

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

DANIELY DA SILVA PINHEIRO

**REDUÇÃO ENANTIOSSELETIVA DE CETONAS UTILIZANDO FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DA AMAZÔNIA**

Orientadora: Dra. Sandra Patrícia Zanotto  
Co-orientador: Dr. Luciano Fernandes

---

Manaus, Novembro de 2010

DANIELY DA SILVA PINHEIRO

**REDUÇÃO ENANTIOSELETIVA DE CETONAS UTILIZANDO FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DA AMAZÔNIA**

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de **Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia** no **Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia** da Universidade do Estado do Amazonas.

Manaus, 18 de Novembro de 2010

---

**Profa. Dra. Sandra Patrícia Zanotto**  
**Cordenadora do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia**  
**e Recursos Naturais da Amazônia**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Sandra Patrícia Zanotto  
Orientadora

---

Profa. Dra. Rita de Cássia S. Nunomura

---

Profa. Dra. Cristina Sayuri Maki

*“Não há receitas mágicas que nos façam vencer obstáculos.  
Mas ousa dizer que há um jeito interessante de olhar para as  
quedas que sofremos.  
É só não permitir que elas sejam definitivas.  
É só não perder de vista a primavera que o outono prepara.  
Viver pra mim é Cristo, morrer pra mim é ganho  
Não há outra questão quando se é cristão não se para de lutar.”  
(Padre Fábio de Melo)*

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais: Irlânia e Cleomir,  
que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida.*

*À minha avó Iza Moraes (in memoriam) por todo o carinho e aconchego...  
“O tempo ameniza a dor mas não apaga as lembranças”*

*Ao meu noivo Denis pelo amor em todas as horas.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas que contribuíram de alguma forma para este trabalho, minhas desculpas que minha memória não puder lembrar.

Primeiramente, a Deus todo poderoso que sempre me amparou em todos os momentos da minha vida, sem o qual nada seria possível.

Aos meus pais e a minha irmã Lary pelo amor incondicional e por estarem sempre ao meu lado incentivando e aconselhando para que eu nunca desistisse diante das dificuldades. Amo vocês!

À minha querida avó Iza (*in memoriam*), pela paciência e compreensão diante de minha ausência nos fins de semana em sua casa. A senhora estará sempre em meu coração.

Ao meu amor Denis, pelo grande incentivo, companheirismo... enfim por sempre estar ao meu lado nos momentos alegres e difíceis. Te amo.

À minha amiga Marcia Seixas pela amizade desde a faculdade até o mestrado, obrigada pela força e contribuição neste trabalho.

Aos meus amigos da turma de mestrado, principalmente a Dani Cordeiro, Patrick Gomes e Renah Boanerges por toda ajuda e palavras de incentivo durante este tempo.

À minha orientadora Profa. Sandra Patrícia Zanotto, pela confiança depositada e orientação na realização deste trabalho.

Aos professores Luciana Boer e Luciano Fernandes pela paciência, orientação e auxílio fundamental durante este trabalho.

À professora Ana Hilda pela valiosa colaboração e apoio nas análises de CG.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório de Biorgânica - MBT, Fabrícia, Adam, Nildo, Walber, Soraya, Janaína, Laurinha em especial a Fabrícia que trabalhou diretamente na realização deste projeto.

À Dolores Fonseca e a Jucileuza Conceição pela valiosa ajuda no laboratório, por serem sempre tão prestativas e “cuidarem” dos fungos da coleção.

Ao professor Boris U. Stambuk do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina pela doação das linhagens industriais **CAT-1** e **PE-2** de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ao técnico Marcelo da Central de Análises da Universidade Federal de Santa Catarina pela realização das análises de IV.

E por todas as pessoas que achavam que eu iria ficar “lelé da cuca” devido a dedicação ao mestrado, obrigada, pois, as críticas me deram forças para continuar, perseverar e finalizar este trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa concedida durante o mestrado.

	Página
<b>ÍNDICE GERAL</b>	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	xvi
<b>RESUMO</b>	xvii
<b>ABSTRACT</b>	xix
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 <b>Considerações gerais</b>	1
1.2 <b>Compostos quirais</b>	2
1.2.1 Enantiômeros	2
1.2.2 Álcoois quirais	8
1.3 <b>Enzimas</b>	9
1.3.1 Modelos de catálise enzimática	7
1.3.2 Classificação enzimática	7
1.3.3 Lipases	9
1.3.4 Oxiredutases (Desidrogenases)	12
1.4 <b>Biocatálise</b>	14
1.5 <b>Utilização de microrganismos em reações de redução</b>	15
1.5.1 Fungos endofíticos	17
1.5.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura)	18
1.6 <b>Redução Enantiosseletiva de compostos carbonílicos por microrganismos</b>	20
1.7 <b>Redução assimétrica (via química)</b>	21
1.8 <b>Resolução enzimática de racêmicos</b>	23
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
2.1 <b>Objetivo geral</b>	<b>24</b>
2.2 <b>Objetivos Específicos</b>	<b>24</b>

<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>25</b>
3.1 <b>Equipamentos</b>	25
3.2 <b>Materiais</b>	26
3.3 <b>Fungos e condições de cultivo</b>	29
3.3.1 Fungos utilizados nas Reações de Redução	29
3.3.2 Fungos utilizados nas Reações de Resolução	30
3.4 <b>Síntese de álcoois racêmicos</b>	31
3.5 <b>Reações de Redução enantiosseletiva</b>	34
3.5.1 Reações de redução de cetonas utilizando fungos endofíticos	34
3.5.2 Reação de redução de cetonas com tucumã ( <i>Astrocaryum aculeatum</i> )	35
3.5.3 Reação de redução de cetonas utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fermento de pão biológico comercial) em diferentes sistemas	35
3.6 <b>Resolução enzimática</b>	36
3.6.1 Resolução Biocatalítica do Zerumbol utilizando a enzima comercial Novozyme 435 (lipase B de <i>Candida antarctica</i> )	36
3.6.2 Resolução enzimática do zerumbol racêmico por micélios de fungos da Amazônia	36
3.7 <b>Determinação da conversão e do excesso enantiomérico</b>	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
4.1 <b>Síntese de álcoois racêmicos</b>	39
4.2 <b>Reações de redução de cetonas mediadas por fungos endofíticos</b>	43
4.2.1 Reação de redução da <i>p</i> -nitroacetofenona mediada por fungos endofíticos	44
4.2.2 Reação de redução do acetoacetato de etila mediada por fungos endofíticos	47
4.2.3 Reação de redução do $\alpha$ -cloroacetofenona mediada por fungos endofíticos	51
4.2.4 Reação de redução da zerumbona mediada por fungos endofíticos	53



4.3	<b>Reações de redução de cetonas utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes sistemas</b>	54
4.3.1	Reação de redução do acetoacetato de etila utilizando linhagens industriais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes sistemas	55
4.3.2	Reação de redução da zerumbona utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
4.4	<b>Reações de redução de cetonas com tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>)</b>	59
4.4.1	Reação de redução da <i>p</i> -nitroacetofenona com tucumã ( <i>Astrocaryum aculeatum</i> )	60
4.4.2	Reação de redução da zerumbona com tucumã ( <i>Astrocaryum aculeatum</i> )	63
4.5	<b>Resolução enzimática</b>	64
4.5.1	Resolução do zerumbol racêmico por lipase B de <i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435)	64
4.5.2	Resolução do zerumbol racêmico por micélios de fungos da Amazônia	68
5.	<b>CONCLUSÕES</b>	70
6.	<b>PERSPECTIVAS</b>	71
7.	<b>REFERÊNCIAS</b>	72
8.	<b>ANEXOS</b>	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1-</b> Representação de um centro quiral	2
<b>Figura 2-</b> Exemplo de pares de enantiômeros com atividades biológicas diferentes. (A) Limoneno, (B) Etambutol, (C) Talidomida.	3
<b>Figura 3-</b> Exemplos de álcoois quirais utilizados na indústria	5
<b>Figura 4-</b> Reações catalisadas por lipases em aplicação na biocatálise.	10
<b>Figura 5-</b> Representação esquemática da estrutura cristalina da Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (3.1.1.3) com ampliação do sítio catalítico.	11
<b>Figura 6-</b> Representação esquemática da estrutura cristalina da lipase B de <i>Candida antarctica</i> .	12
<b>Figura 7-</b> Representação esquemática da estrutura cristalina da Álcool desidrogenase utilizando seu cofator NADH.	13
<b>Figura 8-</b> Redução de cetonas catalisada por ADHs	13
<b>Figura 9-</b> Cofator Nicotidamina Adenina Difosfato (NAD(P)H)	14
<b>Figura 10-</b> Representação esquemática da reação de redução da acetofenona utilizando o fermento de pão biológico (FP), imobilização com Montmorilonita-k10 (K10), glicose (G) e Sacarose (S) em meio orgânico.	16
<b>Figura 11-</b> Redução de cetonas por fungos endofíticos	18
<b>Figura 12-</b> Redução do acetoacetato de etila por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
<b>Figura 13-</b> Redução enantiosseletiva da 4-etilciclohexanona pelo fungo <i>Botrytis cinerea</i> .	21
<b>Figura 14-</b> Redução de uma cetona a álcool secundário	21
<b>Figura 15-</b> Redução com NaBH <sub>4</sub> do acetoacetato de etila em 3-hidroxi-butanoato de etila	22
<b>Figura 16-</b> Redução da zerumbona via química e via enzimática.	22
<b>Figura 17-</b> Resolução de álcoois secundários por lipase em meio orgânico	23

<b>Figura 18 -</b>	Cromatógrafo em fase gasosa (Central de Análises - Laboratório de Biorgânica/MBT).	25
<b>Figura 19</b>	Estruturas das cetonas utilizadas nas reações de redução	27
<b>Figura 20-</b>	Fungos endofíticos utilizados nas reações de redução de cetonas.	30
<b>Figura 21-</b>	Fungos UEA_115 e CG10_01 utilizados nas reações de resolução.	31
<b>Figura 22-</b>	Representação esquemática das reações de redução com fungos endofíticos.	34
<b>Figura 23-</b>	Redução das diferentes cetonas utilizando NaBH <sub>4</sub> em metanol.	40
<b>Figura 24-</b>	Cromatograma de CG-quiral do 3-hidroxi-butanoato de etila racêmico.	41
<b>Figura 25-</b>	Espectro de Infravermelho (IV) do zerumbol racêmico em pastilha de KBr.	42
<b>Figura 26-</b>	Cromatograma em coluna quirial do zerumbol racêmico.	43
<b>Figura 27-</b>	Esquema da redução enantiosseletiva da <i>p</i> -nitroacetofenona utilizando fungos endofíticos.	44
<b>Figura 28-</b>	Cromatogramas em CG-quiral: o <i>p</i> -nitrofeniletanol obtido por redução via química, reação de 72 horas utilizando fungo CF02_03 e reação de 72 horas de reação utilizando fungo CF03_05.	46
<b>Figura 29-</b>	Esquema da reação de redução do acetoacetato de etila mediada por fungos endofíticos.	47
<b>Figura 30-</b>	Esquema da biotransformação do acetoacetoacetato de etila com fungos endofíticos e o suposto produto formado. Adaptado da referência (SAKAI, et al., 1999).	49
<b>Figura 31-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF03_05.	50
<b>Figura 32-</b>	Esquema da reação de redução da $\alpha$ -cloroacetofenona mediada por fungos endofíticos.	51
<b>Figura 33-</b>	Sobreposição dos cromatogramas: $\alpha$ -cloroacetofenona, 2-clorofeniletanol e reação de redução da $\alpha$ -cloroacetofenona com o fungo CF03_04 em 24 horas.	52
<b>Figura 34-</b>	Esquema das reações de redução da zerumbona utilizando cepas fúngicas endofíticas.	53

<b>Figura 35-</b>	Esquema das reações de redução utilizando linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : fermento de pão comercial ( <b>FP</b> ) e as linhagens industriais ( <b>CAT-1 e PE-2</b> ).	55
<b>Figura 36-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: reação de 36 horas utilizando <b>PE-2</b> , o 3-hidroxi-butanoato de etila obtido por redução via química e reação de 36 horas utilizando <b>CAT-1</b>	58
<b>Figura 37-</b>	Esquema das reações de redução da zerumbona mediada por fermento de pão comercial ( <b>FP</b> ) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	59
<b>Figura 38-</b>	Esquema das reações de redução da <i>p</i> -nitroacetofenona utilizando tucumã como biocatalisador.	60
<b>Figura 39-</b>	Sobreposição de cromatogramas: a substância inicial <i>p</i> -nitroacetofenona (cetona), <i>p</i> -nitrofeniletanol racêmico obtido por redução via química e alíquota de 48 horas da reação de redução utilizando a casca de tucumã.	62
<b>Figura 40-</b>	Esquema das reações de redução da zerumbona utilizando a polpa e a casca do tucumã.	63
<b>Figura 41-</b>	Esquema da reação de resolução do zerumbol racêmico utilizando lipase B de <i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435)	65
<b>Figura 42-</b>	Sobreposição de cromatogramas: a substância inicial a zerumbona, o álcool racêmico obtido por redução via química e a alíquota de 1 hora da reação de resolução utilizando Novozyme 435.	67
<b>Figura 43-</b>	Sobreposição de cromatogramas: a substância inicial a zerumbona, o álcool racêmico obtido por redução via química e a alíquota de 20 horas da reação de resolução utilizando Novozyme 435.	68
<b>Figura 44-</b>	Esquema da reação de resolução do zerumbol racêmico utilizando cepas fúngicas endofíticas: UEA_115 e CG10_01	69
<b>Figura 45-</b>	Cromatograma de CG-quiral do <i>p</i> -nitrofeniletanol racêmico (Conforme as condições descritos na <b>tabela 4</b> ).	81
<b>Figura 46-</b>	Cromatograma de CG-quiral do 2-clorofeniletanol racêmico (Conforme as condições descritos na <b>tabela 4</b> ).	81
<b>Figura 47-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial <i>p</i> -nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 48 horas de reação utilizando fungo CF03_05.	82
<b>Figura 48-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial <i>p</i> -nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 24 horas de reação utilizando fungo CF03_05.	82

<b>Figura 49-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial <i>p</i> -nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF1102.	83
<b>Figura 50-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial <i>p</i> -nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 48 horas de reação utilizando fungo CF11_02.	83
<b>Figura 51-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial alfacloroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CG05_04.	84
<b>Figura 52-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial $\alpha$ -cloroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 24 horas de reação utilizando fungo CG05_04.	84
<b>Figura 53-</b>	Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial $\alpha$ -cloroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF03_04.	85
<b>Figura 54-</b>	Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial $\alpha$ -cloroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF02_03	85
<b>Figura 55-</b>	Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF03_05	86
<b>Figura 56-</b>	Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF01_06.	86
<b>Figura 57-</b>	Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF11_02.	87
<b>Figura 58-</b>	Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CG05_04	87

<b>Figura 59-</b>	Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CG03_08.	88
<b>Figura 60-</b>	Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CG03_08.	88
<b>Figura 61-</b>	Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 64 horas de reação utilizando <b>FP/T10%</b> .	89
<b>Figura 62-</b>	Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 36 horas de reação utilizando <b>CAT-1/S10%</b> .	89
<b>Figura 63-</b>	Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 36 horas de reação utilizando <b>PE-2/S10%</b> .	90
<b>Figura 64-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial <i>p</i> -nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 24 horas de reação utilizando a casca do tucumã.	90
<b>Figura 65-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: <i>p</i> -nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 48 horas de reação utilizando a polpa do tucumã.	91
<b>Figura 66-</b>	Sobreposição de cromatogramas: a substância inicial a zerumbona, o álcool racêmico obtido por redução via química e a alíquota de 46 horas da reação de resolução utilizando Novozyme 435.	91
<b>Figura 67-</b>	Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: o álcool racêmico obtido por redução via química e reação de redução da zerumbona com o fungo CG0308	92

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1-</b> Classificação internacional das enzimas	8
<b>Tabela 2-</b> Código para identificação de fungos endofíticos isolados de plantas amazônicas para a reação de redução de cetonas e resolução de álcool racêmico.	28
<b>Tabela 3-</b> Proporções estequiométricas dos reagentes para a síntese dos álcoois racêmicos.	32
<b>Tabela 4-</b> Condições de programação do CG-quiral	38
<b>Tabela 5-</b> Resultados das reações de redução da <i>p</i> -nitroacetofenona mediada por fungos endofíticos	45
<b>Tabela 6-</b> Reação de redução do acetoacetato de etila utilizando fungos endofíticos	48
<b>Tabela 7-</b> Reação de redução da alfa cloroacetofenona mediada por fungos endofíticos.	51
<b>Tabela 8-</b> Reação de redução do acetoacetato de etila mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	57
<b>Tabela 9-</b> Resultados dos cromatogramas obtidos da reação do tucumã.	61
<b>Tabela 10-</b> Resultados obtidos da resolução do zerumbol racêmico.	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\alpha$	=Alfa
$\beta$	=Beta
<b>BDA</b>	= batata-dextrose-agar
<b>BD</b>	= batata-dextrose
<b>%c</b>	= porcentagem de conversão
<b>CAT-1</b>	= levedura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> modificada
<b>CBA</b>	= Centro de Biotecnologia da Amazônia
<b>CG</b>	= cromatografia em fase gasosa
<b>CG-quiral</b>	=cromatografia em fase gasosa com coluna estacionária quiral
<b>CNPq</b>	= Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>DMSO</b>	=solvente Dimetilsulfóxido
<b>E</b>	= razão enantiomérica
<b>Eq.</b>	= equação
<b>ee</b>	= excesso enantiomérico
<b>ee<sub>p</sub></b>	= excesso enantiomérico do produto
<b>ee<sub>s</sub></b>	= excesso enantiomérico do substrato
<b>ES</b>	= enzima-substrato
<b>FAPEAM</b>	= Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
<b>FP</b>	= Fermento de pão comercial
<b>CLAE</b>	= Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>IUBMB</b>	= União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
<b>INPA</b>	= Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<b>IV</b>	=Espectroscopia de Infravermelho
<b>LiAlH<sub>4</sub></b>	=Hidreto de alumínio e lítio
<b>MeOH</b>	=Metanol
<b>NaBH<sub>4</sub></b>	=Borohidreto de sódio
<b>OAc</b>	=Acetato de vinila
<b>PE-2</b>	= levedura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> modificada
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	=Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>S10%</b>	=Solução de Sacarose a 10%



**T10%** = Solução de Trealose a 10%  
**UFSC** = Universidade Federal de Santa Catarina  
**UV** = Ultra-Violeta  
**°C** = graus-celsius

## RESUMO

Neste trabalho, foi realizada a redução enantiosseletiva das cetonas: *p*-nitroacetofenona, acetoacetato de etila,  $\alpha$ -cloroacetofenona e zerumbona mediada por fungos endofíticos da Amazônia, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento de pão comercial- **FP** e linhagens industriais **CAT-1** e **PE-2**) e a resolução do álcool racêmico zerumbol por lipase B de *Candida antarctica* em meio orgânico. As cetonas foram reduzidas com NaBH<sub>4</sub> obtendo-se álcoois racêmicos que foram utilizados como padrões para as análises cromatográficas. Na redução enantiosseletiva da *p*-nitroacetofenona por fungos endofíticos amazônicos foram obtidos álcoois quirais com excelentes resultados, em 72h, os álcoois tiveram boas porcentagens de conversões (87% para CF02\_03, 61% para CF03\_05) e altos excessos enantioméricos (**ee**) (97% e 91%). Os fungos que apresentaram maiores enantiosseletividades foram as cepas CF02\_03 e o CF03\_05. Esses microrganismos foram capazes de formar seletivamente álcoois enantiomericamente puros, sendo a cepa CF02\_03 bastante seletiva para a formação de um dos isômeros e a cepa CF03\_05 foi seletiva para o outro enantiomero. Nas reações de redução do acetoacetato de etila, os fungos endofíticos produziram um sub-produto não desejado em 24 horas de reação. O fungo CF03\_05 obteve a maior conversão (78%) desse produto em 72 horas. As reações de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona foram realizadas com as cepas CG05\_04 e CF03\_04. Em 72h produziram álcoois quirais com as conversões de 19% e 26% respectivamente, e apresentaram bons excessos enantioméricos (23% e 47%). Nas reações de redução do acetoacetato de etila mediada por **FP** obteve-se em 36h uma conversão de 0.85% e **ee** de 26%. Nas reações de redução do acetoacetato de etila utilizando linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, **CAT-1** e **PE-2**, obteve-se maior conversão e **ee**, destacando-se a reação com a cepa **PE-2**, em 36h, obteve-se 45% de conversão e **ee** de >99%, embora com a outra cepa **CAT-1** foi obtido uma conversão baixa de 24% e **ee** de >99%. Na reação de redução da *p*-nitroacetofenona utilizando a casca e polpa do tucumã verificou-se que a formação dos álcoois ocorre em 48 horas, sendo que a maior conversão (86%) foi obtida com a casca e o maior **ee** (46%) foi obtido com a polpa. Segundo dados na literatura, a formação dos álcoois se deve provavelmente à presença de fungos endofíticos ou enzimas do fruto. A redução enantiosseletiva da zerumbona não ocorreu quando utilizou-se fungos endofíticos, fermento de pão e tucumã. Entretanto, realizou-se a resolução do zerumbol racêmico com a enzima Novozyme 435 obtendo-se boa conversão (50%), altos excessos enantioméricos (>99 e >99%) e razão enantiomérica >200. De modo geral, obtiveram-se resultados bastante promissores com biocatalisadores alternativos para redução enantiosseletiva de cetonas, com elevado excesso enantiomérico e porcentagem de conversão. Um resultado que se destacou foi a seletividade de duas cepas fúngicas onde os enantiômeros foram formados distintamente com cada uma das cepas. Com este resultado pode-se visualizar a prospecção de diferentes biocatalisadores com enantiosseletividades distintas para uma mesma reação.

Palavras-chave: Amazônia; fungos endofíticos; álcoois quirais; biorredução

## ABSTRACT

This study was performed, enantioselective reduction of ketones: *p*-nitroacetophenone, ethyl acetoacetate,  $\alpha$ -chloroacetophenone and zerumbone mediated by endophytic fungi of the Amazon, *Saccharomyces cerevisiae* (Baker yeast commercial and industrial strains **FP**, **CAT-1** and **PE-2** and the resolution of racemic alcohol zerumbol by lipase B from *Candida antarctica* in organic medium. The ketones were reduced with NaBH<sub>4</sub> to racemic alcohols were used as standards for GC analysis. In the enantioselective reduction of *p*-nitroacetophenone by endophytic fungi the chiral alcohols were obtained with excellent results in 72 hours, the alcohols had good conversion percentage (87% to CF02\_03, 61% to CF03\_05) and high enantiomeric excess (**ee**) (97% and 91%). Fungi that showed higher enantioselectivities were strains CF02\_03 and CF03\_05. These microorganisms were able to selectively form enantiomerically pure alcohols, and the strain CF02\_03 quite selective for the formation of one isomer and the strain CF03\_05 was selective for the other enantiomer. In the reactions of reduction of ethyl acetoacetate, the endophytics have produced an unwanted product in 24 hours of reaction. The fungus CF03\_05 obtained the highest conversion (78%) of the product in 72 hours. The reduction reactions of  $\alpha$ -chloroacetophenone were performed with the strains CG05\_04 and CF03\_04. Chirals alcohols produced in 72 hours with conversions showed of 19% and 26% respectively, and good enantiomeric excesses (23% and 47%). In the reactions of reduction of ethyl acetoacetate mediated **FP** was obtained in 36h and a conversion of 0.85% and 26% **ee**. In the reactions of reduction of ethyl acetoacetate using industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*, **CAT-1** and **PE-2**, has been a higher conversion and **ee**, highlighting the reaction with strain **PE-2**, 36h, we obtained 45 % conversion and **ee** of >99%, although another strain with the **CAT-1** was obtained from a low conversion of 24% and **ee**> 99%. In the reduction reaction of *p*-nitroacetophenone using the peel and pulp of tucumã found that the formation of alcohols in 48 hours, and the highest conversion (86%) was obtained from the bark and the highest **ee** (46%) was obtained from the pulp. According to data in the literature, the formation of alcohols is probably due to the presence of endophytic fungi or enzymes of the fruit. The enantioselective reduction of zerumbone not occurred when it was used endophytic fungi, baker yeast and tucumã. However, there was the resolution of racemic zerumbol with enzyme Novozyme 435 resulting in good conversion (50%), high enantiomeric excess (>99 and >99%) and enantiomeric ratio >200. In general, we obtained very promising results with alternative biocatalysts for enantioselective reduction of ketones with high enantiomeric excess and conversion. One result that stood out was the selectivity of two fungal strains where the enantiomers were formed distinctly with each of the strains. With this result we can visualize the exploration of different biocatalysts with different enantioselectivities for the same reaction.

