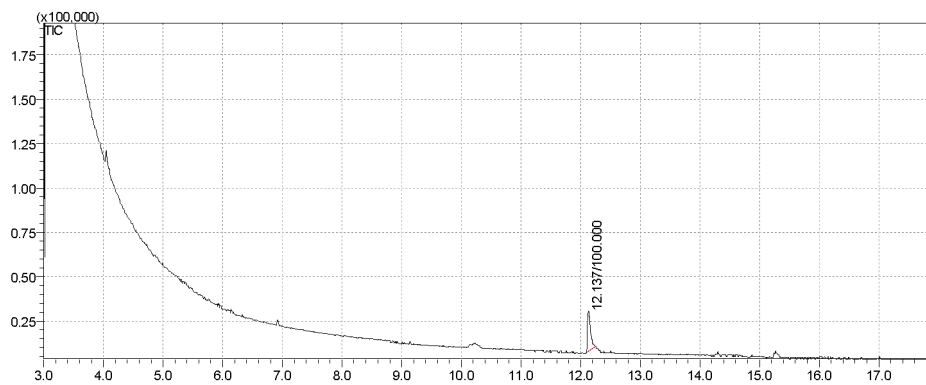


Figura 3: Padrão esteárico, tempo de retenção: 12.1.

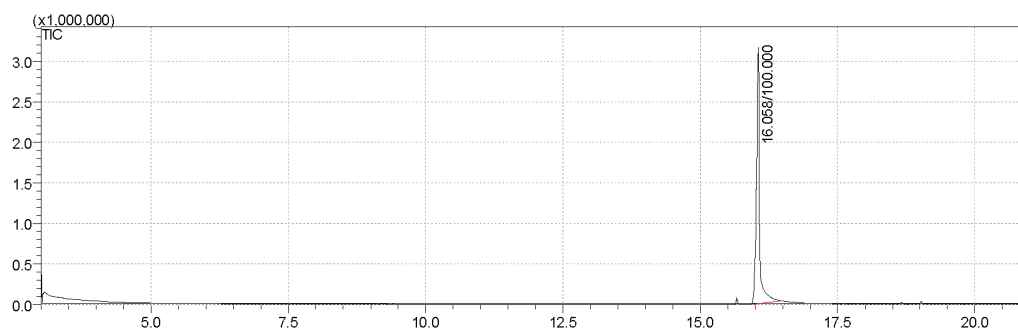


Figura 4: Padrão Araquidico, tempo de retenção: 16.0.

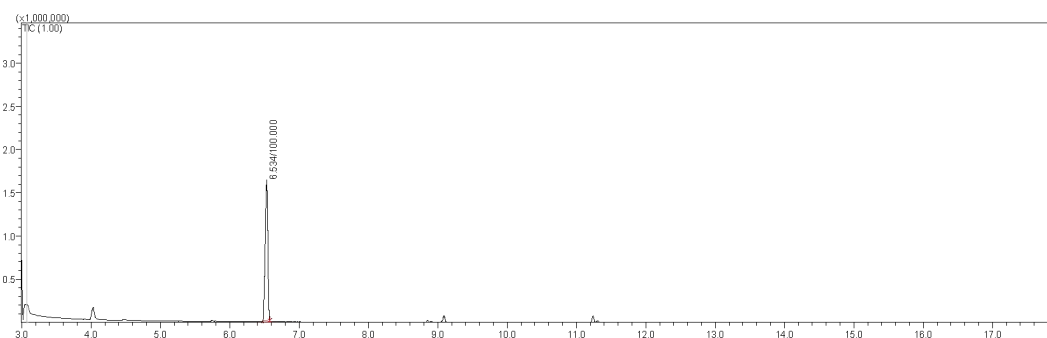


Figura 5: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido mirístico mediado por CvFAP na presença de luz azul 300 w em 30 min Tempo de retenção: 6.5 (tridecano); Conversão: >99%.