Keywords: Amazon; endophytic fungi; chirals alcohols; bioreduction

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

Os avanços em síntese orgânica nos últimos anos vêm possibilitando a preparação de compostos opticamente puros, em particular úteis em relação às suas propriedades biológicas. A produção de fármacos e moléculas precursoras tem contribuído para o crescente desenvolvimento de novos processos industriais (FABER et al., 1997; FABER; PATEL, 2000; DERMIJIAN et al., 2000; CHARTRAIN et al., 2001).

Um método conhecido para obtenção de compostos enantiomericamente puros é o uso de enzimas, as enzimas conhecidas industrialmente como biocatalisadores são catalisadores altamente seletivos e vêm sendo empregadas na biotransformação de moléculas bioativas. As modificações estruturais nas moléculas podem levar ao aumento da atividade biológica ou à inibição de efeitos indesejáveis (FABER, 2007).

A utilização de microrganismos como catalisadores para a redução assimétrica, ou seja, a transferência de dois átomos de hidrogênio com a introdução de um novo centro quiral, de cetonas pró-quirais produzindo os álcoois correspondentes é uma técnica bem estabelecida na área de biocatálise (WENDHAUSEN, 1998). É reconhecidamente um método valioso para a preparação de álcoois quirais de excelente pureza óptica. Industrialmente, os fungos são mais valorizados porque as enzimas por eles produzidas geralmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio (VULFSON, 1994). No entanto, quando é necessário, biocatalisadores dependentes de cofatores, a utilização de células inteiras de leveduras é de grande interesse como é o caso da utilização pela indústria de panificação de *Saccharomyces cerevisiae*, mais conhecida como fermento de pão biológico. Além do fermento de pão, o uso de células vegetais têm aumentado significativamente na síntese orgânica e esses biocatalisadores são facilmente encontrados em supermercados e manipulados em laboratórios química orgânica (RODRIGUES et al., 2001; NAKAMURA et al., 2009).

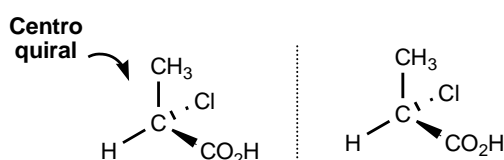
Neste contexto, o presente projeto tem por objetivo estudar a biorredução de diferentes cetonas e a resolução enzimática do zerumbol, para a obtenção de álcoois enantiomericamente puros.

## 1.2 Compostos Quirais

A maioria das substâncias existentes nos organismos vivos são quirais, incluindo o DNA, enzimas, anticorpos e hormônios. Em compostos orgânicos o centro quiral é um carbono com hibridização  $sp^3$  que está ligado a quatro átomos ou grupo diferentes (**Figura 1**) (QMCWEB, 2010). Uma molécula é denominada quiral quando sua imagem especular não puder ser sobreposto à molécula original.

Um dos exemplos mais comuns de moléculas quirais são chamadas de enantiômeros. São duas substâncias com a mesma estrutura contendo centro ou centros quirais, uma a imagem especular da outra, que não se sobrepõem, são isômeros entre si, cada um com atividades biológicas distintas. São chamados de diastereoisômeros aqueles que são a imagem especular um do outro, porém são sobreponíveis (ROMERO, 1998).

Um grande número de fármacos apresentam quiralidade e têm em sua estrutura um ou mais átomos com orientação tridimensional muito bem definida. É de extrema importância que estes fármacos estejam na forma enantiomericamente pura, ou seja, apenas na orientação correspondente a atividade do fármaco, para que efeitos indesejados, ocasionados pelo enantiômero que não tem efeito terapêutico, ocorram (COELHO, 2001).



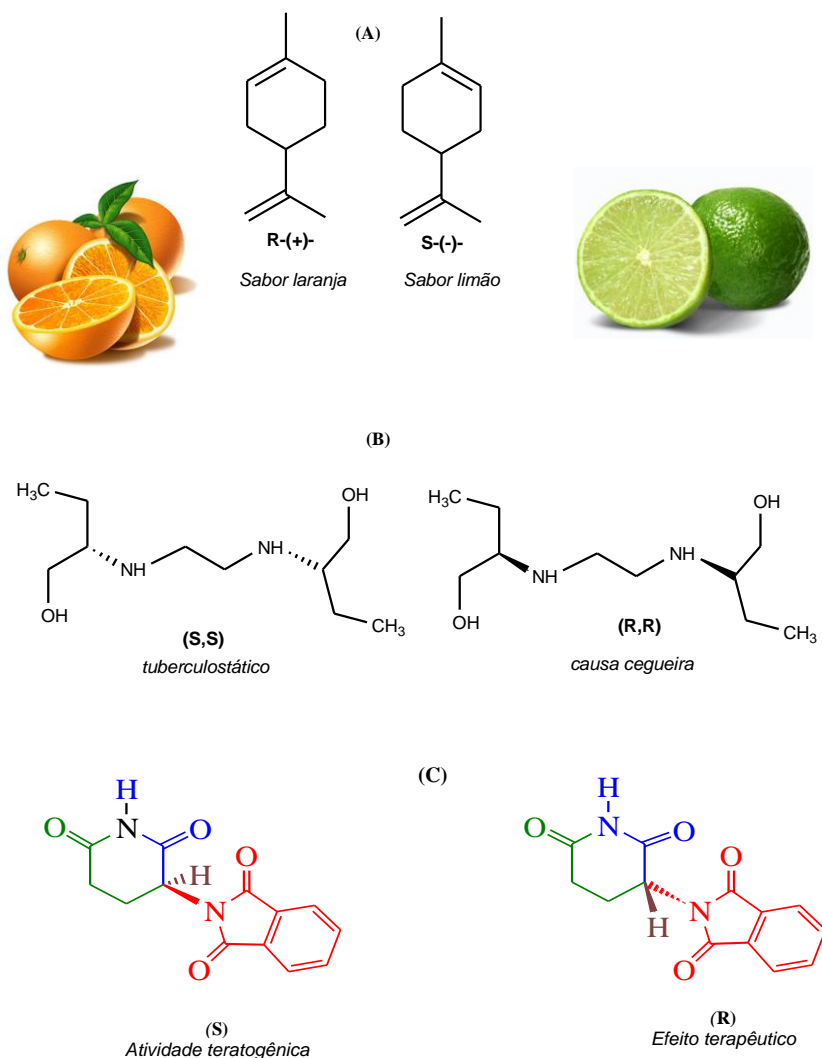
**Figura 1-** Representação de um centro quiral (COELHO, 2001).

### 1.2.1 Enantiômeros

Os enantiômeros são isômeros ópticos que possuem um ou mais centros quirais. Essas substâncias têm as mesmas propriedades químicas e físicas (exceto

o desvio da luz polarizada), são difíceis de serem separadas e com grande facilidade são formadas simultaneamente obtendo-se assim o racêmico, ou seja, 50% de um dos enantiômeros, por exemplo, o *R* e 50% do outro enantiômero *S* (ROMERO, 1998).

Cada enantiômero têm características diferentes, podem apresentar propriedades biológicas diferentes. O limoneno é um exemplo clássico, enquanto que o isômero *R* (-) apresenta o odor de laranja, o isômero *S* (+) apresenta o odor de limão. Outro exemplo da importância de se ter substâncias enantiomericamente puras é o medicamento etambutol que tem efeito biológico recomendado para a tuberculose, onde um dos pares de enantiômeros tem efeito tuberculostático, porém o outro tem efeito adverso grave e pode causar cegueira, **Figura 2** (QMCWEB, 2001).



**Figura 2-** Exemplo de pares de enantiômeros com atividades biológicas diferentes. (A) Limoneno, (B) Etambutol, (C) Talidomida (QMCWEB, 2010; ALBUQUERQUE 2007)

Outro exemplo clássico de medicamento é a talidomida, um sedativo leve que pode ser utilizado no tratamento de náuseas, muito comum no período inicial da gravidez. Na década de 60, foi lançado e considerado seguro para as gestantes, sendo administrado como uma mistura racêmica, no entanto mal se sabia que um dos enantiômeros causava deformação congênita, afetando principalmente a má formação de braços e pernas do bebê. Este acontecimento despertou a atenção da comunidade científica farmacêutica sobre a importância de se ter no mercado fármacos enantiomericamente puros (COELHO, 2001).

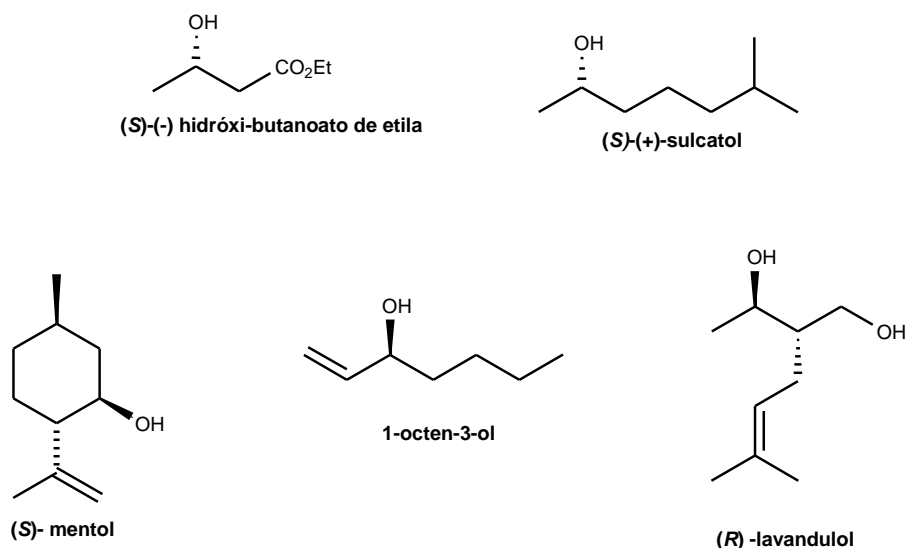
No mercado mundial existem vários fármacos que já são vendidos na forma opticamente pura, ou seja, sem a mistura do outro enantiômero. A venda de fármacos na forma racêmica ainda ocorre. Entretanto estudos são necessários para identificar qual dos enantiômeros é responsável pelo efeito terapêutico do medicamento e se o outro enantiômero tem algum efeito adverso ou em diferentes proporções da mistura dos enantiômeros (RODRIGUES; MORAN, 2001).

### **1.2.2 Álcoois quirais**

Álcoois opticamente ativos são conhecidos como um importante bloco de construção quiral na síntese de compostos biologicamente ativos para diferentes setores industriais tais como indústria farmacêutica, agroquímica e de fragrâncias. No entanto, quando preparados por métodos biotecnológicos, podem ser aplicados na indústria de alimentos e aromas naturais (ZAGOZDA; PLENKIEWICZ, 2006).

São exemplos de álcoois quirais utilizados pela indústria: o (S)-mentol, um terpeno quiral tendo grande aplicação como aromatizante pelo efeito refrescante; o (R)-lavandulol importante aditivo na indústria de perfume, o (S)-(+)-sulcatol importante insumo para a síntese de produtos naturais; o 3-hidroxibutanoato de etila, um dos álcoois quirais mais utilizados como precursor em síntese orgânica e o 1-octen-3-ol, o ferômonio importante na atração dos mosquitos, tendo chamado a

atenção de muitos pesquisadores do Brasil. (FRÁTER, 1979; TAKEN, 1999; SILVA et. al., 2000).



**Figura 3-** Exemplos de álcoois quirais utilizados na indústria (TEMBA et al., 2003)

O uso de sistemas com células inteiras de microrganismos e vegetais tem conduzido a preparação de álcoois quirais com alta seletividade e rendimento e na maioria dos casos a formação de compostos com configuração S é observada (CORDEL, et al., 2007).

Portanto, é vantajoso, a utilização de microrganismos e vegetais como biocatalisadores alternativos em transformações para a introdução de compostos pró-quirais e quirais (YADAVA et al., 2002).

### 1.3 Enzimas

A maior parte da história da bioquímica refere-se a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no final de 1700, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago. Em 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool por leveduras é catalisada por “fermentos”. Ele postulou que esses fermentos eram inseparáveis da estrutura das células vivas de levedura, uma hipótese chamada vitalismo, que prevaleceu por muitos anos (LEHNINGER et al, 2002).



Em 1897, Eduard Buchner descobriu que os extratos de levedura, podiam fermentar o açúcar até álcool, provando que a fermentação era promovida por moléculas que continuavam funcionando mesmo quando removidas das células. Frederick W, Kühne denominou tais moléculas de enzimas. À medida que as noções do vitalismo da vida foram refutadas, o isolamento de novas enzimas e investigações das suas propriedades propiciaram o progresso da bioquímica (LEHNINGER et al, 2002).

As enzimas são conhecidas industrialmente como biocatalisadoras, estão presentes em todas as células vivas, onde exercem as funções vitais de controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e em material celular, participam da quebra de nutrientes complexos em substâncias mais simples (BOM e JÚNIOR, 1999).

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas que atuam como catalisadores quirais controlando as velocidades na maioria das reações biológicas (BRENELLI, 1994; LEHNINGER et al., 2002).

As enzimas são catalisadores muito eficientes e podem catalisar entre 100 e 1000 reações por segundo (GOULD, 1975). A velocidade que a enzima transforma cada enantiômero (substrato) é chamada de conversão (**c**), e é expresso em forma de porcentagem, entretanto a porcentagem da pureza dos enantiômeros convertidos é descrito como excesso enantiomérico (**ee**) (AITKEN e KILÉNYI, 1992).

As enzimas são quase todas formadas por *L*-aminoácidos, portanto, catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade ou pró-quiralidade presente no substrato é reconhecida durante a formação do complexo enzima-substrato (enantiosseletividade). Elas conseguem distinguir entre grupos funcionais iguais em diferentes regiões da mesma molécula-substrato (regio e diastereosseletividade), podem também selecionar entre grupos de reatividade similar, mas de natureza química diferente (quimiosseletividade) (KREUTZ, 1999).

As enzimas constituem então um caminho metabólico no qual as moléculas vão sendo transformadas, com alta seletividade, até  $10^{16}$  vezes mais rápidas em condições brandas de pH e temperatura. A alta seletividade enzimática

(especificidade) baseia-se na complementaridade estrutural, ou seja, o reconhecimento mútuo entre a enzima e o substrato (GARRETT et al., 1995).

### **1.3.1 Modelos de Catálise enzimática**

Existem várias teorias que tentam explicar o mecanismo de ação da enzima. Um dos exemplos mais clássicos é o modelo proposto por Fisher em 1959, neste mecanismo conhecido como “chave-fechadura”, a enzima e o substrato interagem como uma chave (substrato) e fechadura (enzima). Este mecanismo foi aceito por muitas décadas, hoje este conceito não é mais utilizado, pois, a enzima assume uma estrutura tridimensional completamente rígida.

Outras teorias descrevem melhor a interação entre enzima com o substrato. É o caso da “regra de três pontos” proposto por Ogston em 1948, neste modelo sugere que a enzima para ser altamente enantioesletiva o substrato deve ser mantido em três pontos de ligação distintos com o sítio catalítico, portanto a conformação e a composição química do sítio ativo determinam a especificidade e a eficiência da catálise. O complexo de enzima substrato resulta das ligações formadas entre o substrato e as cadeias laterais de vários aminoácidos dentro do sítio ativo. Estas ligações são principalmente não covalentes como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e dispersões de London. As ligações não covalentes são em geral interações de natureza fraca, o que é uma característica para que o substrato e o produto sejam liberados do sítio ativo (SILVERMAN, 2000).

### **1.3.2 Classificação enzimática**

De acordo com a classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) as enzimas se dividem em seis grupos principais.

**Tabela 1.** Classificação internacional das enzimas (LEHNINGER et al., 2002).

<b>Nº</b>	<b>Classe</b>	<b>Tipo de reação catalisa</b>
1	Oxiredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H)
2	Tranferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (Transferências de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações por meio de remoção de grupos
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6	Ligases	Formação de ligações do tipo C-C, C-S, C-O e C-N por meio de reações de condensação acopladas à quebra do ATP

Atualmente, muitas enzimas são disponibilizadas comercialmente e vem sendo utilizadas há mais de 100 anos na transformação de compostos orgânicos não naturais. As enzimas para uso industrial são utilizadas na produção de detergentes, ração animal, pão, vinho, suco de laranja e no tratamento da matéria têxtil e couro. Os biocatalisadores quirais assumem grande importância na produção de fármacos, justificando assim que 10% da produção mundial de fármacos é obtida através de processos enzimáticos (FABER, 2004; NOVOZYMES, 2010).

Frente aos catalisadores sintéticos que contêm metais, os catalisadores enzimáticos são vantajosos, pois são completamente seletivos e biodegradáveis (FABER, 2004).

As enzimas são sintetizadas pelas células dos organismos vivos e podem ser obtidas tanto na forma de extrato bruto (células inteiras) ou quanto purificados

(enzimas puras). As vantagens em utilizar, enzimas isoladas ou parcialmente purificadas, estão na maior produtividade, alta especificidade e a facilidade no isolamento dos produtos. Entretanto, fatores tais como o custo, a aquisição de enzimas isoladas, possam inviabilizar sua aplicação. Enquanto os processos que utilizam células inteiras oferecem menores custos e são interessantes para aplicação em sistemas dependentes de cofatores, tornando os processos vantajosos (ROBERTS, 1999; KOELLER, 2001; KRISHNA, 2002; QUEZADA et al., 2009).

Atualmente, cerca de 3200 enzimas são identificadas pela União Internacional de Bioquímica (FABER, 2004). As reações mais promovidas em biocatálise são de hidrólise, pela facilidade do manuseio e estabilidade das enzimas hidrolases, no caso as lipases são as mais utilizadas, seguida da classe das enzimas oxirredutases (GOTOR-FERNADEZ, 2006; MATSUDA, 2009).

### **1.3.3 Lipases**

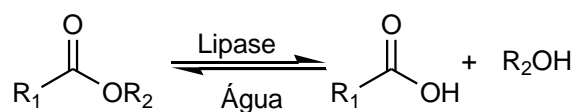
Lipases são enzimas inseridas na classe das serinas hidrolases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol. A maioria das lipases são extracelulares e não necessitam de cofatores para atuar. Estão presentes em diversos organismos tais como animais, plantas, fungos e bactérias (KLIBANOV, 2001).

As lipases, em particular, têm sido as enzimas com maior potencial de emprego, tanto em pesquisas científicas quanto em processos tecnológicos, devido a algumas características relacionadas com estabilidade, seletividade e especificidade por substrato (COLLEN, 2006).

As lipases catalisam a transferência de grupos acilas de compostos doadores para uma ampla variedade de compostos aceptores (álcoois, aminas, ácidos carboxílicos). Dependendo do tipo do doador acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem a esterificação, tioesterificação, amidação, transesterificação (**Figura 4**), síntese de peptídeos e formação de peróxidos (FABER, 1997; ATHALE, 2002; MOTALBETTI, 2005).

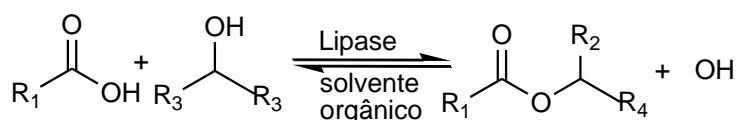
## Meio aquoso

### 1. Hidrólise



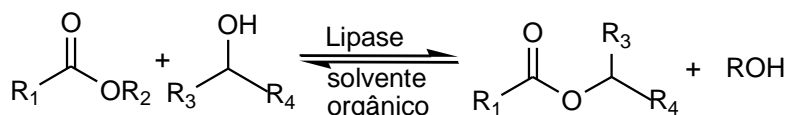
## Meio orgânico

### 2. Esterificação

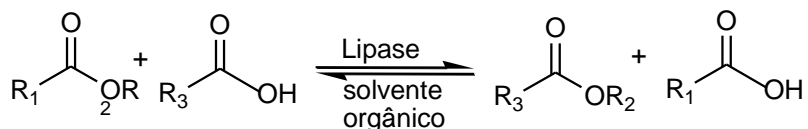


### 3. Transesterificação

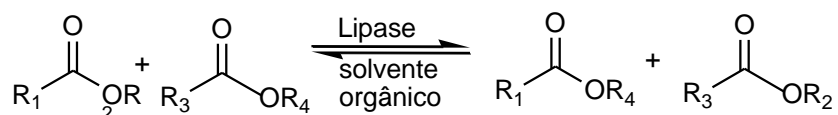
#### a) alcólise



#### b) acidólise

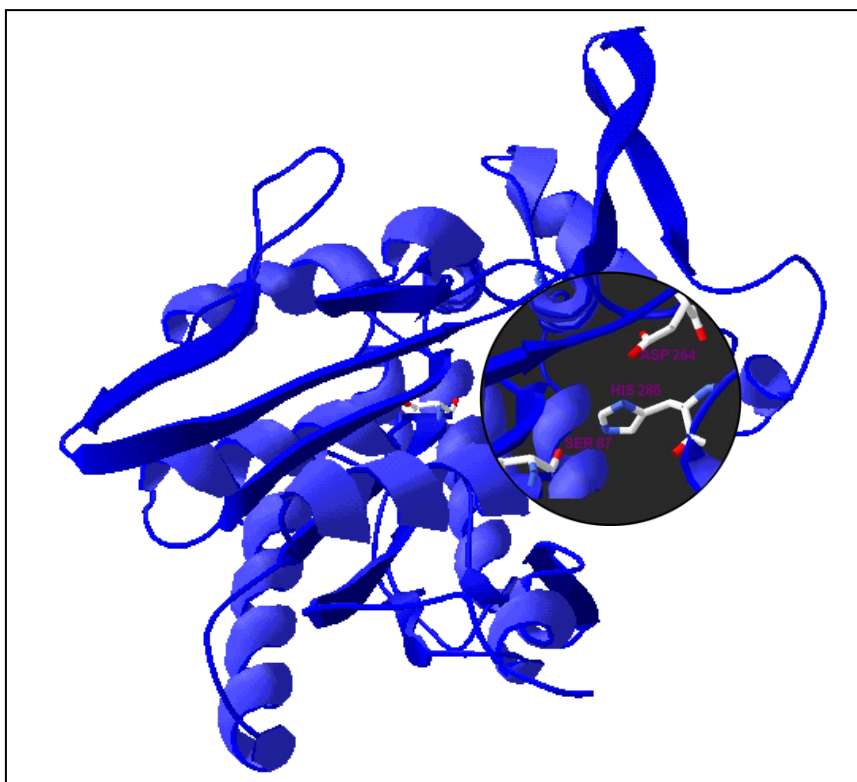


### 4. Interesterificação



**Figura 4-** Reações catalisadas por lipases em aplicação na biocatálise (GHANEM, 2007).

Muitas lipases comerciais são isoladas de diferentes microrganismos, tais como: *Candida rugosa* (cylindracea), *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei* e *Pseudomonas cepacia* (**Figura 5**) e têm sido amplamente utilizadas na pesquisa científica (SHIMADA et al., 1994; WANASUNDARA e SHANRIDI, 1998; GUNSTONE, 1999; OKADA e MORISSEI, 2007).



**Figura 5-** Representação esquemática da estrutura cristalina da Lipase de *Burkholderia cepacia* (3.1.1.3) com ampliação do sítio catalítico (RCSB - PROTEIN DATA BANK, 2010).

As lipases utilizadas na fabricação de detergentes são de origem bacteriana, porém a maioria das lipases comerciais são predominantemente de origem fúngica. As lipases fúngicas tem sido empregadas no desenvolvimento de aromas do leite e da manteiga e em diversos produtos alimentícios. Apesar de um grande número de lipases fúngicas estarem descritas na literatura, somente as enzimas de poucas espécies, têm demonstrado possuir a estabilidade adequada para serem empregadas em reações de síntese nos laboratórios de química orgânica e, assim, serem consideradas como de relevância á aplicação industrial (MARGOLIN, 1993).

Uma lipase amplamente utilizada na biocatálise e em síntese orgânica é a lipase B isolada da levedura *Candida antarctica*. É conhecida comercialmente como Novozyme 435, sendo uma enzima moderadamente termoestável que retém a sua atividade catalítica durante muitas horas, quando incubada entre 30°C e 40°C (HOMANN et al., 2001).



**Figura 6-** Representação esquemática da estrutura cristalina da lipase B de *Candida antarctica* (RCSB - PROTEIN DATA BANK, 2010).

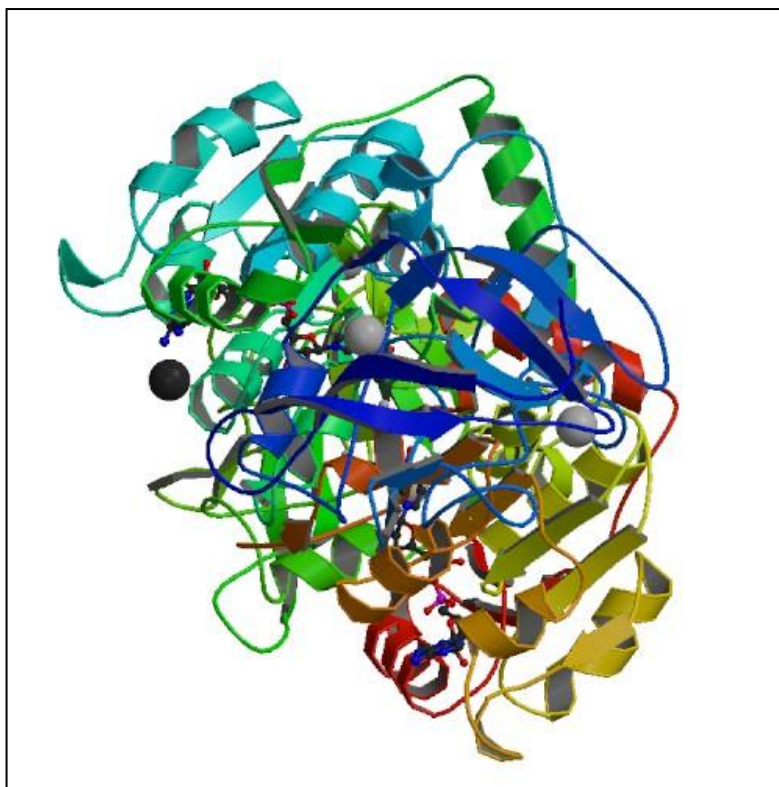
#### **1.3.4 Oxiredutases (Desidrogenases)**

Segundo Faber (2007), é possível obter a produção biocatalítica de álcoois quirais por meio de vários caminhos, uma via é através de enzimas das classes das oxiredutases. As oxiredutases catalizam reações de oxiredução com transferência de elétrons para o substrato (DEHYDROGENASE.ORG., 2009).

As oxiredutases são enzimas que catalisam reações de óxido-redução e são de três tipos: as oxidases, oxigenases e desidrogenases. Entre elas, as desidrogenases são extensamente usadas para a redução de aldeídos ou cetonas (FABER, 2007; GOLDBERG et al., 2007). Geralmente, as enzimas que transferem elétron de uma molécula para outra são chamadas de oxiredutases.

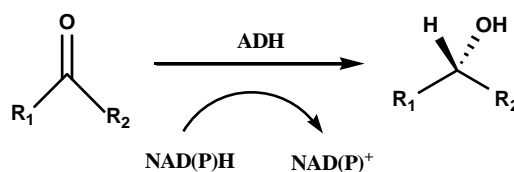
As desidrogenases têm sido aplicadas principalmente na redução de compostos carbonílicos. A álcool desidrogenase (ADH) é uma enzima da classe das

desidrogenases muito eficiente e utilizada em síntese de álcoois opticamente ativos (**Figura 7**).



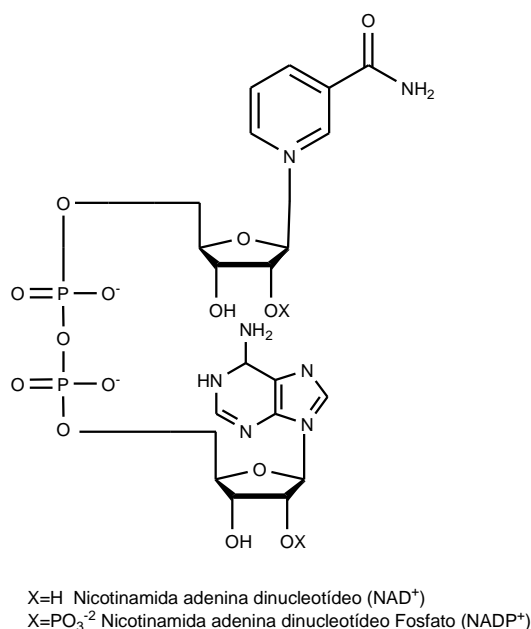
**Figura 7-** Representação esquemática da estrutura cristalina da Álcool desidrogenase com o seu cofator NADH (RCSB - PROTEIN DATA BANK, 2010).

O processo de atuação das ADHs requerem a presença de cofatores e coenzimas que são responsáveis pela transferência de hidrogênio, no caso das biorreduções (**Figura 8**). As ADHs utilizam como cofatores as piridimicas (Nicotidamina adenina difosfato - NAD(P)H) que podem ser reciclados através de métodos químicos e enzimáticos (WENDHAUSEN, 1998).



**Figura 8-** Redução de cetonas catalisada por Álcool desidrogenases e com o cofator Nicotidamina Adenina Difosfato (PEREIRA, 1995).





**Figura 9** – Cofator Nicotidamina Adenina Difosfato (NAD(P)H) (WENDHAUSEN, 1998)

Um exemplo de fonte de desidrogenases é o fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*), estão presentes no interior do fermento e reduzem duplas ligações produzindo centros quirais, são duas enzimas que atuam nas reações de redução: álcool desidrogenase e a lactato desidrogenase. Estas enzimas estão localizadas no interior do microrganismo, portanto, o composto químico a ser transformado penetra nas células vivas e depois sai (PEREIRA, 1995).

#### 1.4 Biocatálise

Biocatálise ou biotransformação, em sentido amplo, é o uso de enzimas ou células inteiras como catalisadores em processos produtivos, envolve todos os processos onde a ação de enzimas são responsáveis por transformações químicas. A biocatálise e as biotransformações têm uma longa história. A aplicação de enzimas em transformações químicas vai desde o antigo Egito a Mesopotâmia, arquivos literários registram a fermentação alcoólica da uva na produção de vinho e no preparo do pão (JOHANNES et al., 2006; GAHNEM, 2007).

A biocatálise é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (DEMIRJIAN et al., 2000). A importância do uso de enzimas em biocatálise tem se mostrado cada vez mais evidente, devido a grande versatilidade de reações a serem catalisadas, condições brandas de reação, natureza regio, quimio e enantiosseletiva são algumas de suas vantagens (BONNEAU et al., 1996; SAXENA et al., 1999).

A indústria química vem utilizando os biocatalisadores há muito tempo graças à capacidade de reconhecimento quiral das enzimas (FABER e PATEL, 2000; ISHIGE; SHIMIZU, 2005). Uma alternativa para a obtenção de compostos opticamente ativos é através de transformações enzimáticas (LEONARD et al., 2004). Do surgimento de novas tecnologias que estão se tornando cada vez mais disponíveis, certamente levará às indústrias a utilizarem a biocatálise como uma alternativa técnica e economicamente viável para a síntese assimétrica (DE CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001).

Considerando que 10 % da produção mundial de fármacos é obtida por processos enzimáticos, a biocatálise é uma alternativa para a obtenção de compostos anantiomericamente puros. Para viabilizar o custo de processos enzimáticos, é necessária a utilização de biocatalisadores alternativos, em destaque, células inteiras de microrganismos.

### **1.5 Utilização de microrganismos em Reações de Redução**

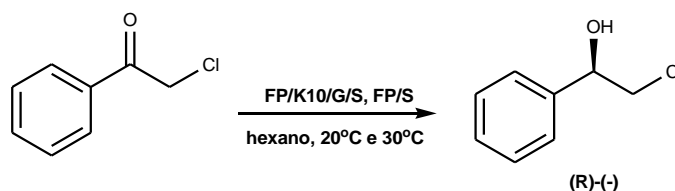
O uso de microrganismos como biocatalisadores vêm sendo utilizados por mais de 100 anos, a obtenção do *L*-tartarato de amônio de *DL*-tartarato de amônio utilizando o fungo *Penicillium glaucum*, teve o primeiro uso relatado em biotransformações (HANSON, 1992).

Os microrganismos são de particular interesse na busca de novos biocatalisadores conseqüentemente na descoberta de novas enzimas, devido ao grande potencial de produção de metabólitos secundários, com grandes aplicações nas mais diferentes áreas (desde químicas, biológica, farmacêutica etc.) (DERMIJIAN, 1999).

Na biocatálise, os microrganismos são empregados como catalisadores em reações de transesterificação, esterificação e reduções etc. Um dos microrganismos

mais utilizados em reações de redução é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O fermento de pão biológico nessas reações envolve um baixo custo ao contrário do alto custo de catalisadores químicos.

Zanotto e colaboradores utilizaram o fermento de pão (FP) para a redução da acetofenona, obtendo maiores excessos enantioméricos quando o FP foi imobilizado (ZANOTTO, 2003).



**Figura 10-** Representação esquemática da reação de redução da acetofenona utilizando o fermento de pão biológico (FP), imobilizado com Montmorilonita-k10 (K10), acrescido de glicose (G) e ou Sacarose (S), em meio orgânico (%c: <10 e %ee: >99) (ZANOTTO, 2003).

Além de células inteiras de microrganismos, as células vegetais estão sendo muito utilizadas em reações de redução. Baldassarre (2000) iniciaram os estudos com células inteiras de vegetais em reduções assimétricas, por exemplo, a cenoura *Daucus carota*, e obtiveram álcoois quirais com bons excessos enantioméricos (97% e 98%). Em seguida, Yadav e colaboradores, utilizaram a cenoura para reduzir uma série de cetonas alifáticas, aromáticas, cetonas cíclicas e β-cetoésteres e dentre elas obtivera boas conversões (80% e 82%) utilizando a *p*-nitroacetofenona e *p*-fluoracetofenona sendo que os índices de pureza enantiomérica (%ee) eram de 90% e 96% respectivamente com configuração S (YADAV et al., 2002).

Além da cenoura outras células vegetais são empregadas em reações de reduções tais como a mandioca, batata, gengibre etc. Rodríguez e colaboradores (2007) investigaram se as enzimas que atuaram na redução eram os vegetais ou os microrganismos endofíticos. O estudo comprovou que as enzimas de bactérias e leveduras endofíticas isoladas da cenoura comprovaram atividade catalítica em reações de redução principalmente da enzima isolada de levedura *Pichia sp.*, obtiveram excelentes porcentagens de conversão >99 % quando comparadas com o fermento de pão biológico e a própria cenoura que obtiveram respectivamente 96%

e 85% de conversão do acetoacetato de etila alfa-propargil a  $\alpha$ -substituintes- $\beta$ -cetoésteres.

Recentemente, Borges e colaboradores (2007) estudaram a estereoseletividade da oxidação de tioridazina e a hidroxilação de flavonas utilizando fungos endofíticos como biocatalisadores em reações de oxidação. Pedrine e colaboradores (2009) isolaram de várias plantas fungos endofíticos para a redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos obtendo álcoois secundários quirais com altos excessos enantioméricos.

### 1.5.1 Fungos endofíticos

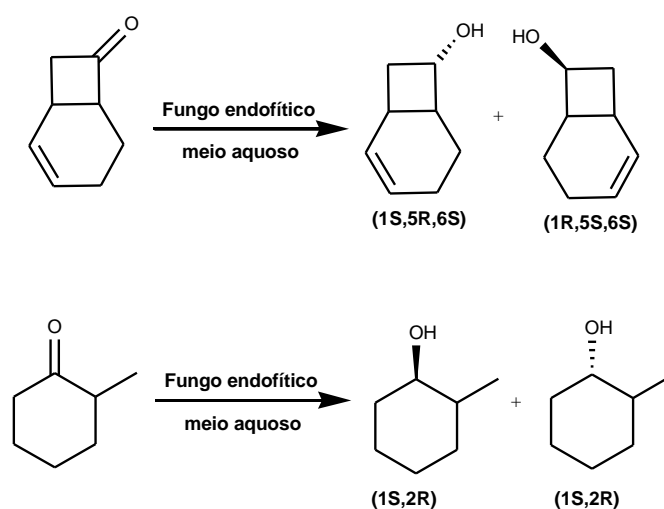
A definição de microrganismos endofíticos e patogênicos são distintas. Muitas áreas usam o termo endofítico conforme a interação é positiva (não há desenvolvimento de sintomas de doenças para o hospedeiro), ou patogênica quando negativa (com prejuízo para o hospedeiro).

O termo endofítico designa o habitat de onde o microrganismo foi obtido, esses microrganismos residentes no interior (endo) da planta (fito). Geralmente, o termo endofítico se deve a metodologia utilizada para transferir o material retirado da superfície vegetal aos meios de cultura artificiais.

Um endófito pode evoluir para uma condição de fitopatógeno em situações em que a planta hospedeira não dispõe de nutrientes para o desenvolvimento controlado do microrganismo (PETERS, et al., 1998; REDMAN et al., 1999).

Os fungos endofíticos não são muito explorados em biotransformações microbianas, em outras áreas científicas eles despertam interesse no isolamento de seus metabólitos secundários produzidos pelo fungo associado com a planta.

Pedrine e colaboradores (2009), utilizaram fungos endofíticos isolados de folhas, galhos e cascas de plantas da floresta Amazônica do (Quito-Ecuador), para reduzir cetonas comerciais como: acetofenona, e cetonas cíclicas obtiveram álcoois quirais com altos excessos enantioméricos. Na **Figura 10**, é observado na reação de redução pelos fungos *Phomopsis sp.* e *Epicoccum sp.* das cetonas cíclicas racêmicas: 2-metilciclohexanona e 6-metil-5-heptan-2-ona, obtendo 96% e >99% de excessos enantioméricos.



**Figura 11-** Redução de cetonas por fungos endofíticos (PEDRINI et al., 2009).

### 1.5.2 *Saccharomyces cerevisiae* (levedura)

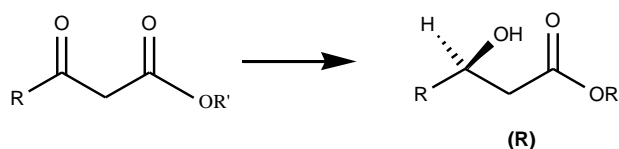
A fermentação refere-se ao processo vital dos microrganismos anaeróbicos na presença de uma fonte de carbono, energia e nutrientes. Diferente da biotransformação, a fermentação ocorre através de reações em vários passos que não são possíveis de acontecer fora da célula. A primeira observação da ação fermentativa de *S. cerevisiae* data de 1874 e a primeira biorredução, transformação do furfuraldeído para álcool furfurílico, foi reportado em 1898 (CZUK et al., 1991).

A *S. cerevisiae*, que utiliza glicose ou sacarose como fonte de energia, é o biocatalisador mais popular utilizado pelos químicos orgânicos. A facilidade de manuseio, a faz alvo de escolha quando se quer conduzir reações de oxidação-redução. É utilizado preferencialmente na forma de célula inteira, ao invés de enzimas isoladas, evitando, dessa forma, o problema da dificuldade de reciclar o cofator necessário quando se usa a enzima pura (CZUK et al., 1991).

O fermento de pão é um microrganismo bastante resistente capaz de se desenvolver numa faixa de pH ampla de 2,4 a 8,6 (JONES et al., 1981), sendo que a temperatura ótima para o crescimento foi constatado 30<sup>0</sup>C e o pH ótimo foi 5,0 (ALBUQUERQUE, 2007) e a temperatura ideal para a desativação das células seria de 20<sup>0</sup>C (ZANOTTO, 2003).

Para os químicos orgânicos, modificar a estrutura do substrato é uma tarefa bem mais simples que procurar entre os vários microrganismos existentes um que seja apropriado para obter um composto com determinada configuração (NAKAMURA et al., 1984). No entanto, o fermento biológico consegue catalisar vários tipos de reações: redução, condensação e oxidação (BARE et al, 1991).

Na área de pesquisa em síntese orgânica, a redução de compostos carbonílicos para formar centros opticamente ativos é sem dúvida a sua maior participação em reduções enantiosseletivas. A enantiosseletividade na redução de grupos carbonílicos, por fermentos de pão é fortemente influenciada pela concentração do substrato e do produto formado (CHEN et al., 1984). Geralmente nas reduções utilizando fermento de pão a pureza dos enantiômeros, ou seja, os excessos enantioméricos (ee) são altos somente quando as concentrações não ultrapassam 1g/L (1g de substrato por litro de biomassa). Na **Figura 12** observa-se a redução de um  $\beta$ -cetoéster por *Saccharomyces cerevisiae* (PATROCÍNIO, 1991).



**Figura 12** – Redução do acetoacetato de etila por *Saccharomyces cerevisiae* (PATROCÍNIO, 1991).

Considerando a importância da quiralidade na eficiência de fármacos, a redução de compostos carbonílicos (cetonas, dicetonas e ésteres), catalisada por microrganismos ou enzimas isoladas, surge como uma rota simplificada na preparação de álcoois quirais opticamente puros, que são importantes blocos de construção para indústria farmacêutica (SHIMIZU et al., 1998; KATZ et al., 2003; JOHANSON et al., 2005).

## 1.6 Reduções Enantiosseletivas de compostos carbonílicos por microrganismos

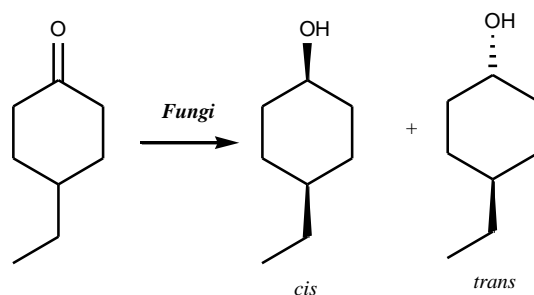
A utilização de microrganismos para a redução assimétrica de cetonas pró-quirais produzindo os álcoois correspondentes é uma técnica bem estabelecida na área de biocatálise (WENDHAUSEN, 1998). Apesar de não serem muito conhecidos como usuais precursores quirais, os álcoois quirais são também precursores importantes, servindo como blocos de construção de diversos compostos de importância biológica (TEMBA et al., 2003).

A redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos mediada por *Saccharomyces cerevisiae* tornou-se uma valiosa ferramenta para a preparação de álcoois quirais. A levedura, conhecida como fermento de pão biológico, tem sido o microorganismo mais empregado pelos químicos sintéticos, principalmente na redução assimétrica de carbonilas (FABER, 2007).

Uma das reações mais úteis em síntese assimétrica é a redução de uma cetona proquiral a um álcool ópticamente ativo (BROW et al., 1987). Os álcoois formados neste processo podem ser utilizados no início de uma síntese como intermediários na construção de moléculas quirais maiores ou podem servir como o produto final desejado diretamente (MIDLAND, 1989). As reduções assimétricas podem ser feitas empregando-se agentes redutores químicos quirais (COREY et al. a, 1987; COREY et al. b, 1987; COREY et al., 1990; COREY, 1989) ou então através de enzimas ou microrganismos inteiros (JONES, 1991).

Apesar da preparação de álcoois quirais ser efetuada por vias sintéticas complexas (ELIEL et al, 1994; KAGAN, et al, 1982; KRAMER; PFANDER et al., 1982; NOYORI, 1992), a sua obtenção pode ser feita a partir da redução de compostos carbonílicos.

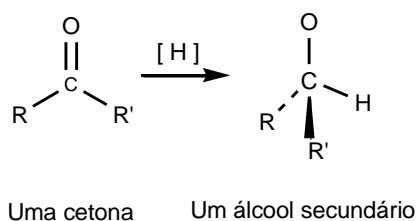
Um grande número de artigos e revisões tem sido publicado na redução de carbonilas  $\alpha,\beta$ -insaturadas por microrganismos. Rivilla e colaboradores (2009) reduziram a 4-etilciclohexanona utilizando células inteiras do fungo filamentoso *Botrytis cinerea* resultando o álcool (S)-1-feniletanol com um alto excesso enantiomérico de 85% e conversão de 53,3% (**Figura 13**).



**Figura 13-** Redução enantiosseletiva da 4-etilciclohexanona pelo fungo *Botrytis cinérea* (RIVILLA et al., 2009)

### 1.7 Redução assimétrica (via química)

Um dos métodos mais gerais de preparação de álcoois é a partir da redução de compostos carbonílicos. Todos os tipos de compostos carbonílicos podem ser reduzidos a álcoois, mas precisamente as cetonas são convertidas em álcoois secundários, como é observado na **Figura 14** (Solomons, 2005).



**Figura 14** – Redução de uma cetona à álcool secundário (Solomons, 2005)

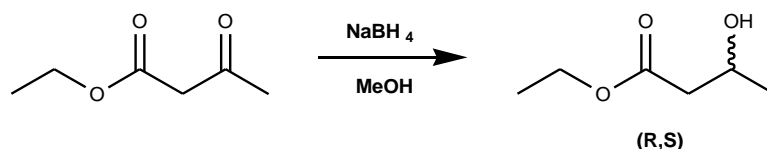
Os álcoois primários e secundários podem ser sintetizados pela redução de uma variedade de compostos que contêm o grupo carbonila. Os aldeídos e cetonas também podem ser reduzidos a álcoois via hidrogenação catalítica, entretanto o agente redutor mais utilizado é o boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ).

A etapa-chave na redução de uma carbonila pelo borohidreto de sódio é a transferência de um íon hidreto do metal para o carbono da carbonila, doando um  $\text{H}^-$  devido ao caráter polar, que possui uma deficiência eletrônica. Assim, o  $\text{NaBH}_4$  é a espécie nucleofílica, ou seja um potente doador de par de elétrons, com protonação simultânea do oxigênio do grupo carbonila por parte do solvente. O metanol ou



etanol, álcool a ser utilizado, ao perder um hidrogênio do grupo ( $\text{OH}^-$ ) dá origem a um etóxido que se combina com os restantes fragmentos do boro, formando o etóxihidretoborato de sódio (SOLOMONS, 2005).

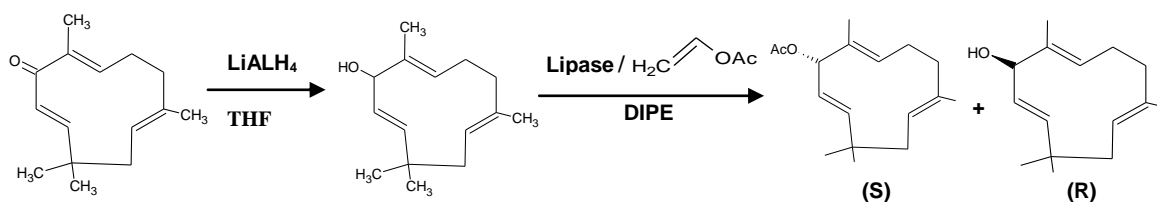
O boroidreto de sódio é considerado um agente redutor aquiral, no caso da redução de uma carbonila pró-quiral por boroidreto de sódio, obtém-se um álcool racêmico.