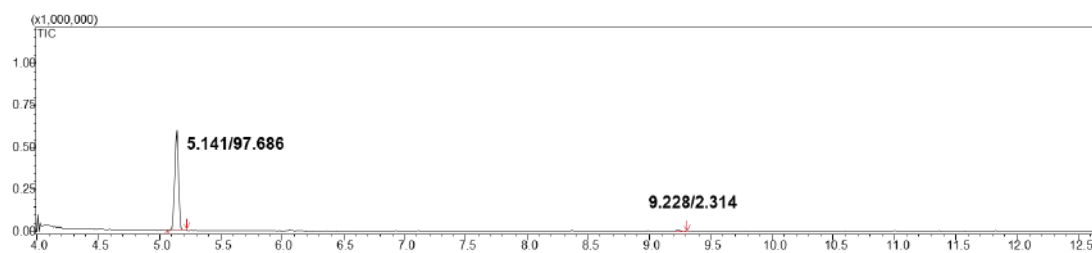


Figura 6: Cromatograma da fotodescarboxilação do ácido palmítico mediado por CvFAP na presença de luz azul 300w em 30 min. Tempo de retenção: 5.1 (pentadecano); Conversão: >97%

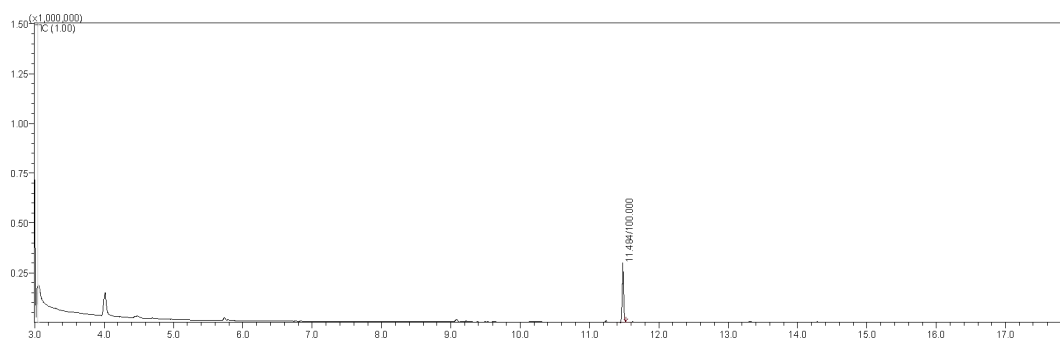


Figura 7: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido esteárico mediado por CvFAP na presença de luz azul 300 w em 30 min Tempo de retenção: 11.4 (heptadecano); Conversão: >99%.

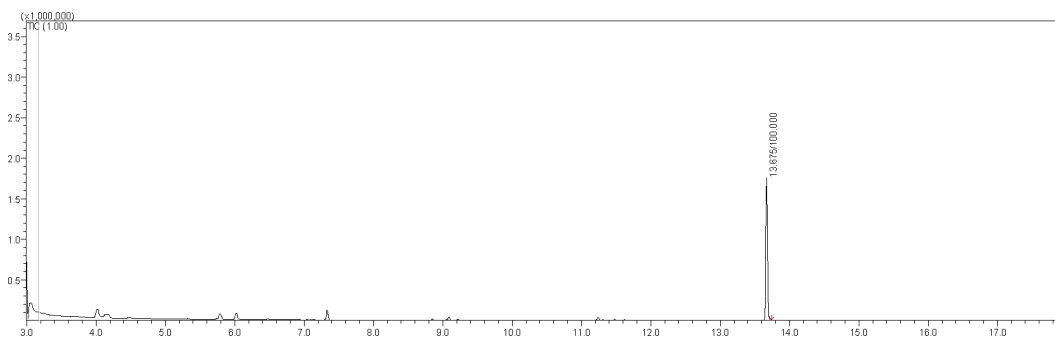


Figura 8: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido araquídico mediado por CvFAP na presença de luz azul 300 w em 30 min Tempo de retenção: 13.6 (nonadecano); Conversão: >99%.

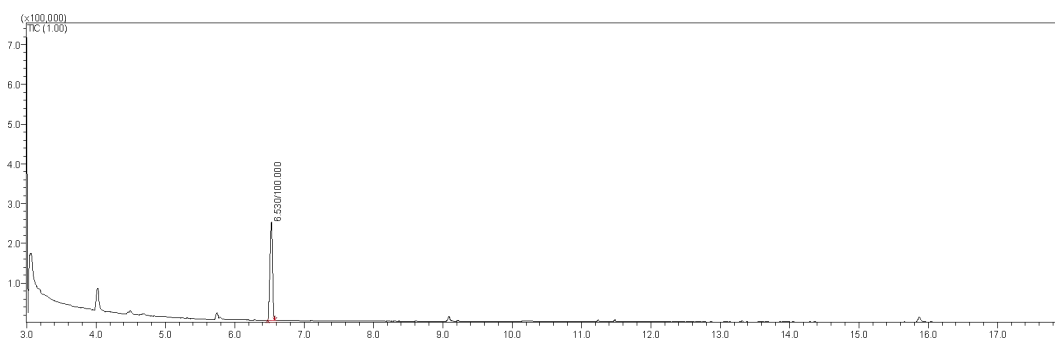


Figura 9: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido mirístico mediado por CvFAP na presença de luz azul 300 w em 60 min Tempo de retenção: 6.5 (tridecano); Conversão: >99%.