**Figura 15-** Redução com NaBH<sub>4</sub> do acetoacetato de etila em 3- hidroxibutanoato de etila (ALBUQUERQUE, 2007)

A utilização de hidretos de boro e de alumínio para a redução de compostos carbonílicos é muito comum em síntese orgânica e o desenvolvimento das versões quirais eficientes destes hidretos tem ocupado uma posição central nas últimas décadas (TEMBA, et al., 2003).

Outro agente redutor conhecido é o hidreto de alumínio e lítio, Kitayama e colaboradores (2002) realizaram a redução da zerumbona com hidreto de alumínio e lítio (**Figura 16**), obtendo um zerumbol racêmico. Em seguida, resolveram o álcool racêmico utilizando lipase de *Pseudomonas fluorescens* e como agente acilante o acetato de vinila o acetilado zerumbil e o álcool puro zerumbol.



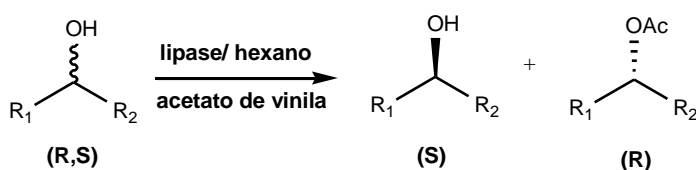
**Figura 16** - Redução da zerumbona via química e via enzimática por LiAlH<sub>4</sub> (KITAYAMA, et al., 2002)

## 1.8 Resolução Enzimática de racêmicos

O substrato racêmico sofre discriminação quiral entre os enantiômeros quando é submetido a uma reação enzimática. Devido a quiralidade da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta no seu sítio ativo, sofre reação em uma velocidade mais alta. Para assegurar a uma alta seletividade para ambos os enantiômeros, a diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais deve ser a maior possível. Em alguns casos ideais a velocidade é tão extrema, que o “melhor” enantiômero é transformado rapidamente e o outro não é convertido. Então, na resolução cinética de um racemato a reação enzimática cessaria automaticamente em 50% de conversão, quando já não existe mais o enantiômero reativo. Como consequência, cada enantiômero pode ser obtido somente com 50% de rendimento em uma resolução enzimática, isto é, apenas um dos enantiômeros reagiu completamente (FABER, 1997).

A resolução enzimática de um álcool racêmico pode ser catalisada por lipases, formando como produto final um álcool enantiomericamente puro e um acetato. As lipases são enzimas hidrolíticas extremamente versáteis que ocupam uma posição de destaque, por não necessitarem de cofatores e atuarem em solventes orgânicos, além de estarem presentes em diversos organismos: animais, bactérias, plantas e fungos (ROMERO, 1998; CARVALHO et al., 2005).

Hercules (2008) realizou a resolução cinética enzimática de sete álcoois secundários utilizando a lipase de *Candida antarctica* B, conhecida comercialmente como Novozyme 435. Os álcoois quirais foram obtidos com excessos enantioméricos maiores que 98% (**Figura 17**). A grande vantagem da utilização da Novozyme 435 é o fato das reações serem efetuadas em hexano anidro (solvente facilmente eliminado ao final do processo e por se tratar de uma enzima suportada em resina, sendo facilmente removida por filtração simples).



**Figura 17** – Resolução de álcoois secundários por lipase em meio orgânico (Hercules, 2008).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Redução de cetonas mediada por microrganismos da amazônicos, a fim de se obter álcoois opticamente ativos para que atuem como blocos de construção quiral na síntese de vários produtos de interesse industrial.

### 2. 2. Objetivos específicos

- ✓ Estudar a redução enantiosseletiva das cetonas: acetoacetato de etila,  $\alpha$ -cloroacetofenona, *p*-nitroacetofenona e zerumbona utilizando fungos endofíticos amazônicos a fim de se obter álcoois opticamente ativos.
- ✓ Preparar, purificar e caracterizar os álcoois racêmicos obtidos na redução de cetonas com boroidreto de sódio através das técnicas de IV, RMN-<sup>1</sup>H e CG.
- ✓ Utilizar a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o fermento de pão comercial e duas diferentes linhagens da levedura para reduzir as cetonas: zerumbona e o acetoacetato de etila a fim de se obter álcoois opticamente ativos.
- ✓ Comparar os resultados obtidos com outros reportados na literatura

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 EQUIPAMENTOS

✓ ***Cromatógrafo em fase gasosa (CG)***

As análises cromatográficas foram feitas no cromatógrafo em fase gasosa marca SHIMADZU, equipado com auto injetor modelo GC-2010 e detector de ionização de chama - FID (Central de Análises do laboratório de Biorgânica - MBT). As porcentagens de conversão e os excessos enantioméricos foram determinados através das áreas dos cromatogramas.



**Figura 18-** Cromatógrafo em fase gasosa (Central de Análises - Laboratório de Biorgânica - MBT)

✓ ***Espectrofotômetro de Infravermelho (IV)***

Os espectros de **IV** foram obtidos em um aparelho da marca Perkin Elmer FT-IR 1600 (Central de Análises – Universidade de Santa Catarina - UFSC).

✓ ***Outros equipamentos utilizados***

Balança analítica modelo FA2104N – BIOPRECISA, Incubadora Shaker modelo MA420 – MARCONI, lâmpada de UV (120x 6W), Câmara de fluxo laminar - QUIMIS, Autoclave Phoenix – Luferco, Evaporador rotativo - FISATOM e bomba a vácuo marca BOC EDWARDS.

### **3.2. MATERIAIS**

✓ ***Coluna quiral para CG***

SUPELCO - Sigma Aldrich / CP-BETA DEX-110: sílica 30m x 0.25  $\mu$ L x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m.

✓ ***Coluna Cromatográfica (CC)***

Utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60635 (60-100 mesh) da marca SIGMA – ALDRICH. Como fase móvel utilizou-se uma mistura de solventes, sendo adequada para cada situação.

✓ ***Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)***

Utilizou-se cromatofolhas de alumínio em sílica gel, da marca MERCK.

✓ ***Membrana filtrante***

Utilizou-se a membrana CHROMAFIL<sup>®</sup> 0-45/25 para filtração de alíquotas a serem injetadas no CG-quiral.

✓ ***Reveladores***

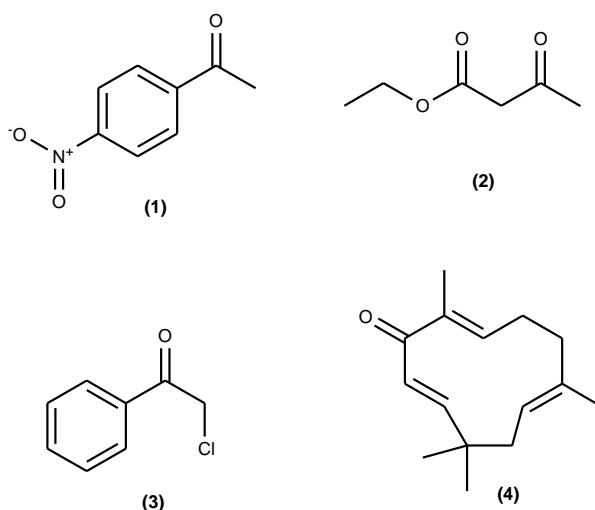
Como reveladores para CCDA foram utilizados iodo granulado (NUCLEAR) e uma lâmpada de U.V (110 nm).

### ✓ **Solventes**

Foram utilizados solventes: hexano P.A (F. maia), hexano grau HPLC, acetato de etila P.A (F. maia), metanol P.A (F. maia), metanol grau HPLC, clorofórmio P.A. e diclorometano P.A (F. maia).

### ✓ **Reagentes**

Foram utilizados os seguintes reagentes:  $\text{NaBH}_4$ -99% (SIGMA-ALDRICH), acetato de vinila (FLUKA) e as seguintes cetonas: (**Figura 19**) *p*-nitroacetofenona (**1**) (Fluka), acetoacetato de etila (**2**) (SIGMA),  $\alpha$ -cloroacetofenona (**3**) (FLUKA) e zerumbona (**4**) (cedida pelo Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, número de depósito nacional de patente PI0505343).



**Figura 19** – Estruturas das cetonas utilizadas nas reações de redução.

### ✓ **Biocatalisadores**

- Fermento biológico comercial (**FP**) da marca FONTI (leveduras secas de *Saccharomyces cerevisiae*).

- Linhagem **CAT-1** (leveduras secas de *S. cerevisiae*), cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Boris U. Stambuk do Departamento de Química da UFSC.
- Linhagem **PE-2** (leveduras secas de *S. cerevisiae*), cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Boris U. Stambuk do Departamento de Química da UFSC.
- Cepas de fungos endofíticos isolados de plantas amazônicas: CF03\_05, CF0304, CF02\_03, CF11\_02, CF01\_06 isoladas das folhas da carapanaúba (*Aspidosperma nitidum*); CG03\_08, CG05\_04, CG07\_01, CG02\_04, CG10\_01, isoladas dos galhos da carapanaúba e UEA\_115 isolada dos galhos do cacauzeiro *Theobroma cacao* (coleção de microrganismos do Laboratório de Biorgânica do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia).
- Tucumã (Feira do São Francisco, Manaus-AM).
- Novozym 435 lipase B de *Candida antarctica* (Sigma).

**Tabela 2.** Código de identificação de fungos endofíticos isolados de plantas amazônicas para a reação de redução de cetonas e resolução de álcool racêmico.

<b>Fungos endofíticos</b>	<b>Planta</b>	<b>Parte</b>
CF02_03	<i>Aspidosperma nitidum</i>	Folha
CF01_06	<i>Aspidosperma nitidum</i>	Folha
CF03_05	<i>Aspidosperma nitidum</i>	Folha
CF11_02	<i>Aspidosperma nitidum</i>	Folha
CF03_04	<i>Aspidosperma nitidum</i>	Folha
CG03_08	<i>Aspidosperma nitidum</i>	Galho
CG05_04	<i>Aspidosperma nitidum</i>	Galho
CG02_04	<i>Aspidosperma nitidum</i>	Galho
CG07_01	<i>Aspidosperma nitidum</i>	Galho
CG10_01	<i>Aspidosperma nitidum</i>	Galho
UEA_115	<i>Theobroma cacao</i>	Galho

### ✓ Meios de cultivo

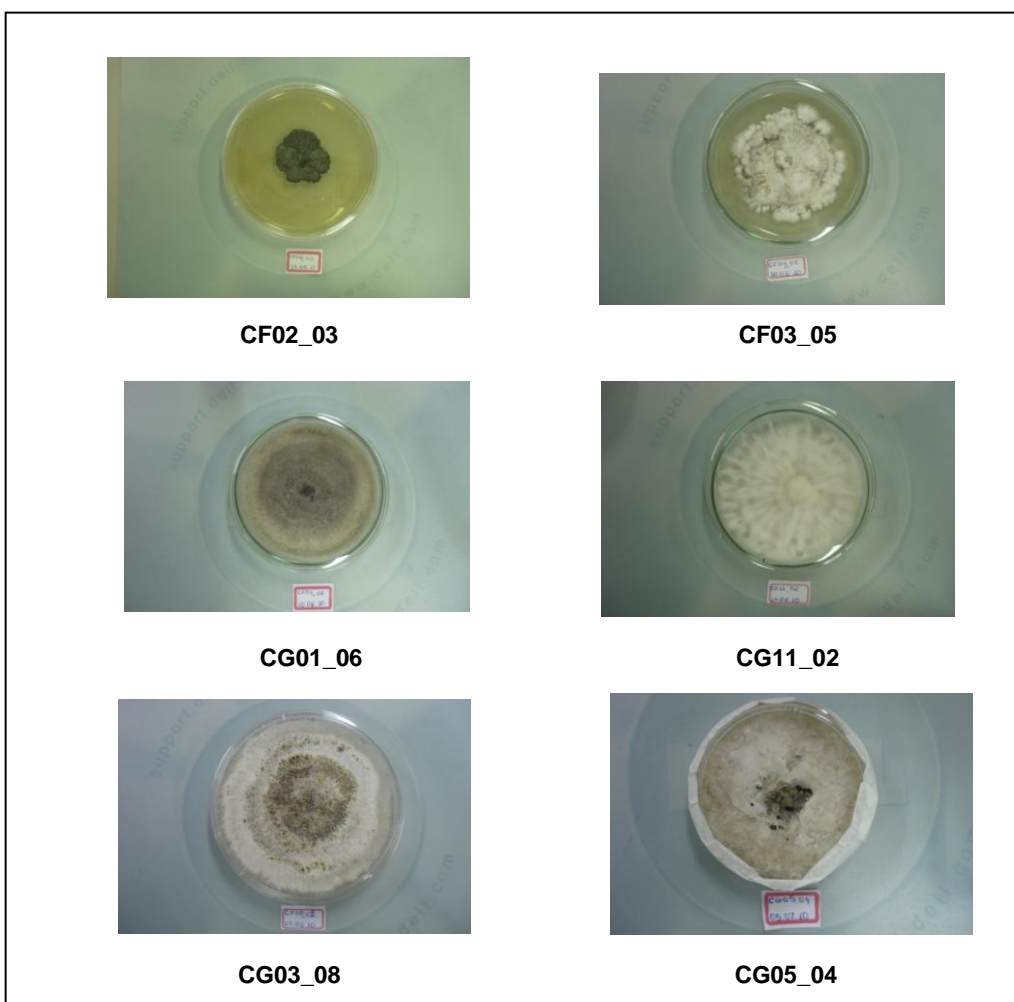
- BDA: 200g Ágar de Batata Dextrose (Himedia) por litro de água destilada.
- BD (batata-dextrose): 20g Glicose (Dinâmica), 20g batata inglesa (Supermercado REZENDE) por litro de água destilada.
- Meio Sintético: 2g de asparagina (VETEC), 2g de glicose (Dinâmica), 1g de  $K_2HPO_4$  (VETEC), 0,5g de  $MgSO_4$  (VETEC), 5 mg de Hidroclorato de tiamina (Sigma), 1,45 mg de  $Fe(NO_3)_3 \cdot 7H_2O$  (VETEC) e 0,235 mg de  $Mn SO_4 \cdot H_2O$  (VETEC) , por litro de água destilada e 3 mL de óleo de girassol (SIGMA)
- Solução de sacarose 10%: 1g de sacarose (Dinâmica) e 10 ml de água destilada.
- Solução de trealose 10%: 1g de trealose (Dinâmica) e 10 ml de água destilada.

## 3.3 FUNGOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

### 3.3.1 Fungos utilizados nas Reações de Redução

As cepas fúngicas utilizadas foram: CF02\_03, CF03\_05, CF11\_02, CF01\_06, CF03\_04 isoladas da folha da carapanaúba (*Aspidosperma nitidum*), CG05\_04, CG03\_08, CG02\_04 e CG07\_01 isoladas dos galhos da carapanaúba que fazem parte da coleção de microrganismos do laboratório de Biorgânica do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Os fungos (**Figura 20**) foram cultivados em placas contendo meio de cultura (BDA) foram transferidos para um meio líquido contendo meio de batata dextrose (BD), utilizando 20 g/L de batata inglesa cortada em cubos, 20 g/L de glicose para 1 litro de água destilada. Foi adicionado 100 ml do meio líquido em erlenmeyers de 250 ml e autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Em seguida, foi inoculado três discos do micélio fúngico do meio sólido em cada erlenmeyer (triplicata) e então incubados por 4 dias a 28 °C e um agitador orbital a 100 rpm (PEDRINI et al., 2009).



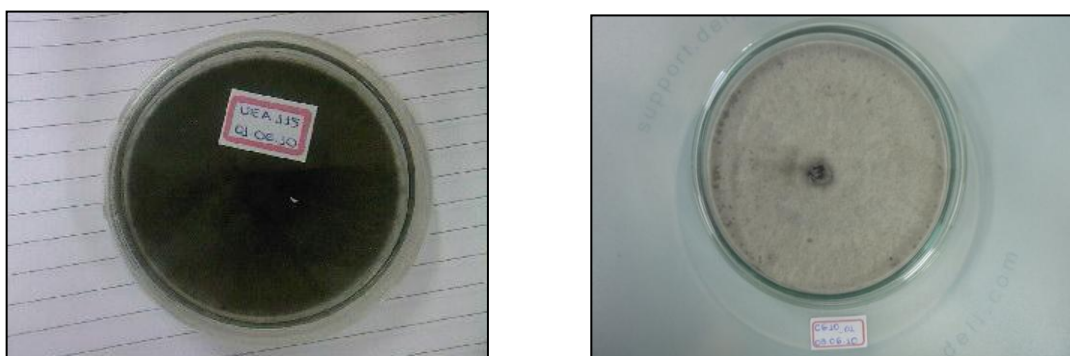


**Figura 20** – Alguns dos fungos endofíticos utilizados nas reações de redução de cetonas.

### 3.3.2 Fungos utilizados nas Reações de Resolução

A cepa UEA\_115, isolada do cacauieiro (*Theobroma cacao*), foi previamente utilizada no estudo da resolução do álcool 2-octanol, com porcentagem de conversão de 22%, excesso enantiomérico do substrato ( $ee_s$ ) de 22%, excesso enantiomérico do produto ( $ee_p$ ) e razão enantiomérica ( $E$ ) >200 em 120 horas de reação (ZANOTTO et al., 2009). A cepa CG10\_01 foi isolada dos galhos da carapanaúba (*Aspidosperma nitidum*). Os microrganismos foram cultivados em um meio líquido sintético constituído de 2 g de asparagina (VETEC), 2 g de Glicose (Dinâmica), 1 g de  $K_2HPO_4$ , Asparagina (VETEC), 0,5 g de  $MgSO_4$  (VETEC), 5 mg

de Hidrocloreto de tiamina (Sigma), 1,45 mg de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (VETEC), 0,235 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (VETEC) por litro de água destilada. O meio foi aquecido até cerca de  $60^\circ\text{C}$ , até dissolução dos sais. Após o resfriamento, adicionou-se 3 mL de óleo de girassol (SIGMA) nos erlenmeyers. O meio foi inoculado com quatro discos cortados do micélio fúngico em meio de Ágar de Batata Dextrose e então incubados a  $28^\circ\text{C}$  por 5-15 dias em um agitador orbital (200 rpm). O micélio foi seco por 72 h (dessecador) e triturado a pó.



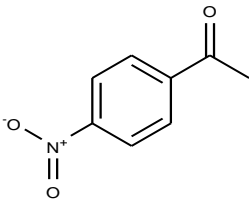
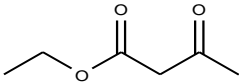
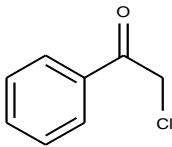
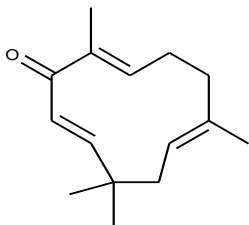
**Figura 21** – Fungos UEA\_115 e CG10\_01 utilizados nas reações de resolução.

### 3.4 SÍNTESE DE ÁLCOOIS RACÊMICOS

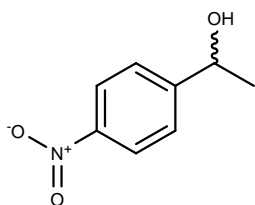
Para a produção dos álcoois racêmicos foram realizadas as reduções das cetonas via química utilizando o agente redutor comercial  $\text{NaBH}_4$ . Foram adicionado em um balão de fundo redondo as respectivas cetonas dissolvidas em metanol ( $\text{MeOH}$ ) e em seguida o agente redutor  $\text{NaBH}_4$  (Aldrich) sob agitação magnética e banho de gelo. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando como eluente n-hexano:acetato de etila, na proporção de 9:1, as placas de CCD foram revelados na lâmpada de U.V. e Iodo. Após o aparecimento do produto, a reação foi adicionado a solução saturada de  $\text{NaCl}$  e extraída com diclorometano (3x 15mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado em rotaevaporador. Em seguida, quando necessário o produto foi submetido ao processo de purificação utilizando uma coluna cromatográfica. Os álcoois racêmicos foram submetidos às análises de CG

(Condições CG - **tabela 4**). A proporção estequiométrica dos reagentes encontra-se na **Tabela 3**.

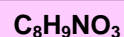
**Tabela 3.** Proporções estequiométricas dos reagentes para a síntese dos álcoois racêmicos.

	<b>Estrutura</b>	<b>Substrato (mmol)</b>	<b>NaBH<sub>4</sub> (mmol)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>1</b>		2,4 mmol	1,5 mmol	92%
<b>2</b>		3 mmol	5 mmol	20%
<b>3</b>		2,5 mmol	5 mmol	74%
<b>4</b>		4,5 mmol	10 mmol	72%

Os dados analíticos dos álcoois racêmicos estão representados a seguir.



**R,S - (*p*-nitrofenil)-etanol**

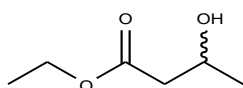


**Peso molecular** = 167,2

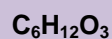
**Rf:** 0,6 (n-hexano, acetato de etila 8:2 v/v)

**Tempo reacional:** 1 hora, sólido amarelo

**CG-quiral:** tempo de retenção = 25.8 e 27.1  
(condições de programação: **tabela 4**)



**R,S – 3- hidroxibutanoato de etila**

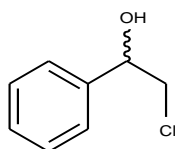


**Peso molecular** = 132,2

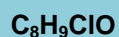
**Não é revelado no U.V e no lodo**

**Tempo reacional:** 30 min, sólido marrom

**CG-quiral:** tempo de retenção = 15,8 e 15,9  
(condições de programação: **tabela 4**)



**R,S- 2-cloro-feniletanol**

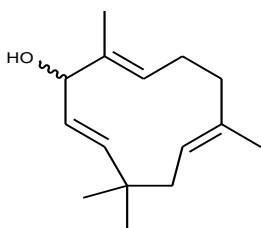


**Peso molecular** = 156,6

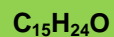
**Rf:** 0,5 (n-hexano, acetato de etila 8:2 v/v)

**Tempo reacional:** 1 hora, sólido branco

**CG-quiral:** tempo de retenção = 30.4 e 31.0  
(condições de programação: **tabela 4**)



**R,S- zerumbol**



**Peso molecular** = 220,3

**Rf:** 0,2 (n-hexano, acetato de etila 9:1 v/v)

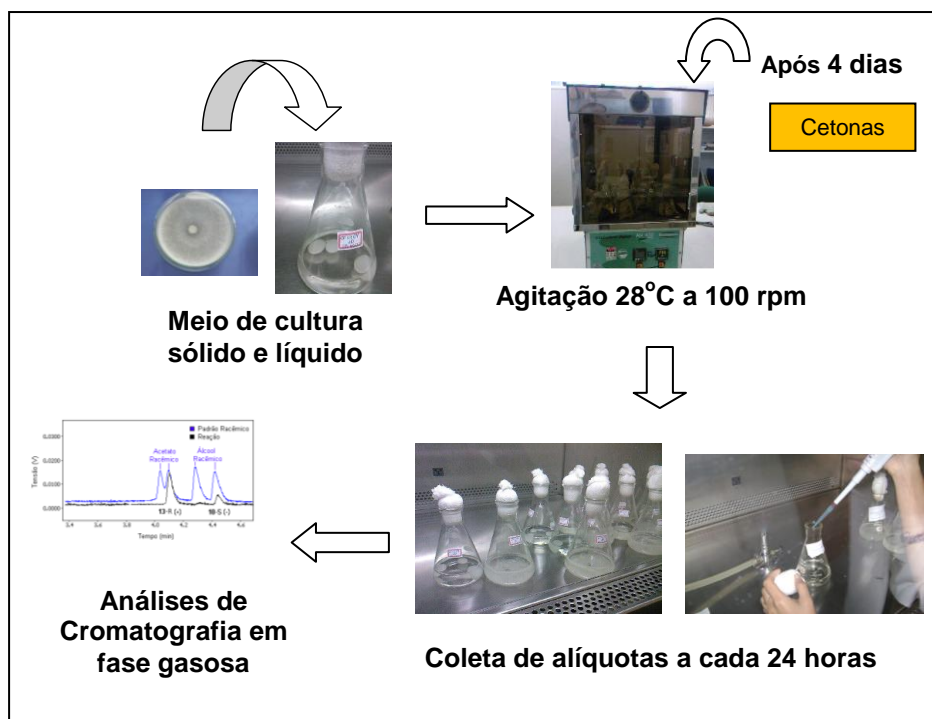
**Tempo reacional:** 24 horas, cristal branco

**CG-quiral:** tempo de retenção = 55.9 e 52.2  
(condições de programação: **tabela 4**)

### 3.5. REAÇÕES DE REDUÇÃO ENANTIOSELETIVA

#### 3.5.1 Reação de redução de cetonas utilizando fungos endofíticos

Os micélios fúngicos em meio líquido foram incubados durante 4 dias em um agitador orbital a 28°C a 100 rpm (**Figura 22**). No quarto dia de incubação foram adicionados 100 mg das cetonas: zerumbona,  $\alpha$ -cloroacetofenona, *p*-nitroacetofenona e acetoacetato de etila, dissolvidas em 1 mL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) no meio reacional. Alíquotas (1 mL) foram retiradas periodicamente a cada 24 horas na câmara de fluxo laminar, até completar 7 dias de reação. O sobrenadante das alíquotas dos 1º, 2º e 3º dia de reação foi extraído com o solvente diclorometano, secos por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfato de sódio), e posteriormente filtrados em membrana CHROMAFIL® 0-45/25 para serem analisados em Cromatografia em fase gasosa com coluna capilar quiral (Condições **tabela 4**) (PEDRINI et al., 2009).



**Figura 22** – Representação esquemática das reações de redução com fungos endofíticos.

### **3.5.2 Reação de redução de cetonas com tucumã (*Astrocaryum aculeatum*)**

Os tucumãs foram lavados com água corrente para retirada de contaminação, em seguida a casca e a polpa foram cortados em lascas e 10 g da casca (lascas) ou da polpa (lascas) foram adicionados em cada erlenmeyer contendo 100 ml de água destilada em seguida adicionou-se 100 mg do substrato carbonílico. As reações foram deixadas sob agitação a 180 rpm a 28°C. (YADAV et al., 2002). Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas do meio reacional e acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando como eluente hexano/acetato de etila nas seguintes proporções, 9:1 ou 8:2. Após três dias as reações foram tratadas com hexano e o solvente foi evaporado. As alíquotas foram extraídas com hexano grau HPLC e em seguida foram filtradas com uma membrana filtrante CHROMAFIL® 0-45/25 para serem analisados em Cromatografia em fase gasosa com coluna capilar quiral (Condições **tabela 4.**)

### **3.5.3 Reação de Redução de cetonas utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento de pão biológico comercial) em diferentes sistemas**

Em um frasco contendo 40 mL de hexano adicionou-se 1,5 mmol da cetona previamente solubilizada em hexano e 6g do fermento de pão biológico comercial. Em seguida, gotejou-se lentamente no meio reacional 2,4 ml de água destilada ou solução de sacarose ou trealose a 10%. As reações foram mantidas em um agitador orbital a 150 rpm e temperatura de 30°C. Alíquotas de 1,0 mL, de cada reação, foram retiradas periodicamente a cada 24h e analisadas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD). As alíquotas foram armazenadas sob refrigeração para posteriores análises por Cromatografia em fase gasosa. (ALBUQUERQUE, 2007; SILVA, 2009).

## **3.6 RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA**

### **3.6.1 Resolução Biocatalítica do Zerumbol utilizando a enzima comercial Novozyme 435 (lipase B de *Candida antarctica*)**

Após obtenção do zerumbol via química, foi realizada a reação de resolução do álcool secundário mediada por lipase. Foi utilizada a enzima comercial Novozyme 435, a fim de se obter o álcool enantiomericamente puro.

As reações foram realizadas em erlenmeyers de 50 mL, adicionando-se 3,2 mmol (33 mg) do álcool racêmico solubilizado em 10 mL de hexano P.A., 500µL de acetato de vinila e 80 mg da enzima lipase B de *Candida antarctica*. Após adicionar o agente acilante, fechou-se o frasco com rolha de borracha e foi colocado imediatamente sob agitação num agitador orbital termostaticado em 33°C a 150 rpm. Alíquotas de 100µL foram retiradas em tempos pré-determinados, e diluídas em hexano para serem analisadas em cromatografia em camada delgada tendo como eluente hexano/acetato de etila na proporção de 9:1. A reação foi interrompida em 120 horas e a mistura reacional foi filtrada em papel filtro e a enzima suportada foi lavada várias vezes com acetato de etila. Em seguida o solvente foi removido no rotaevaporador. A fim de purificar o álcool e o acetato formados, será realizado uma coluna cromatográfica tendo como eluente hexano/acetato de etila nas proporções de 8,5:1,5 e 8:2 (FERREIRA, 2008).

### **3.6.7 Resolução enzimática do zerumbol racêmico por micélios de fungos da Amazônia**

As reações foram realizadas em erlenmeyers de 50 mL, adicionando-se 3,2 mmol (33 mg) do álcool racêmico solubilizado em 10 mL de hexano P.A., 500 µL de acetato de vinila e 400 mg do micélio fúngico (UEA115 e CG1001). Após adicionar o agente acilante, fechou-se o frasco com rolha de tampa de borracha e foi colocado imediatamente sob agitação num agitador orbital em 33°C a 150 rpm. Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados, e diluídas em hexano para serem analisadas em cromatografia em camada delgada tendo como eluente

hexano/acetato de etila na proporção de 9:1. Quando foi constatado que ocorreu a conversão, a reação foi interrompida. (FERREIRA, 2008). O sobrenadante das alíquotas foi extraído com o solvente diclorometano, secos por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfato de sódio), em seguida filtrados com seringa e membrana CHROMAFIL<sup>®</sup>0-45/25 para serem analisados em Cromatografia em fase gasosa com coluna capilar quiral (Condições **tabela 4**).

### 3.7 Determinação da Conversão e do Excesso enantiomérico

Para a determinação da porcentagem de conversão e do excesso enantiomérico alíquotas foram retiradas periodicamente e analisadas no cromatógrafo gasoso equipado com uma coluna capilar de fase estacionária quiral.

A conversão é calculada pela razão das áreas dos picos referentes ao reagente e aos produtos. As áreas dos picos dos substratos e dos produtos foram comparadas, e a soma total das áreas foi considerada como 100%. O grau de seletividade na obtenção preferencial de um dos enantiômeros durante a redução das cetonas, foi avaliada em termos de excesso enantiomérico (**ee**), definido pela **Equação 1**. (AITKEN e KILÉNYI, 1992).

$$ee = \frac{(\% A \text{ do enantiômero maior}) - (\% A \text{ do enantiômero menor})}{(\% A \text{ do enantiômero maior}) + (\% A \text{ do enantiômero menor})} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Para as reações de resolução foram utilizadas as seguintes equações:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad \text{Eq. 2 (FABER, 1997)}$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_s)]} \quad \text{Eq. 3 (FABER, 1997)}$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 + ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]} \quad \text{Eq. 4 (FABER, 1997)}$$



Embora a qualidade do produto da resolução da resolução de um racêmico seja caracterizada pelo excesso enantiomérico, a razão enantiomérica (*E*) é um parâmetro importante, pois descreve o grau de conversão (*c*) e o *ee* do substrato e produto. O excesso enantiomérico é uma propriedade do produto, a razão enantiomérica é característica do processo (CHEN et al., 1982; FABER, 1997).

Para a análise dos produtos obtidos das reações de redução de cetonas e resolução de zerumbol racêmico foram utilizadas as seguintes condições de programação do CG-quiral (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Condições de programação do CG-quiral

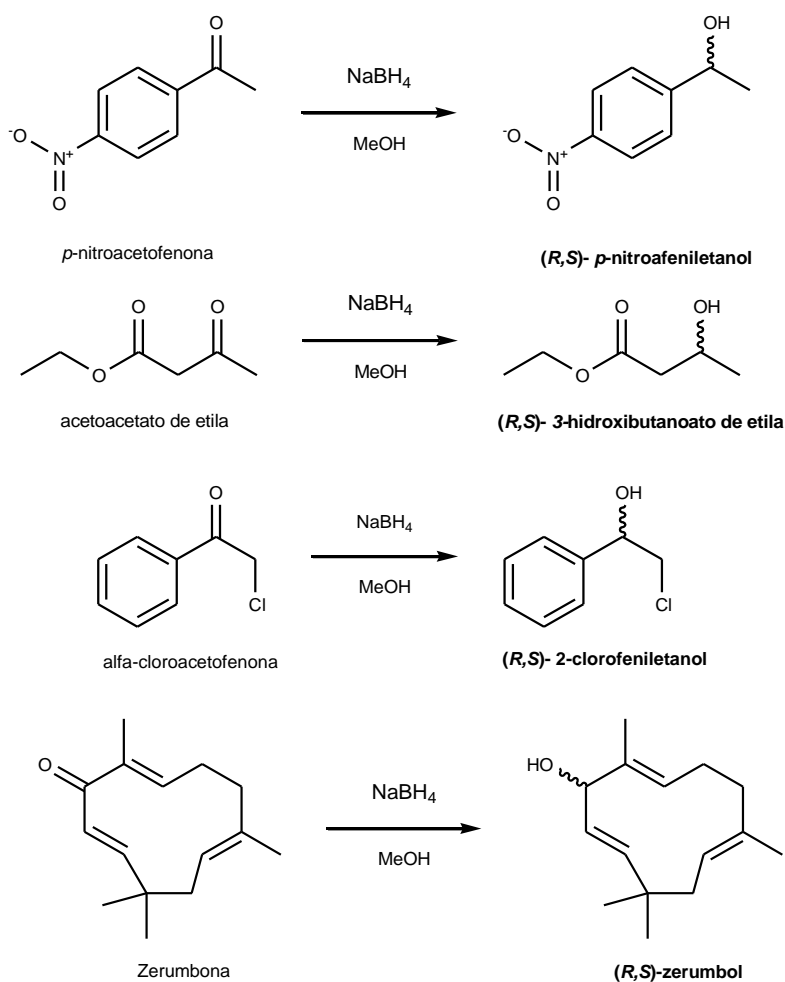
<b>Parâmetros</b>				
	<b>p-nitro- feniletanol</b>	<b>3-hidroxibutanoato de etila</b>	<b>2-cloro- feniletanol</b>	<b>zerumbol</b>
<b>Coluna</b>	Beta Dex	Beta Dex	Beta Dex	Beta Dex
<b>Temperatura inicial</b>	90 °C	70 °C	165 °C	120 °C
<b>Temperatura final 1</b>	150 °C	110 °C	200°C	180 °C
<b>Temperatura final 2</b>	----	---	---	200 °C
<b>Taxa de aquecimento 1</b>	5 °C/min	2 °C/min	2 °C/min	1 °C/min
<b>Taxa de aquecimento 2</b>	---	---	---	7 °C/min
<b>Tempo final 1</b>	2 min	5 min	2 min	3 min
<b>Tempo total de análise</b>	33 min	26 min	33 min	75 min
<b>Injetor</b>	Split 200 °C	Split 200 °C	Split. 200 °C	Split. 250 °C
<b>Detector: FID</b>	220 °C	220 °C	220 °C	250 °C
<b>Pressão do gás carreador</b>	100 kPa	100 kPa	100 kPa	100 kPa
<b>Volume da amostra</b>	1 µL	1 µL	1 µL	1µL

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, serão apresentados e discutidos os resultados das reações de biotransformação das seguintes cetonas: *p*-nitroacetofenona, acetoacetato de etila,  $\alpha$ -cloroacetofenona e zerumbona, mediadas pelos seguintes biocatalisadores: nove cepas de fungos endofíticos isolados da planta *Aspidosperma nitidum* (Carapanaúba), duas linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* **CAT-1** e **PE-2**, fermento de pão comercial seco (**FP**) e a polpa e a casca do fruto Tucumã da palmeira (*Astrocaryum aculeatum*). Para as reações de resolução do álcool foram utilizados como biocatalisadores a lipase comercial de *Candida antarctica* (NOVOZYME 435) e duas cepas de fungos endofíticos, UEA115 e CG1001, isolados do cacau (*Theobroma cacao*) e da carapanaúba respectivamente. Primeiramente, serão abordados os resultados obtidos para a redução das cetonas com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), para obtenção dos respectivos álcoois racêmicos que serão utilizados como padrões para as análises de CG-quiral ou para serem utilizados nas reações de resolução de álcool.

### 4.1. Síntese de álcoois racêmicos

Na literatura já são clássicas as reações de redução de cetonas utilizando o  $\text{NaBH}_4$ . Esse por ser um agente redutor aquiral produzirá uma mistura racêmica de enantiômeros (50% *R* e 50% *S*) (SOLOMONS, 2005). Nesse trabalho realizou-se a redução via química das cetonas: *p*-nitroacetofenona, acetoacetato de etila,  $\alpha$ -cloroacetofenona e zerumbona utilizando o  $\text{NaBH}_4$  para a obtenção dos álcoois racêmicos padrões para as análises de cromatografia em fase gasosa com coluna quirial (**Figura 23**).

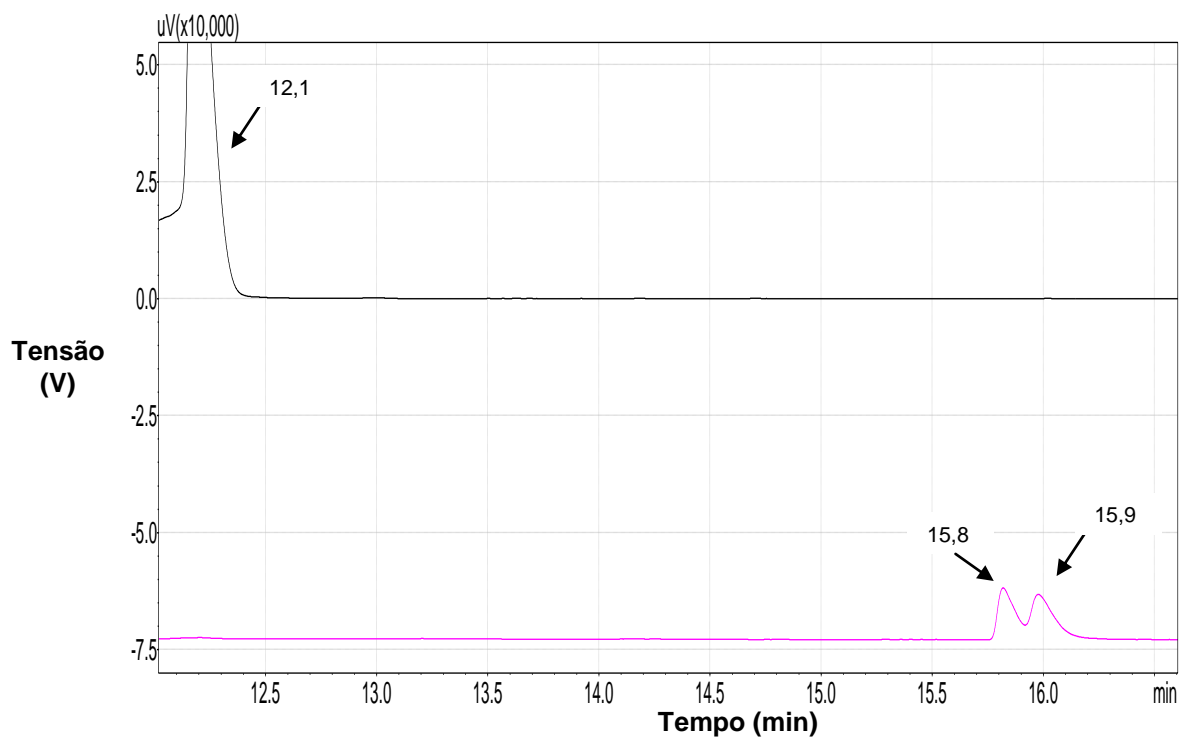


**Figura 23-** Reação de redução das diferentes cetonas utilizando  $\text{NaBH}_4$  em metanol.

Nas reações via química, os álcoois foram obtidos com excelentes graus de pureza, com exceção do zerumbol que foi purificado, através de cromatografia em coluna utilizando como fase móvel uma mistura em diferentes proporções, de hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade (8,5:1,5 e 8:2).

Todos os álcoois obtidos tiveram excelentes rendimentos, entre 72% a 92%, com exceção do 3-hidroxi-butanoato de etila que teve apenas 20% de rendimento. Os tempos reacionais foram baixos de 30 min a 1 hora, com exceção do zerumbol, que somente após 24 horas de reação pôde-se observar a formação do produto desejado. Os álcoois obtidos: *p*-nitrofeniletanol e o 2-clorofeniletanol, foram revelados tanto em lâmpada de ultravioleta (U.V), quanto na câmara de iodo. Já para o álcool zerumbol, por não apresentar em sua estrutura química elétrons em ressonância, devido à ausência de grupos cromóforos, apenas foi revelado na câmara de iodo. O 3-hidroxi-butanoato de etila não foi revelado no U.V e nem na

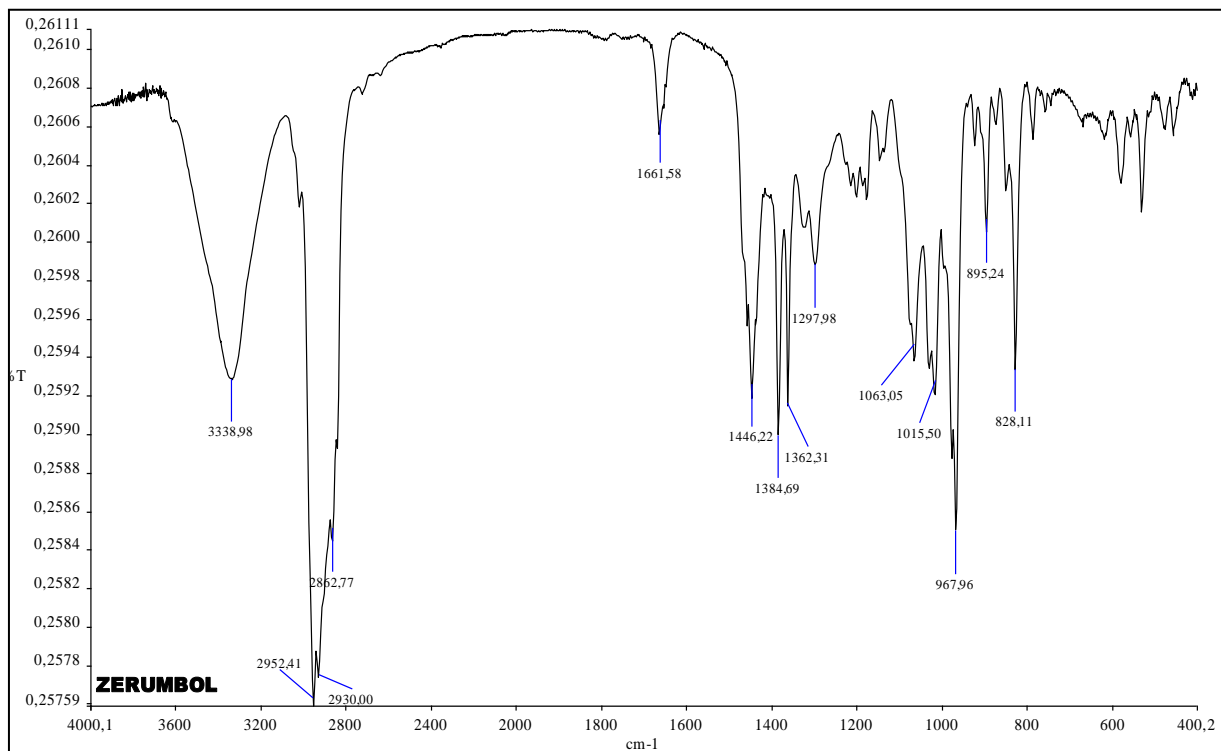
câmara de lodo, embora a cromatografia em fase gasosa quiral comprove a sua formação conforme pode ser observado na **Figura 24**.



**Figura 24-** Cromatograma da reação para obtenção do 3-hidroxibutanoato de etila racêmico (Conforme as condições reacionais descritas na **Tabela 4**). Em 12,1 min: acetoacetato de etila; 15,8 e 15,9 min: 3-hidroxibutanoato de etila racêmico.

Na **Figura 24**, a separação dos enantiômeros do álcool racêmico 3-hidroxibutanoato de etila, em 15,8 e 15,9 min, foi realizada com as condições de análise observada na Tabela 4. Os cromatogramas dos diferentes álcoois racêmicos obtidos se encontram no **ANEXO** (p.81).

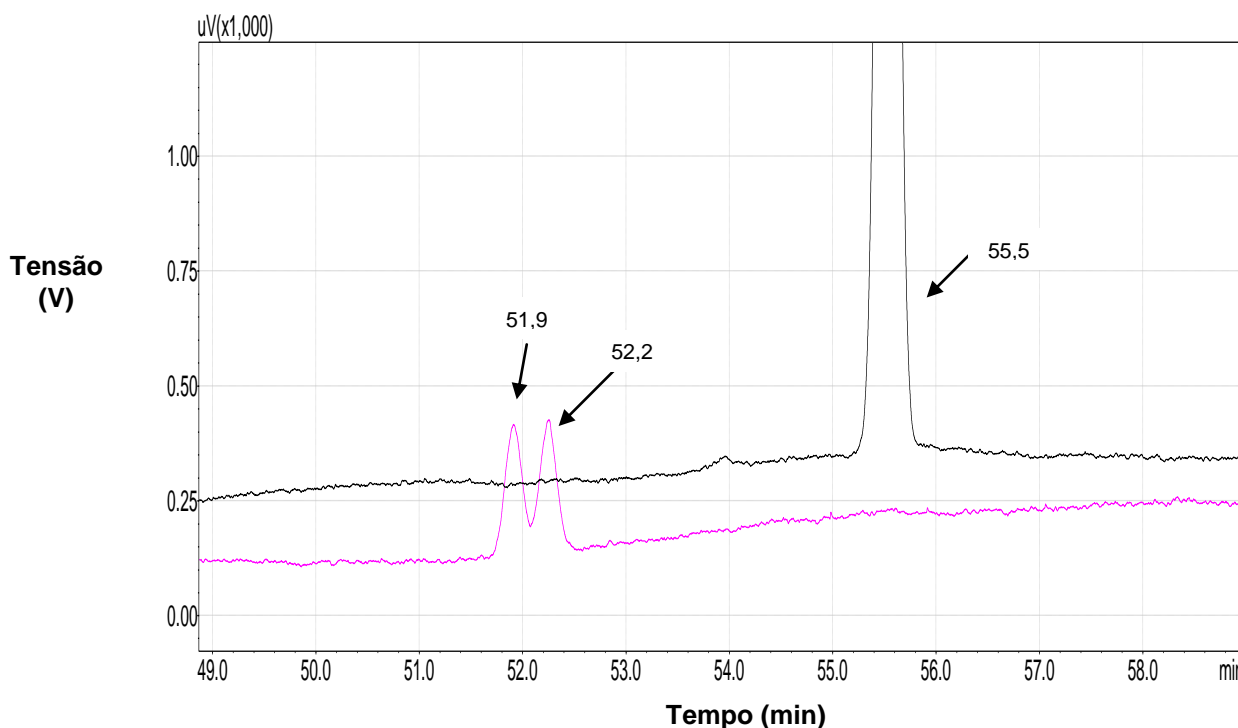
O zerumbol racêmico foi analisado por CG-Quiral e caracterizado por espectroscopia de Infravermelho (IV) (**Figura 25**).