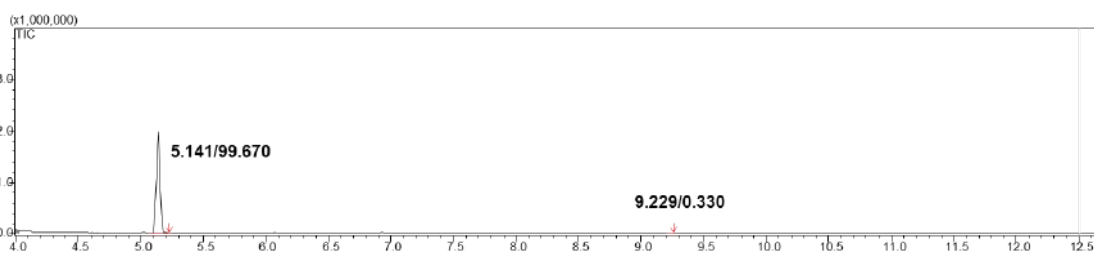


Figura 10: Cromatograma da fotodescarboxilação do ácido palmítico mediado por CvFAP na presença de luz azul 300w em 60 min. Tempo de retenção: 5.1 (pentadecano); Conversão: >99%.

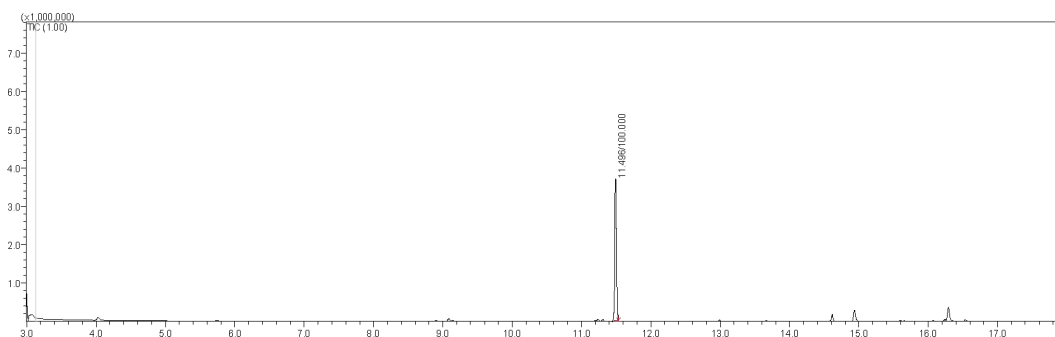


Figura 11: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido esteárico mediado por CvFAP na presença de luz azul 300 w em 60 min. Tempo de retenção: 11.4 (heptadecano); Conversão: >99%.

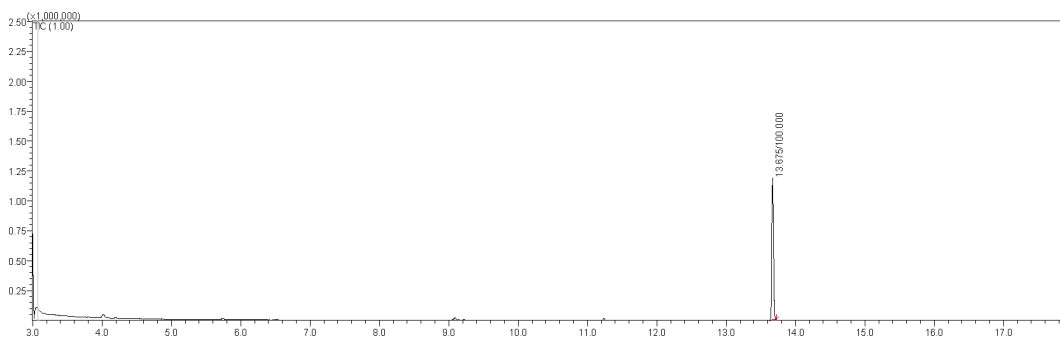


Figura 12: Espectro de massas da fotodescarboxilação do Ácido araquídico mediado por CvFAP na presença de luz azul 300 w em 60 min. Tempo de retenção: 13.6 (nonadecano); Conversão: >99%.