**Figura 25-** Espectro de Infravermelho (IV) do zerumbol racêmico em pastilha de KBr.

O espectro de Infravermelho do composto apresentou uma banda de absorção em  $3338\text{ cm}^{-1}$  referente à hidroxila (-OH) caracterizando a formação do álcool. Na região de  $2952\text{ cm}^{-1}$  e  $2862\text{ cm}^{-1}$  são observadas bandas de absorção características de carbonos primários e secundários. Em  $1661\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda em baixa frequência referente a carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada indicando a presença de zerumbona remanescente. Na espectroscopia de infravermelho com pastilha de KBr é preciso que a amostra esteja concentrada, já na técnica de cromatografia em fase gasosa a amostra deve estar bem mais diluída, principalmente para que ocorra a separação dos enantiômeros na fase estacionária quiral, justificando assim o fato de que no cromatograma do álcool racêmico não é observado a presença da zerumbona.

Na **Figura 26** o cromatograma quiral do zerumbol racêmico revela a separação dos picos dos enantiômeros em 51.9 e 52.2 min, segundo as condições da **Tabela 4**.



**Figura 26-** Cromatograma em coluna quiral do zerumbol racêmico. Em 55,5 min: zerumbona; 51,9 e 52,2 min: zerumbol racêmico.

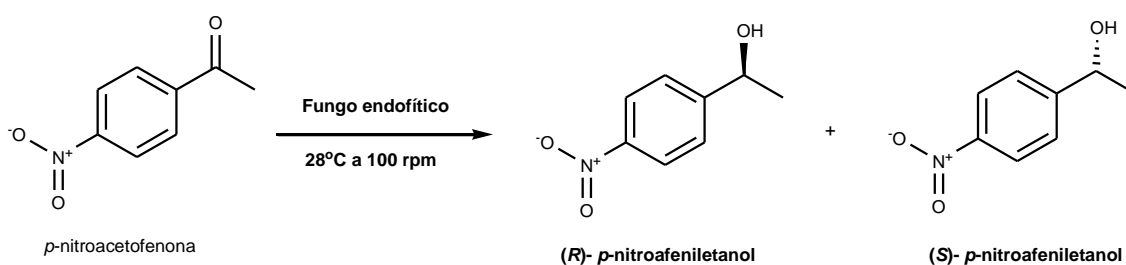
Após a obtenção dos álcoois racêmicos, realizaram-se as reações de redução das diferentes cetonas utilizando biocatalisadores alternativos. Primeiramente, serão discutidos os resultados das biorreduções mediadas por diferentes cepas de fungos endofíticos, em seguida, os resultados obtidos com a levedura *Sacharomyces cerevisiae* e com a polpa e a casca do fruto tucumã.

#### 4.2 Reações de redução de cetonas mediadas por fungos endofíticos

Foram utilizadas nove cepas de fungos endofíticos isoladas das folhas e galhos da Carapanaúba (*Aspidosperma nitidum*) cultivados em meio de cultivo Batata-Dextrose (BD), para as reações de redução das seguintes cetonas: *p*-nitroacetofenona, acetoacetato de etila,  $\alpha$ -cloroacetofenona e zerumbona.

#### 4.2.1 Reação de redução da *p*-nitroacetofenona mediada por fungos endofíticos

Nas reações de redução da *p*-nitroacetofenona com os fungos endofíticos foram utilizadas as cepas: CF0203, CF0106, CF0305 e CF1102. Após 4 dias de crescimento do micélio fúngico, em meio líquido BD, foi adicionado o substrato *p*-nitroacetofenona e mantido sob incubação por mais três dias (**Figura 27**).



**Figura 27** – Esquema de reação para a redução enantiosseletiva da *p*-nitroacetofenona utilizando fungos endofíticos.

Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas e os resultados das análises em CG/quiral podem ser observados na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Resultados das reações de redução da *p*-nitroacetofenona mediada por diferentes fungos endofíticos e tempos reacionais.

Fungo	Tempo de Reação (h)	Conversão (%)	ee (%)
CF02_03	24	66	>99
CF02_03	48	84	93
CF02_03	72	87	97
CF01_06	24	32	58
CF01_06	48	43	64
CF01_06	72	59	66
CF03_05	24	40	>99
CF03_05	48	48	>99
CF03_05	72	61	92
CF11_02	24	27	37
CF11_02	48	36	67
CF11_02	72	41	65

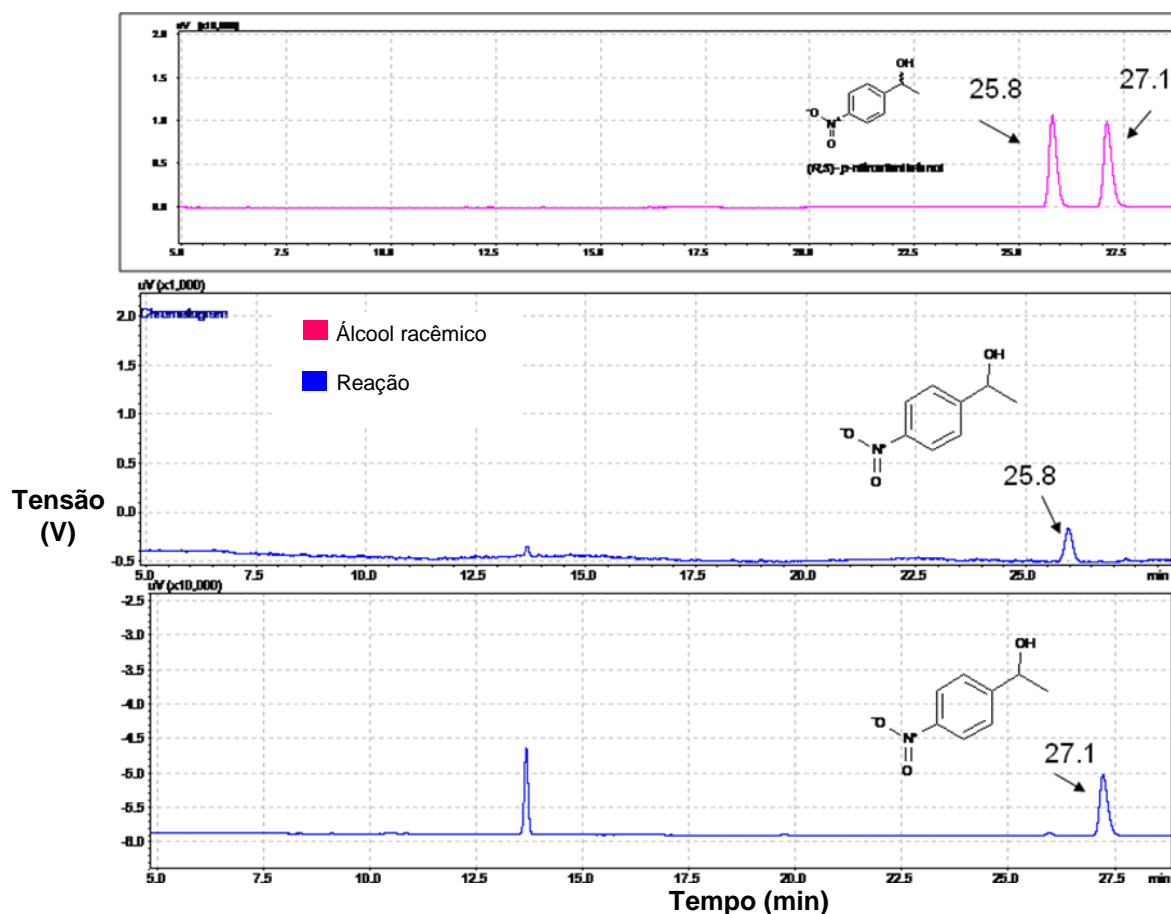
Observa-se na **Tabela 4** que o tempo reacional é um fator determinante para o aumento da porcentagem de conversão (%**c**) da *p*-nitroacetofenona. No entanto, para as cepas CF03\_05 e CF11\_02 os valores dos excessos enantioméricos foram reduzidos após 72 e 48 horas de reação, para cada cepa respectivamente. Estudos para aumentar a %**c**, sem no entanto reduzir o **ee** destas cepas, devem ser realizados com a variação de parâmetros reacionais, tais como a concentração do substrato e quantidade de biocatalisador utilizado.

Com a cepa CF02\_03 o excesso enantiomérico em 72 horas é 97%, com a formação majoritária de um único enantiômero conforme pode ser constatado na literatura utilizada como base para as condições de programação das análises em CG-quiral para este álcool, o primeiro enantiômero formado é o *R* e o segundo o *S*, estudos que utilizaram coluna quiral  $\beta$ -ciclodextrina porém sendo de marcas diferentes (COMASSETO et al., 2004; ALBUQUERQUE, 2007).

Na reação com o fungo CF03\_05 teve um aumento na conversão com o aumento do tempo reacional, porém houve uma diminuição no excesso



enantiomérico em 72 horas de reação. Observou-se com a cepa CF02\_03 formação em maior quantidade do enantiômero oposto formado. Comprovando que esses microrganismos podem ser seletivos tanto para o enantiômero *R* como para o *S* (Figura 28).



**Figura 28**-Cromatogramas em CG-quiral: o *p*-nitrofeniletanol obtido por redução via química, reação de 72 horas utilizando fungo CF02\_03 e reação de 72 horas de reação utilizando fungo CF03\_05. Em 25,8 e 27,1 min: *p*-nitrofeniletanol racêmico; 25,8 min: *p*-nitrofeniletanol da biotransformação; 27,1 min: *p*-nitrofeniletanol da biotransformação.

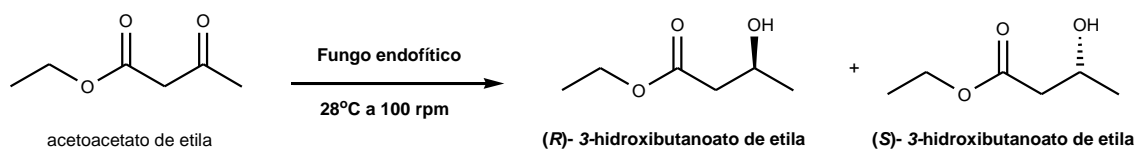
Os números de porcentagem de conversão e excesso enantioméricos das reações de redução com as cepas foram bons, sendo o melhor resultado obtido com a cepa fúngica CF02\_03 em 72 horas de reação. Observou-se que neste tempo reacional ocorreu a formação do álcool *p*-nitrofeniletanol enantiomericamente puro, ee 97% e porcentagem de conversão de 87%.

Em relação à enantiosseletividade das reações de redução as cepas CF02\_03 e o CF03\_05 apresentaram os melhores resultados de porcentagem de conversão 87% e 61% e excesso enantiomérico 97% e 92% respectivamente em 72 horas de reação.

Todas as cepas fúngicas isoladas das folhas da Carapanaúba utilizadas na redução da *p*-nitroacetofenona foram capazes de formar álcoois enantiomericamente puros. Estudos do tempo reacional serão necessárias para otimizar a formação do produto enantiomericamente puro. Para a confirmação da configuração absoluta (*R* ou *S*) dos álcoois formados nas reações serão necessários realizar experimentos em maior escala para poder isolar e purificar os produto das reações e caracterizar a configuração absoluta dos enantiômeros através de equipamentos, tais como; Polarímetro, RMN ou através de padrões sintéticos ou comerciais. Os cromatogramas das reações de redução da *p*-nitroacetofenona mediada por fungos endofíticos se encontram no **ANEXO** (p.82-83).

#### 4.2.2 Reação de redução do acetoacetato de etila mediada por fungos endofíticos

No estudo da redução com acetoacetato de etila com os fungos endofíticos foram utilizadas as seguintes cepas fúngicas: CF02\_03, CF03\_05, CF11\_02, e CF01\_06 isoladas das folha da Carapanaúba e CG05\_04, CG03\_08, CG07\_01 e CG02\_04 isoladas dos galhos da carapanaúba, cultivados em meio líquido BD. Após 4 dias de crescimento dos micélios fúngicos foi adicionado o substrato cetônico acetoaceto de etila e deixado sob incubação por mais três dias. (**Figura 29**).



**Figura 29-** Esquema da reação de redução do acetoacetato de etila mediada por fungos endofíticos.

Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas. Os resultados comprovaram a formação de um produto diferente do álcool padrão racêmico, não sendo observado portanto a reação de redução. Para as cepas CF03\_05, CF02\_03, CF01\_06, CF11\_02, CG05\_04 e CG03\_08 observou-se a formação de um único produto

detectado em CG-quiral. As reações com os fungos CG07\_01 e CG02\_04 não formaram nenhum produto até 72 horas de reação. Os resultados podem ser observados na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Reação de redução do acetoacetato de etila utilizando diferentes cepas de fungos endofíticos em diferentes tempos reacionais.

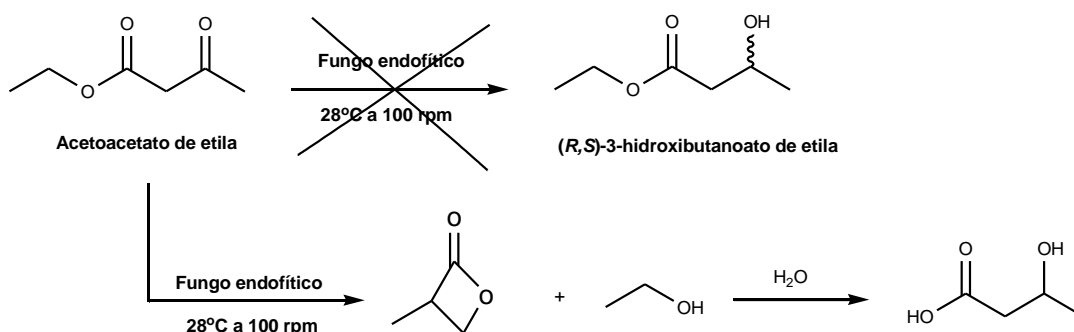
Fungo	Tempo de Reação (h)	Conversão (%)
CF03_05	24	50
CF03_05	48	62
CF0305	72	78
CF02_03	24	55
CF02_03	48	47
CF02_03	72	57
CF01_06	24	71
CF01_06	48	43
CF01_06	72	41
CF11_02	24	78
CF11_02	48	48
CF11_02	72	34
CG05_04	24	58
CG05_04	48	38
CG05_04	72	43
CG03_08	24	52
CG03_08	48	41
CG03_08	72	49
CG07_01	24	NR
CG07_01	48	NR
CG07_01	72	NR
CG02_04	24	NR
CG02_04	48	NR
CG02_04	72	NR

\*NR = Não ocorreu reação (Não reagiu)

De acordo com a **tabela 5**, observa-se na reação com a cepa CF03\_05, com o aumento do tempo reacional maior é a conversão ao produto. Em 72 horas de reação apresenta a melhor porcentagem de conversão (78%) obtida em relação às outras cepas.

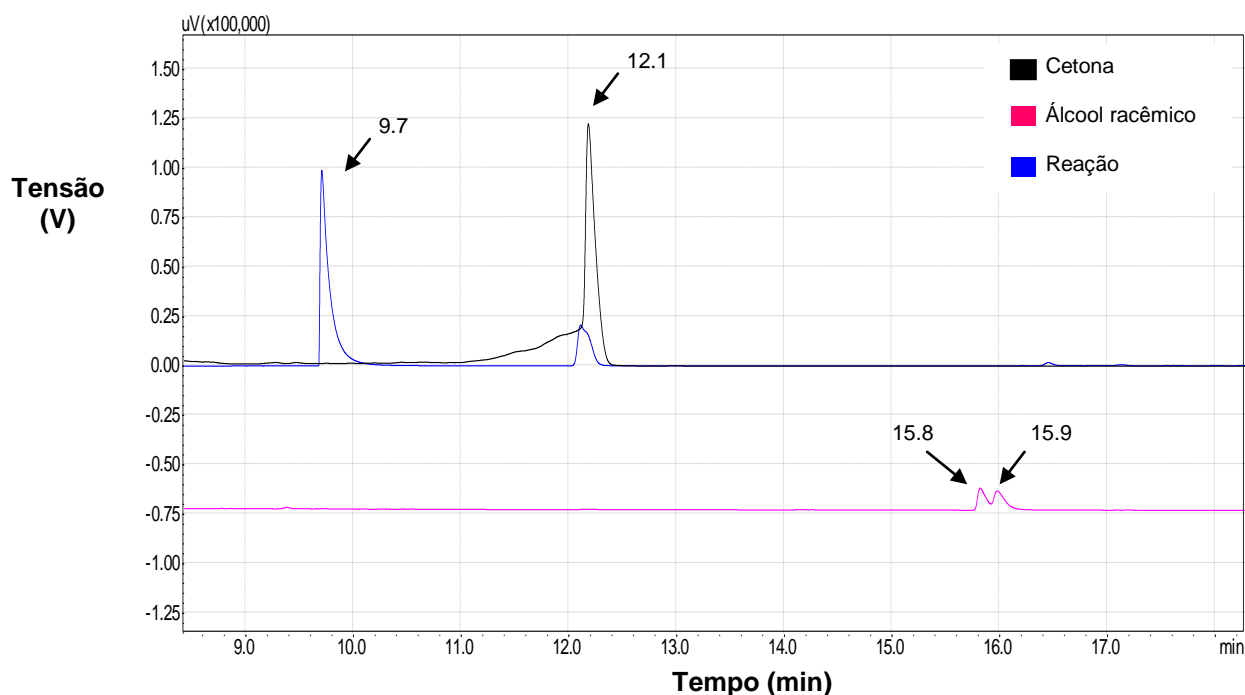
Nas reações com as cepas fúngicas CF11\_02 e CF01\_06 os resultados apresentaram característica de reações reversíveis, pois, o percentual de conversão diminui com o aumento do tempo reacional.

Não se pode afirmar que tipo de produto foi formado nas reações com os fungos endofíticos. Com base com dados na literatura, supõem-se que o acetoacetato de etila em contato com o meio aquoso produziu uma lactona e em seguida um estér (SAKAI, et al., 1999). Dados que só poderão ser confirmados através da caracterização química feita por análise de espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H, CG-MS e IV (**Figura 30**).



**Figura 30-** Esquema da biotransformação do acetoacetato de etila com fungos endofíticos e o suposto produto formado. Adaptado da referência (SAKAI, et al., 1999).

Na **Figura 31**, observa-se a sobreposição dos cromatogramas da alíquota reacional com a cepa fúngica CF03\_05 em 72 horas de reação. Conforme as condições de análises descritas na **Tabela 4**, o produto desta reação aparece no tempo de retenção de 9,7 min, no entanto o álcool racêmico padrão tem o tempo de retenção de 51.9 e 52.2 min.



**Figura 31-** Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: do padrão cetônico acetoacetato de etila, do álcool racêmico obtido por redução via química e da alíquota em 72 horas de reação utilizando a cepa CF03\_05. Em 12,1 min: acetoacetato de etila; 9,7 min: produto não identificado da biotransformação; 15,8 e 15,9 min: 3-hidroxiacetato de etila racêmico.

A reação com melhor porcentagem de conversão do acetoacetato de etila foi obtido com a cepa CF03\_05, 78% de conversão ao produto não identificado até o momento, em 72 horas de reação.

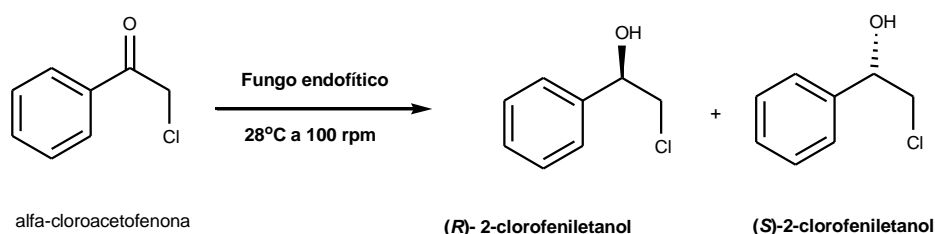
A fim de isolar e caracterizar quimicamente o composto formado será necessário repetir a reação a fim de isolar em maior quantidade o produto formado na reações com o acetoacetato de etila.

Os cromatogramas da biotransformação do acetoacetato de etila mediada por fungos endofíticos se encontram no **ANEXO** (p.86-88).

Para verificar se o produto observado nos cromatogramas não era algum metabólito produzido pelo fungo endofítico utilizado, alíquotas dos meios de culturas nos mesmos tempos de incubação, sem o substrato para biotransformação foram extraídas em diclorometano e injetados no CG-quiral.

### 4.2.3 Reação de redução da $\alpha$ -cloroacetofenona mediada por fungos endofíticos

Nas reações de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona com os fungos endofíticos foram utilizadas as cepas: CG05\_04 e CF03\_04 isoladas do galho e da folha da Carapanaúba (*Aspidosperma nitidum*). Após 4 dias de crescimento do micélio fúngico, em meio líquido BD foi adicionado o substrato cetônico  $\alpha$ -cloroacetofenona, e mantido sob incubação por mais três dias (**Figura 32**).



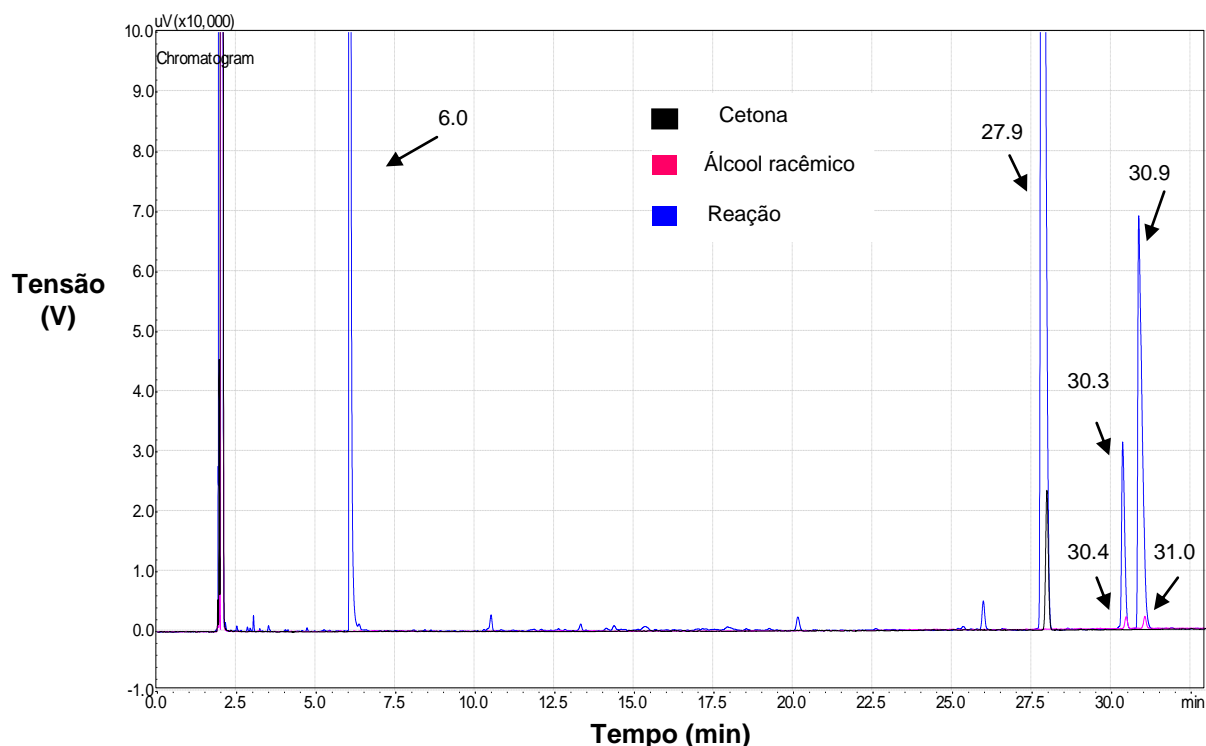
**Figura 32** – Esquema da reação de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona mediada por duas cepas fúngicas endofíticas (CG05\_04 e CF03\_04).

Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas, e os resultados podem ser observados na **Tabela 7** que apresentam as porcentagens de conversão da  $\alpha$ -cloroacetofenona ao álcool enantiomericamente puro. Na reação com o fungo CG0504, verificou-se que a taxa de conversão é baixa e se mantém constante até 72 horas, da mesma forma o excesso enantiomérico manteve-se contante em 80% com o aumento do tempo reacional.

**Tabela 7** – Reação de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona mediada por fungos endofíticos.

Fungo	Tempo de Reação (h)	Conversão (%)	ee (%)
CG0504	24	19	58
CG0504	48	19	60
CG0504	72	19	60
CF0304	24	24	62
CF0304	48	24	50
CF0304	72	26	50

Observa-se na **Figura 33** a sobreposição dos cromatogramas obtidos em 72 horas de reação com a cepa fúngica CF0304, com os padrões do álcool racêmico e do substrato cetônico. Segundo a literatura o primeiro enantiomero, a ser detectado nas condições de análises em CG-quiral também utilizados nestes estudos, foi o enantiomero *S* seguido do enantiomero *R* nos tempos de retenção de 30.3 e 30.9 respectivamente, observa-se na figura 29 uma maior formação do possível álcool *R*. (ALBUQUERQUE (2007) e ROCHA (2008)).



**Figura 33** – Sobreposição dos cromatogramas:  $\alpha$ -cloroacetofenona, 2-clorofeniletanol e reação de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona com o fungo CF03\_04 em 72 horas. Em 6,0 min: produto não identificado da reação; 27,9 min: alfacloroacetofenona; 30,4 e 31,0 min:  $\alpha$ -clorofeniletanol racêmico; 30,3 e 30,9 min:  $\alpha$ -clorofeniletanol da biotransformação.

O aparecimento de um composto não identificado no tempo de retenção de 6 min., diferente do tempo de retenção da cetona (27.9 min) foi observado para as reações com as cepas CF03\_04 e CG05\_04. O meio de cultura destas cepas foi investigado realizando análises cromatográficas de alíquotas destes meios para verificar a produção de algum metabólito produzido pelas cepas estudadas. Nenhum composto em 6 min de retenção foi observado. Supõe-se que este produto deva ser

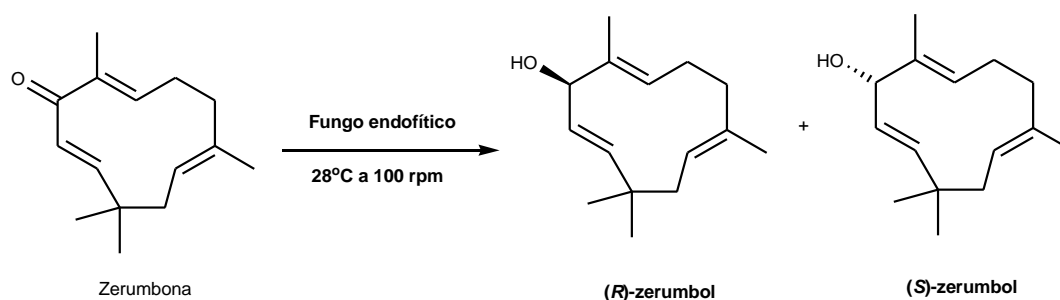
algum metabólito secundário liberado pelo fungo, visto que este composto se mantém constante desde o período de 24 horas de reação (após a adição do substrato) com as duas cepas fúngicas.

As cepas fúngicas CG05\_04 e CF03\_04 apresentaram bons resultados, apesar da baixa conversão, os excessos enantioméricos foram bastante significativos. Sendo necessário a continuidade dos estudos, com variações de parâmetros, para tentar obter maiores conversões e melhores excessos enantioméricos para a redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona.

A continuidade dos estudos também fornecerá informações sobre o tempo necessário para o consumo completo do substrato  $\alpha$ -cloroacetofenona. Experimentos em maior escala, para isolar e realizar a caracterização química dos produtos das reações e dos possíveis metabólitos secundários formados, também serão necessários para verificar a viabilidade destes biocatalisadores.

#### 4.2.4 Reação de redução da zerumbona mediada por fungos endofíticos.

As cepas dos fungos endofíticos utilizadas para redução da zerumbona foram: CF02\_03 e CF03\_05 isoladas das folhas da Carapanaúba; e as cepas G05\_04 e CG03\_08 isoladas dos galhos da Carapanaúba. Após 4 dias de crescimento do micélio fúngico, em meio líquido BD foi adicionado o substrato cetônico, zerumbona e mantido sob-incubação por mais três dias. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas, o substrato, o produto da reação e os metabólitos, foram extraídas com o solvente diclorometano e analisadas por CG/quiral (**Figura 34**).



**Figura 34-** Esquema da reação de redução da zerumbona utilizando cepas fúngicas endofíticas.



Nas reações de redução da zerumbona com fungos endofíticos, não se observou a formação do álcool desejado por CG-quiral, no entanto, houve a formação de vários sub-produtos que devem ser isolados e caracterizados na continuidade deste trabalho.

Para verificar a viabilidade da reação de redução da zerumbona através de outro biocatalisador, testou-se o fermento de pão comercial conforme pode ser visualizado na discussão dos resultados a seguir.

#### **4.3 Reações de redução de cetonas utilizando *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes sistemas.**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida popularmente como fermento de pão biológico, na biocatálise tem seu grande destaque por atuar em reduções enantiosseletivas de cetonas alifáticas, aromáticas e  $\alpha,\beta$ -insaturada (CHEN et al., 1984).

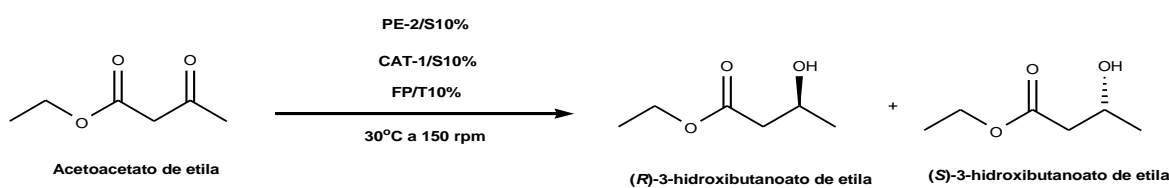
No entanto, a levedura foi testada na redução das cetonas: zerumbona e acetoacetato de etila. Testou-se também o acetoacetato de etila, pois na literatura é muito relatado a sua redução utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Albuquerque (2007) utilizou o fermento de pão como biocatalisador na reação de redução do acetoacetato de etila obtendo em sistema bifásico 100% de conversão ao álcool quiral S e >99% de excesso enantiomérico (NASCIMENTO et al., 2002; ZANOTTO, 2003; ALBUQUERQUE, 2007).

Utilizou-se o fermento de pão comercial (**FP**) e linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, **CAT-1** e **PE-2**, para atuarem na reação de redução do acetoacetato de etila. Foi empregado como agente protetor da membrana celular da levedura os açúcares; trealose (**T**) a 10% para **FP** e sacarose (**S**) a 10% para as linhagens **CAT-1** e **PE-2**. Nessas reações de redução com acetoacetato de etila foram obtidos álcoois puros, sendo que nos sistemas reacionais **CAT-1/S10%** e **PE-2/S10%** foram as melhores taxas de conversão a produto, com destaque para o sistema reacional com o biocatalisador **PE-2/S10%** 45% de conversão ao produto em 36 horas, entretanto o sistema **FP/T10%** apresentou uma conversão menor que 1% em 36 horas de reação.

Na reação de redução da zerumbona com os sistemas de biocatálise, **FP/T10%** não foi observado a formação do álcool, mas sim de vários sub-produtos que devem ainda serem isolados e caracterizados.

#### 4.3.1 Reação de redução do acetoacetato de etila utilizando linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes sistemas.

As reações de redução do acetoacetato de etila foram mediadas por fermento de pão comercial, **FP** e linhagens *S. cerevisiae* **CAT-1** e **PE-2** em solvente orgânico, hexano e deixado em um agitador orbital a 150 rpm a 30°C (**Figura 35**).



**Figura 35** – Esquema das reações de redução utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (**FP**) e as linhagens industriais (**CAT-1 e PE-2**).

As linhagens industriais de *S. cerevisiae*, **CAT-1** e **PE-2**, foram selecionadas devido ao grande destaque na indústria, juntas foram responsáveis no período 2007/2008 por 60% da produção brasileira de álcool, correspondendo a 13,4 bilhões de litros. Essas leveduras foram utilizadas na redução de chalconas por Silva (2009) e obteve boas conversões (>99%).

A trealose e a sacarose foram utilizadas como agentes protetores, pois segundo a literatura alguns açúcares têm influência direta na integridade da membrana celular, sendo de extrema importância esta proteção para que sistemas reacionais utilizando solventes orgânicos, não sofram contaminação com material intracelular devido ao rompimento da membrana celular por agentes agressores (LEON et al., 1998; DONG et al., 2007; LUO et al., 2008). Zanotto e colaboradores verificaram, que para a reação de redução do acetoacetato de etila utilizando a *S.cerevisiae* e hexano como solvente, não ocorreu diferença nos resultados de porcentagem de conversão 100% e **ee** > 99% em 24 horas de reação, quando o

agente protetor da membrana celular foi a trealose ou a sacarose (ZANOTTO, 2003).

A escolha dos valores das variáveis, temperatura e velocidade de agitação para este experimento, foram baseadas pelos estudos de Silva e colaboradores, que verificaram a influência destas variáveis no aumento da porcentagem de conversão quando, por exemplo, a reação era realizada sob agitação magnética a 150 rpm, em rotações menores foi observado uma diminuição a porcentagem de conversão dos produtos. Em relação a temperatura verificou-se que as conversões (68 - 99%) dos produtos aumentaram com o aumento da temperatura de 25 a 30°C, na faixa de 30-45°C as conversões mantiveram-se constantes, entretanto após 45°C houve uma diminuição das conversões (SILVA, 2009). Entretanto deve-se salientar que uma agitação vigorosa pode causar uma desativação da enzima por estresse químico e mecânico (MORITA e ASSUMPÇÃO, 1995).

De acordo com a **Tabela 8** pode-se verificar que a melhor conversão foi com a linhagem **PE-2**, em apenas 16 horas de reação observou-se 83% de conversão ao álcool e um **ee** de 9%, com a formação majoritária de um dos enantiômeros, porém houve a diminuição da conversão com o aumento do tempo reacional embora os excessos enantioméricos mantiveram-se constantes (>99).

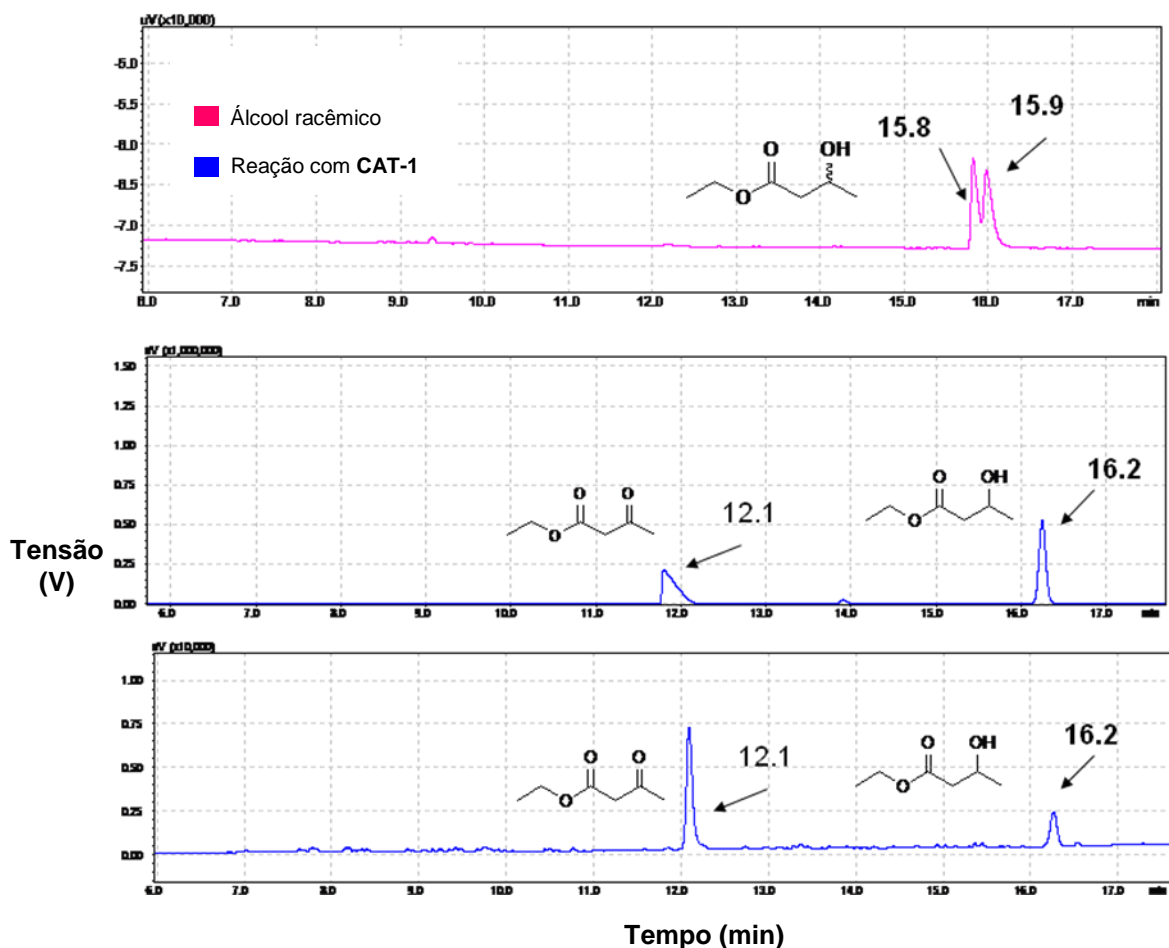
Já para o **FP** a formação do álcool só ocorreu em 36 horas com uma conversão abaixo de 1%. O **FP** foi mais seletivo para a formação do possível *S* conforme a literatura utilizada como base para as condições de programação das análises em CG-quiral para este álcool (NASCIMENTO et al., 2002; ZANOTTO, 2003; ALBUQUERQUE, 2007).

**Tabela 8**– Reação de redução do acetoacetato de etila mediada por *Saccharomyces cerevisiae*.

<b>Sistema biocatalítico</b>	<b>Tempo de Reação (h)</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b>ee (%)</b>
<b>FP/T10%*</b>	16	---	---
<b>FP/T10%*</b>	24	---	---
<b>FP/T10%*</b>	36	0.85	26
<b>CAT-1/S10%*</b>	16	0.33	9
<b>CAT-1/S10%*</b>	24	22	84
<b>CAT-1/S10%*</b>	36	24	99
<b>PE-2/S10%*</b>	16	83	9
<b>PE-2/S10%*</b>	24	54	99
<b>PE-2/S10%*</b>	36	45	99

T10%: Solução de trealose (10%), S10%: Solução de Sacarose (10%),\*Meio Orgânico (Hexano) (150rpm 30°C)

Para a reação de redução do acetoacetato de etila, utilizando a linhagem **CAT-1**, houve um aumento das conversões com o aumento do tempo reacional, não ultrapassando 24 % de conversão em 36 horas. Apesar das baixas conversões o excesso enantiomérico aumentou-se obtendo >99%. Esta linhagem também mostrou-se mais seletiva para o possível enantiomero *R*, isto é observado na **Figura 36**.



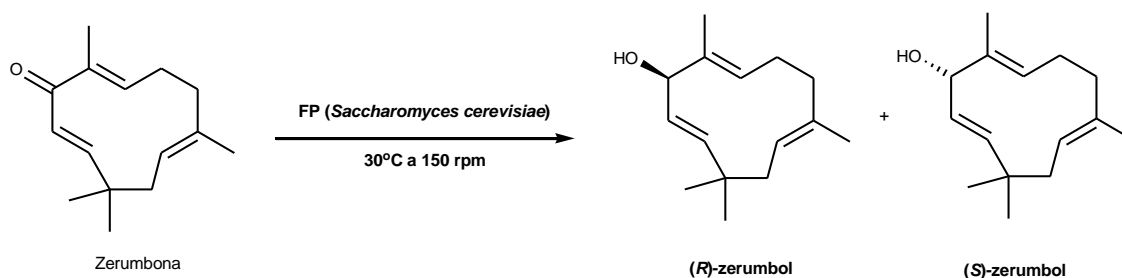
**Figura 36-** Cromatogramas de CG-quiral: reação de 36 horas utilizando **PE-2**, o 3-hidroxi-butanoato de etila obtido por redução via química e reação de 36 horas utilizando **CAT-1**. Em 15,8 e 15,9 min: 3-hidroxi-butanoato de etila racêmico; 12,1 min min: acetoacetato de etila, 16,2 min: 3-hidroxi-butanoato de etila da biotransformação.

Em 16,2 min verifica-se o tempo de retenção do álcool formado, sendo que a linhagem **CAT-1** foi seletiva para um dos enantiômeros formados, diferente da reação com o **FP** que foi mais seletivo ao possível enantiômero S.

A observação da formação de subprodutos obtidos nas reações de redução do acetoacetato de etila com as cepas fungicas endofíticas, não foi observado para as reações realizadas com a *S.cerevisiae*. Pode-se supor que a reações realizadas em meio aquoso podem promover o aparecimento de subprodutos indesejados, o que não aconteceria quando realizadas em meio orgânico. Os cromatogramas das reações de redução do acetoacetato de etila utilizando *Saccharomyces cerevisiae* encontram-se no **ANEXO** (p.89-90).

### 4.3.2 Reações de redução da zerumbona utilizando *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes sistemas.

As reações de redução da zerumbona foram mediadas por **FP** em hexano como solvente, tendo como agente protetor da membrana celular da levedura a sacarose, as reações foram adicionadas em um agitador orbital a 150 rpm e 30°C (**Figura 37**).



**Figura 37-** Esquema das reações de redução da zerumbona mediada por fermento de pão comercial (**FP**) *Saccharomyces cerevisiae*.

As alíquotas foram recolhidas a cada 24 horas de reação durante 3 dias. Diante das análises por CG-quiral foi constatado que não houve a formação do zurumbol. No entanto observou-se a formação de vários subprodutos que devem ser isolador e caracterizados. Supõe-se que além da carbonila o **FP** pode ter reduzido as duplas ligações.

Com o intuito de encontrar biocatalisadores alternativos para a reação de redução da zerumbona, foi testado como biocatalisador o fruto amazônico tucumã, pois na literatura pode-se verificar o relato de inúmeros vegetais utilizados para reações de redução de cetonas produzindo álcoois quirais. Além da zerumbona testou-se o fruto tucumã como biocatalisador para redução da *p*-nitroacetofenona, que quando utilizada como substrato para as cepas fungicas endofíticas obtiveram bons resultados.

### 4.4 Reação de redução de cetonas com tucumã (*Astrocaryum aculeatum*)

Atualmente, muitos frutos e vegetais tem sido empregados na biocatálise para a redução enantiosseletiva de cetonas pró-quirais formando álcoois

enantiomericamente puros. O primeiro vegetal utilizado e bastante citado na literatura foi a cenoura (*Daucus carota*) em seguida outros foram sendo utilizados em diversos trabalhos, no entanto nenhum resultado comparado com a eficiência da cenoura (YADAV et al.,2002).

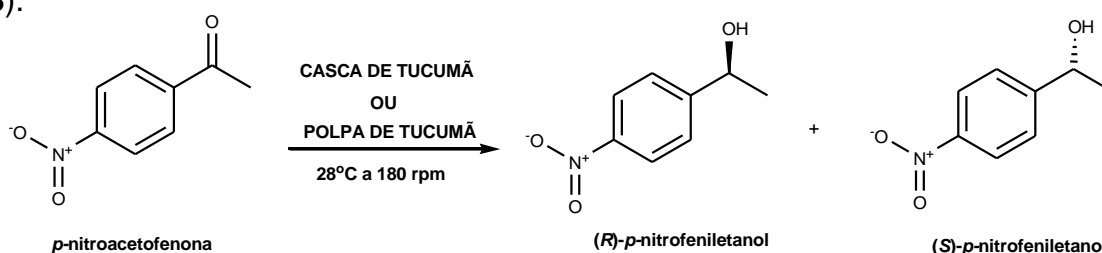
Machado e colaboradores (2008) resolveram estudar a casca do maracujá (*Passiflora edulis*) como biocatalisador em reações de bio-redução de cetonas aromáticas, em 72 horas obtiveram boas taxas de conversões (74% e 30%) e razoáveis excessos enantioméricos (23% e 64%). Já que se trata de um resíduo é de grande valor estudos que possam aprimorar os resultados para utilização deste biocatalisador alternativo.

Neste contexto o tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) foi escolhido por se tratar de um fruto da região amazônica e seu uso em reações de redução de cetonas não é relatado na literatura.

Nas reações de redução com a *p*-nitroacetofenona utilizou-se a casca e a polpa do fruto tucumã. Os álcoois enantiomericamente puros foram obtidos tanto na reação com a casca quanto a com a polpa do tucumã, salientando que a utilização da casca em reações de biorredução seria mais sustentável. Em 48 horas de reação formaram os álcoois enantiomericamente puros, as taxas de conversão com a casca foi de 86% e na reação com a polpa 74%, os excessos enantioméricos foram de 23% e 47% respectivamente (**Tabela 9**).

#### 4.4.1 Reação de redução da *p*-nitroacetofenona com tucumã (*Astrocaryum aculeatum*)

Para as reações de redução com o tucumã foram adicionadas em erlenmeyers a casca ou a polpa do tucumã, água destilada e o substrato *p*-nitroacetofenona, sendo mantidas incubadas no agitador orbital por 48 horas (**Figura 38**).



**Figura 38-** Esquema da reação de redução da *p*-nitroacetofenona utilizando tucumã como biocatalisador.

Alíquotas foram retiradas em 1 hora, 24 horas e 48 horas de reação, e a formação do álcool foi constatado após 48 horas de reação, os resultados podem ser observados na **tabela 9**.