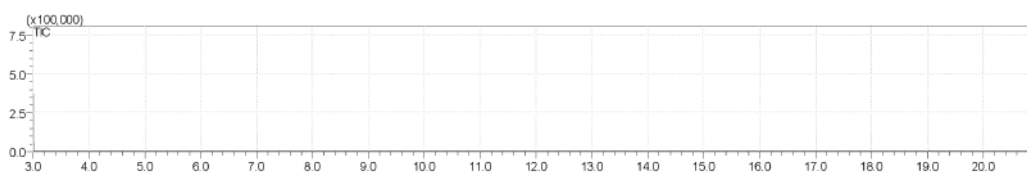


Figura 13: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido mirístico mediado por CvFAP na presença de luz violeta em 10 min. Conversão: -.

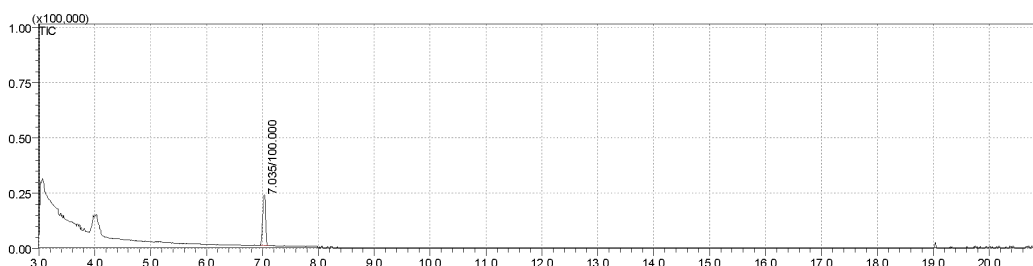


Figura 14: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido palmítico mediado por CvFAP na presença de luz violeta 50 w em 10 min. Tempo de retenção: 7.0 (pentadecano); Conversão: >99%.

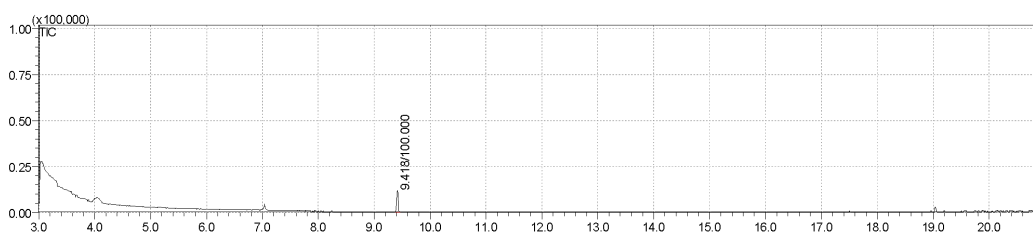


Figura 15: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido esteárico mediado por CvFAP na presença de luz violeta 50 w em 10 min Tempo de retenção: 9.4 (heptadecano); Conversão: >99%.

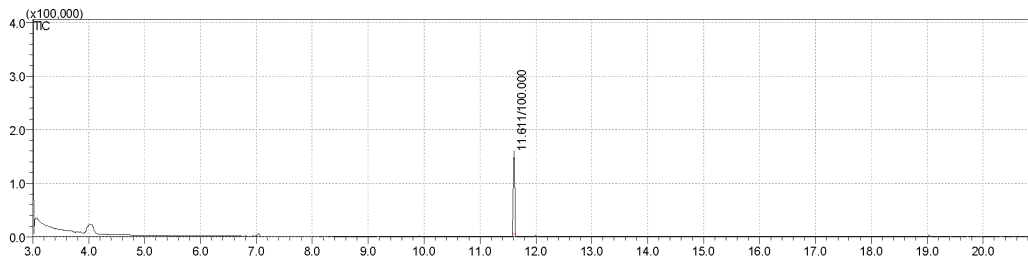


Figura 16: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido araquídico mediado por CvFAP na presença de luz violeta 50 w em 10 min. Tempo de retenção: 11.6 (nonadecano); Conversão: >99%.

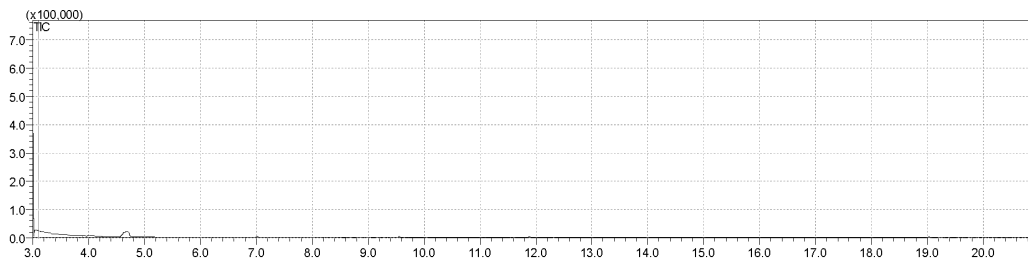


Figura 17: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido mirístico mediado por CvFAP na presença de luz violeta 50 w em 60 min. Conversão:-.

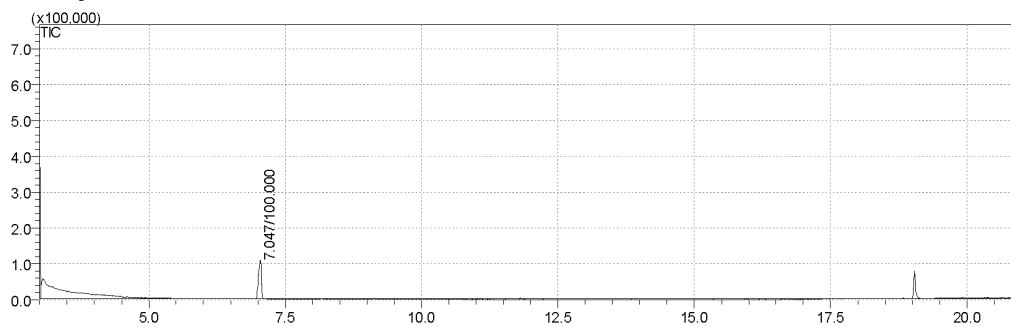


Figura 18: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido palmítico mediado por CvFAP na presença de luz violeta 50 w em 60 min Tempo de retenção: 7.0 (pentadecano); Conversão: >99%.

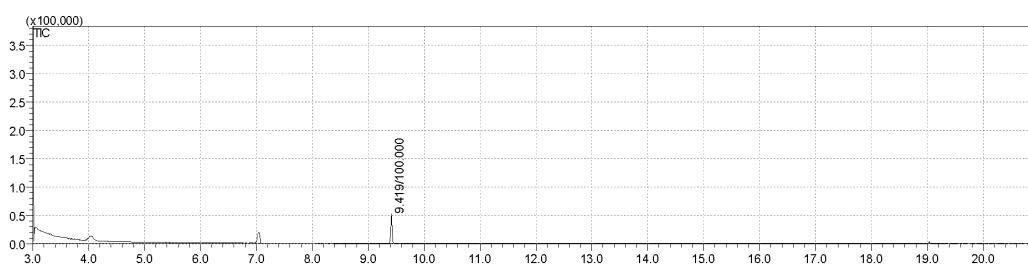


Figura 19: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido esteárico mediado por CvFAP na presença de luz violeta 50 w em 60 min. Tempo de retenção: 9.4 (heptadecano); Conversão: >99%.

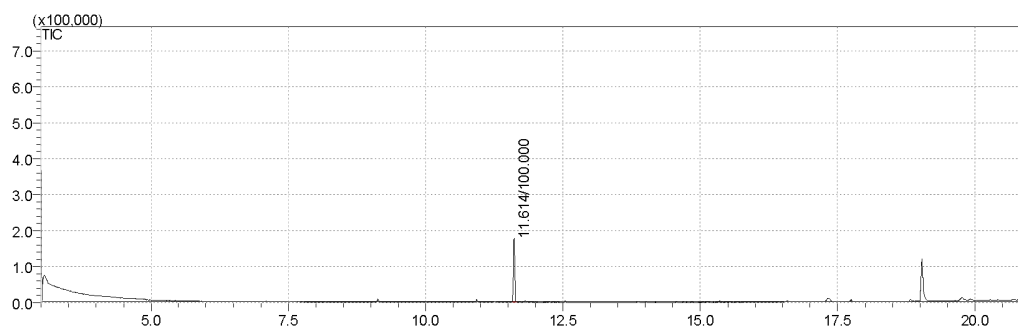


Figura 20: Espectro de massas da fotodescarboxilação do ácido araquídico mediado por CvFAP na presença de luz violeta em 60 min. Tempo de retenção: 11.6 (nonadecano); Conversão: >99%.