**Tabela 9.** Resultados dos cromatogramas obtidos da reação do tucumã.

<b>Agente redutor</b>	<b>Tempo Reacional (h)</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b>ee (%)</b>
Casca	1	---	--
Casca	24	---	--
Casca	48	86	23
Polpa	1	---	--
Polpa	24	---	---
Polpa	48	74	47

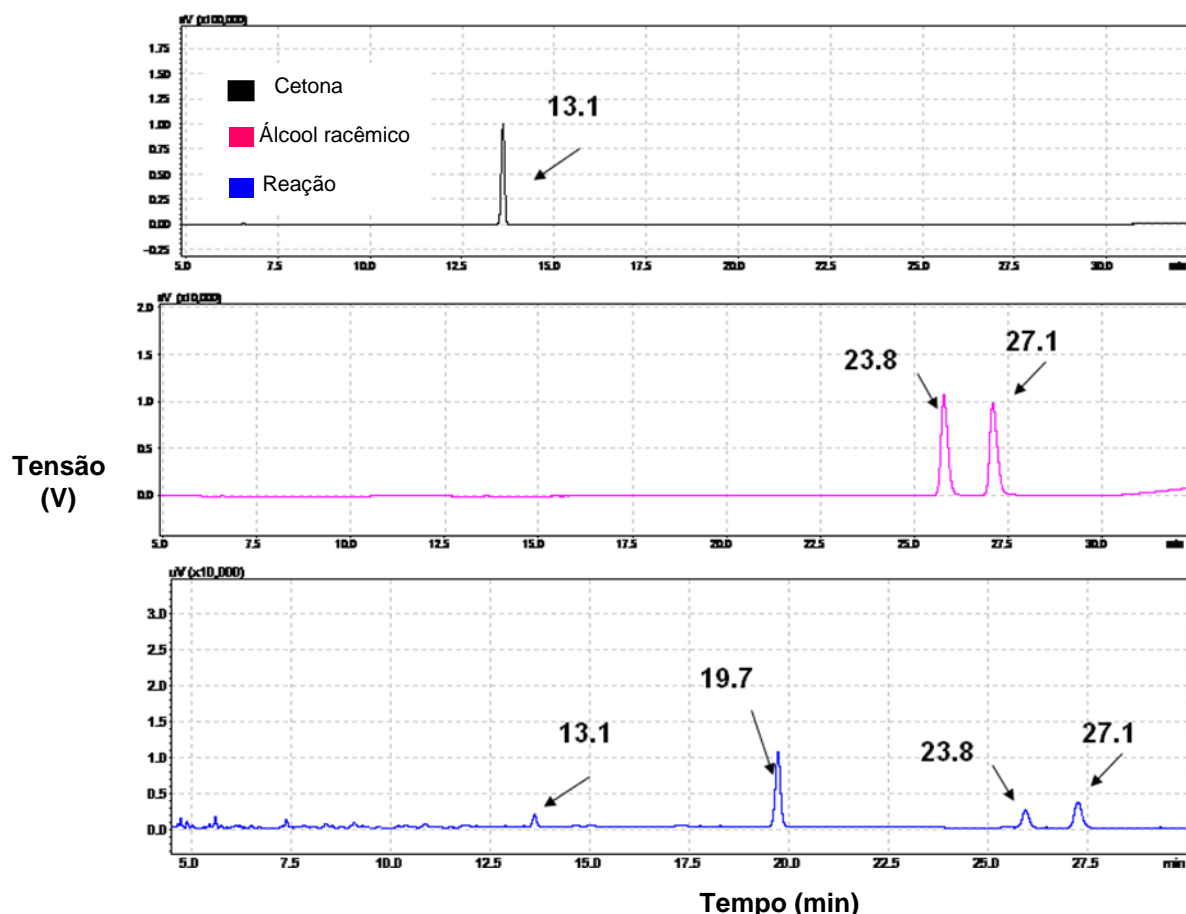
De acordo com a **Tabela 9**, os resultados são promissores, visto que em 48 horas foi observado a formação do álcool tanto na reação com a polpa quanto com a casca do tucumã. Obteve-se uma maior conversão ao álcool na reação com a casca do que com a polpa, entretanto o excesso enantiomérico foi superior na reação com a polpa.

Yadav e colaboradores, realizaram a redução da *p*-nitroacetofenona utilizando a cenoura como biocatalisador e obtiveram em 40 horas um percentual de conversão de 82%, e seletividade para o enantiômero *S* com **ee** >99% (YADAV et al., 2002). No presente trabalho em 48 horas de reação de redução com a casca do tucumã a conversão ao álcool foi de 86%, entretanto o **ee** foi de 23%.

A **figura 39** apresenta o cromatograma obtido para 48 horas de reação de redução utilizando a casca de tucumã, verificou-se a formação dos álcoois no tempo de retenção de 25.1 e 27.1 min quando comparados com o álcool racêmico obtido por redução via química, sendo que mais seletivo para o álcool *S* de acordo com dados na literatura (COMASSETO et al., 2004; ALBUQUERQUE, 2007). No



cromatograma da reação observa-se em 12.1 min a existência da *p*-nitroacetofenona que não foi consumida completamente em 48 horas de reação.



**Figura 39-** Cromatogramas: do substrato *p*-nitroacetofenona, do álcool racêmico *p*-nitrofeniletanol e da alíquota de 48 horas da reação de redução utilizando a casca do fruto tucumã. Em 13,1: *p*-nitroacetofenona; 23,8 e 27,1 min: *p*-nitrofeniletanol racêmico; 19,7 min: possível beta-caroteno; 23,8 e 27,1 min: *p*-nitrofeniletanol da biotransformação.

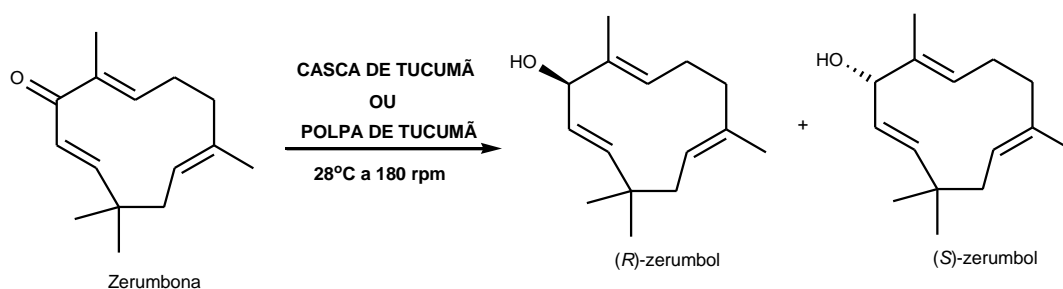
Da mesma forma que é relatado na literatura, para as reações utilizando a cenoura, que as únicas impurezas detectáveis são o caroteno e substrato cetônico de partida (RODRIGUES et al.,2007), pode-se detectar no tempo de retenção de 19.7 min, a presença de outra substância além dos álcoois formados, tanto nas reações com a casca como com a polpa. O fruto tucumã é altamente nutritivo sendo que a polpa contém um dos mais elevados concentrações de pro-vitamina A o “beta-caroteno” 52 mg/100g de polpa, em comparação com o beta caroteno da cenoura de 6,6 mg/100g de polpa é uma concentração significativa, quando o que pode com o

passar do tempo reacional provavelmente acaba sendo dissolvido na água. Isto é observado, nos erlenmeyers das reações, a água se torna laranja e turva após 48 horas (CALVACANTE, 1996).

Observa-se neste estudo a necessidade de realizar as reações de redução com o tucumã em maior escala para isolar e caracterizar os produtos, e em um maior tempo reacional, a fim de aumentar as taxas de conversão e excesso enantiomérico do álcool desejado.

#### 4.4.2 Redução enantiosseletiva da zerumbona mediada por tucumã (*Astrocaryum aculeatum*)

Para as reações de redução com o tucumã foram adicionadas em erlenmeyers a casca ou polpa do tucumã, água destilada e a zerumbona como substrato, sendo o sistema reacional mantido sob incubação em agitador orbital e alíquotas foram retiradas a cada 24 horas, até o tempo reacional máximo de 120 horas (**Figura 40**).



**Figura 40-** Esquema das reações de redução da zerumbona utilizando a polpa e a casca do tucumã.

Na reação de redução da zerumbona com a casca e a polpa de tucumã não foi obtido o produto desejado, constatou-se a formação de vários sub-produtos. Além do tucumã a zerumbona foi submetida a redução com outros vegetais, tais como: cenoura (*Daucus carota*), cará roxo (*Dioscorea alata*), cará branco (*Dioscorea bulbifera*) e batata (*Solanum tuberosum*), assim como na biorredução com o tucumã constatou-se apenas a formação de vários sub-produtos sem a observação da formação do álcool zerumbol.

A zerumbona é um sesquiterpeno extraído dos óleos essenciais do *Zingiber zerumbet* conhecido como gengibre selvagem amargo, é uma substância de alto poder terapêutico, possui atividade antiinflamatória, antifúngica, antioxidante e atualmente este composto é recomendado para o tratamento do câncer e HIV, (KOSHIMIZU et al., 1988). Alguns estudos da biotransformação da zerumbona já foram realizados na literatura, porém nenhum estudo realizou a redução enantiosseletiva desta molécula.

Sakamaki e colaboradores (2008) realizaram a biotransformação da zerumbona com células vegetais, através de uma suspensão de cultura de células de *Caragana chamlagu* (Leguminosa), converteu a zerumbona em um epóxido intermediário. Nestes resultados, a epoxidação pelas células de *C. chamlagu* não foi estereoseletiva, entretanto a redução assimétrica do epóxido zerumbona por cultura de células de *C. chamlagu* foi altamente seletiva (SAKAMAKI et al., 2008)

No presente trabalho a redução enantiosseletiva da zerumbona não ocorreu com nenhum dos biocatalisadores alternativos testados, o aparecimento de subprodutos devem ser investigados através do isolamento e identificação da estrutura química.

Como uma estratégia para obtenção do álcool zerumbol enantioméricamente puro foi realizado testes para a resolução do zerumbol racêmico com a lipase de *Candida antarctica* conhecida comercialmente como Novozyme 435.

## **4.5 Resolução enzimática**

### **4.5.1 Resolução do zerumbol racêmico por lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435)**

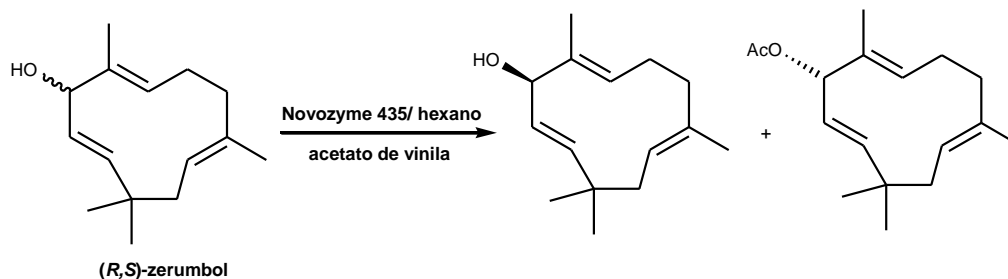
A lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) é uma lipase muito versátil. A CAL-B conhecida comercialmente como Novozyme 435 é uma enzima comercial que tem um custo muito alto, ou seja, 25 g dessa enzima custa aproximadamente R\$ 760,00 reais, porém é uma enzima que tem uma excelente eficiência catalítica e ainda pode ser reutilizada por filtração simples, já que sua apresentação comercial é sob a forma imobilizada (NOVOZYMES, 2010).

Esta lipase tem sido apresentada em numerosas publicações para serem empregadas em sínteses regio e enantiosseletiva (TENG et al., 2009).

Raminelli e colaboradores (2004) utilizaram a CAL-B com acetato de vinila para resolver álcoois secundários e tiveram bons resultados. A CAL-B também tem sido muito utilizada para acilar uma variedade de substratos, incluindo várias classes de produtos naturais (OOSTERON et al., DANIELI et al., 1996)

Teng e colaboradores (2009) utilizaram a CAL-B e o agente acilante acetato de vinila para resolver o 3-O-angeloylingenol um terpeno, isolado da *Euphorbia antiquorum* e *Euphorbia peplus*, este composto apresenta um grande agente quimioterapeutico para o tratamento do câncer de pele, após a resolução o composto aumentou a sua potência como agente anti-câncer.

Neste trabalho, foi estudado a resolução enzimática do álcool racêmico zerumbol, obtido pela redução da zerumbona com borohidreto de sódio, utilizando a lipase B de *Candida antarctica* para catalisar a transesterificação do agente acilante, acetato de vinila em hexano como solvente. As reações foram mantidas sob agitação, num agitador orbital a 150 rpm, termostatzado a 33°C durante 72 horas de reação (**Figura 41**).



**Figura 41** - Esquema da reação de resolução do zerumbol racêmico utilizando lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435).

Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados e foram analisadas por CG-quiral e os resultados podem ser observados na **tabela 10**.

**Tabela 10-** Resultados obtidos da resolução do zerumbol racêmico.

<b>Tempo Reacional (h)</b>	<b>ee<sub>s</sub><sup>a</sup> (%)</b>	<b>ee<sub>p</sub><sup>a</sup> (%)</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b>E<sup>b</sup></b>
1	34	>99	25	0.99
20	>99	>99	50	>200
36	>99	>99	50	>200
72	>99	>99	50	>200

Solvente: hexano 33°C. Agente acilante: acetato de vinila. a) determinado por CG-quiral. b) determinado pelas equações 3 e 4.

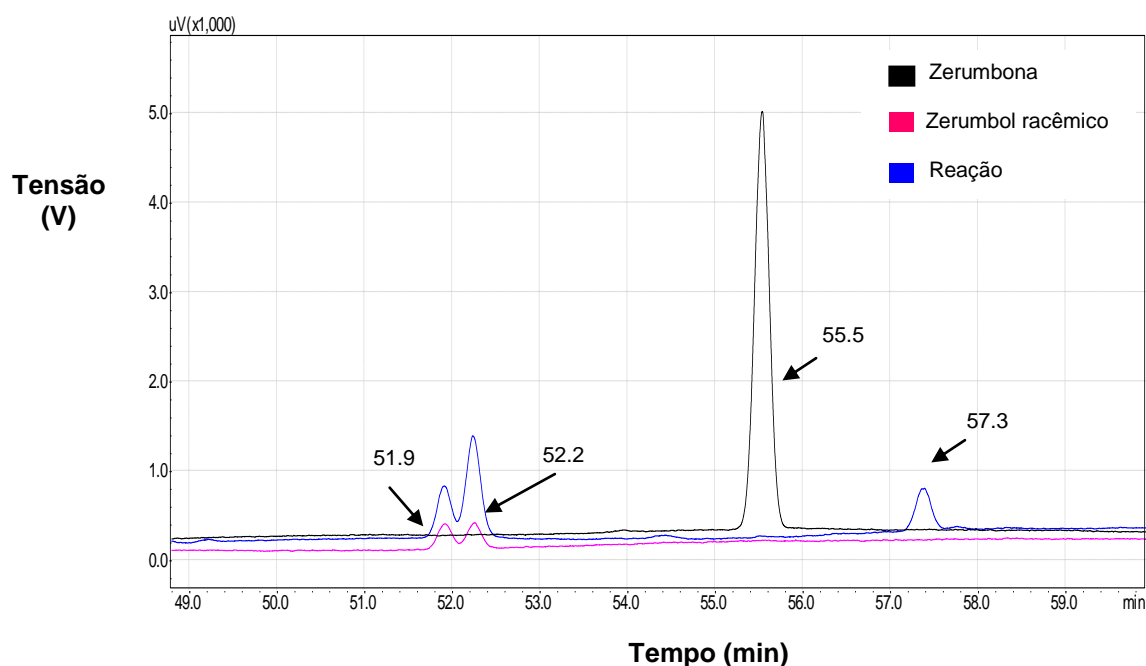
Em 1 hora de reação já pode-se verificar a formação do produto da reação. Em 20 horas de reação os excessos enantioméricos do substrato (álcool puro) e do produto (acetilado) foram elevados, a porcentagem de conversão do álcool e do acetato foi de 50% cada um totalizando >99% e a razão enantiomérica excelente.

Um valor elevado de razão enantiomérica (*E*) para um par de “enzima-substrato” é essencial para o sucesso de uma resolução cinética, já que isto assegura não apenas um excesso enantiomérico, mas também um rendimento proporcionalmente alto. Um valor de **E** abaixo de 10 para qualquer biotransformação torna um processo enantiosseletivo inviável. Por outro lado, este pode ser considerado bom se apresentar entre 10 e 30 e, acima disto, é considerado excelente (CHEN et al., 1982; FABER, 1997).

Kitayama et al. (2002) utilizaram 15 lipases para catalisar a transesterificação do álcool racêmico zerumbol obtido através da redução via química com hidreto de alumínio lítio (LiAlH<sub>4</sub>). O melhor resultado foi com a lipase de *Pseudomonas fluorescense*, denominada Amano AK, e como agente acilante o acetato de isopropenil em THF, obteve após um tempo reacional de 12 dias um valor de razão enantiomérica de 56 (*E*).

Neste trabalho, o álcool opticamente ativo zerumbol e o acetato zerumbil foram obtidos a partir da reação de transesterificação catalisada por lipase B de *Candida antarctica*, obtendo elevados excessos enantioméricos >99% e razão enantiomérica >200.

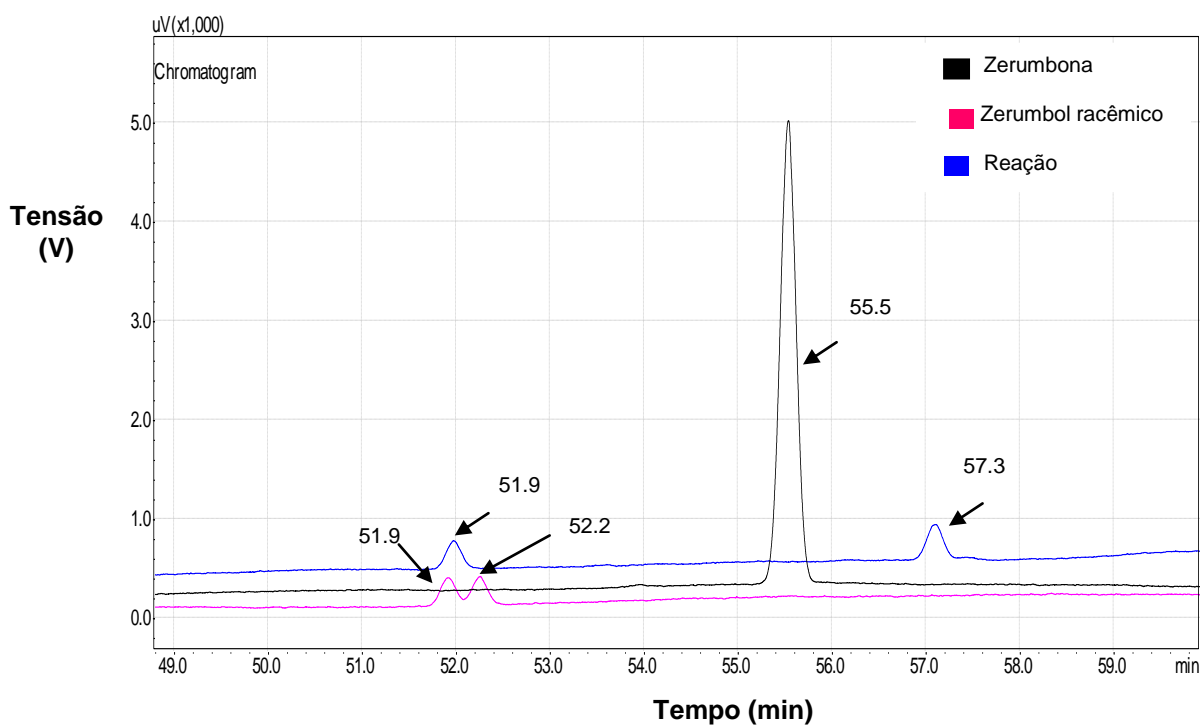
A **figura 42** pode-se observar o cromatograma obtido da alíquota de apenas 1 hora de reação, observa-se o início da resolução enzimática do zerumbol racêmico.



**Figura 42-** Sobreposição de cromatogramas: do substrato zerumbona, o álcool racêmico obtido por redução via química e da alíquota de 1 hora da reação de resolução utilizando Novozyme 435. Em 51,9 e 52,2 min: zerumbol racêmico; 55,5 min zerumbona; 57,3 min acetato da biotransformação.

Pode-se observar no tempo de retenção de 57.3 min a presença da formação provavelmente do produto acetilado, denominado acetato zerumbil na literatura, conforme já foi relatado por Kitayama e colaboradores (KITAYAMA et al., 2002).

Na **Figura 43** pode-se observar que após 20 horas de reação, no tempo de retenção de 51.9, apenas um dos enantiômeros do álcool zerumbol manteve-se presente, enquanto o outro enantiômero foi totalmente consumido para a reação de transesterificação, observa-se portanto que este sistema reacional, utilizando a lipase de *Candida antarctica*, foi eficiente para a resolução do zerumbol racêmico.



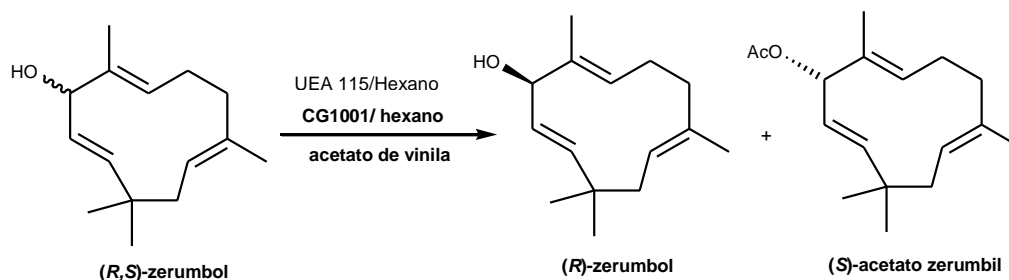
**Figura 43-** Sobreposição de cromatogramas: a substância inicial a zerumbona, o álcool racêmico obtido por redução via química e a alíquota de 20 horas da reação de resolução utilizando Novozyme 435. Em 51,9 e 52,2 min: zerumbol racêmico; 51,9 min: zerumbol da biotransformação; 55,5 min zerumbona; 57,3 min acetato da biotransformação.

Possivelmente o álcool resolvido seja o *R*, segundo estudos de Kitayama e colaboradores (2002) provavelmente o primeiro enantiômero formado seja o *R*, para a confirmação deste resultado deve-se realizar o experimento em maior escala isolar o álcool, purificar e caracterizar a configuração absoluta do enantiômero através do aparelho polarímetro.

#### 4.5.2 Resolução enzimática do zerumbol racêmico por micélios de fungos da Amazônia

As cepas fúngicas UEA\_115 e CG10\_01 também foram testadas para resolução do álcool racêmico zerumbol. Em um frasco foi adicionado o substrato racêmico dissolvido em hexano, o micélio fúngico seco e o agente acilante, a reação

foi colocado imediatamente sob agitação num agitador orbital em 150 rpm a 33°C a durante 12 dias.



**Figura 44** – Esquema da reação de resolução do zerumbol racêmico utilizando cepas fúngicas endofíticas: UEA\_115 e CG10\_01.

Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados e verificou-se com os resultados obtidos foi formação de vários sub-produtos, não apresentando a resolução do álcool zerumbol.

Os resultados experimentais podem ter sido influenciados pelo óleo de girassol remanescente do meio de cultivo indutor dos micélios testados. Outros testes devem ser realizados para a resolução do álcool com outras cepas fúngicas, e com modificações para obtenção dos micélios sem a contaminação do meio de cultura indutor, para produção de lipases. É de extrema relevância encontrar cepas produtoras de lipases que realizem a reação de resolução da zerumbona eficientemente, já que a enzima comercial tem um alto custo.



## 5. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

Os álcoois racêmicos obtidos na reação via química utilizando  $\text{NaBH}_4$  tiveram bons rendimentos acima de 72%, exceto o 3-hidroxi-butanoato de etila que foi obtido com rendimento de 20%.

A *p*-nitroacetofenona foi reduzida eficientemente pelas cepas fúngicas CF02\_03 e a cepa CF03\_05 obtendo-se %c de 87 e 61 respectivamente. Sendo observado também um excelente ee 97% e >99% com distintas enantiosseletividades para cada uma das cepas. Faz-se necessário a identificação da configuração absoluta para cada um dos enantiômeros formados.

Na reação de redução do acetoacetato de etila por fungos endofíticos, não foi observado a formação do álcool 3-hidroxi-butanoato de etila. No entanto, observou-se a formação de um único produto com 60% de conversão que deve ser identificado.

O álcool 3-hidroxi-butanoato de etila foi obtido com o biocatalisador **FP**, e com as linhagens industriais **PE-2** e **CAT-1**, sendo que com a cepa **PE-2** obteve-se os melhores resultados em 24 horas de reação, onde a porcentagem de conversão foi de 54% e o ee >99.

A  $\alpha$ -cloroacetofenona foi reduzida eficientemente pelas cepas fúngicas CG05\_04 e a cepa CF03\_04 obtendo-se bons resultados de %c (19 e 26) e %ee (60 e 62) respectivamente.

A casca e a polpa do tucumã utilizada na reação de redução enantiosseletiva da *p*-nitroacetofenona, apresentaram bons resultados (86% e 74%) de porcentagem de conversão tanto para a casca quanto para a polpa, no entanto a casca, por ser um resíduo, tem um valor a ser empregada em reações de redução de cetonas.

A redução enantiosseletiva da zerumbona não ocorreu quando utilizou-se fungos endofíticos, fermento de pão e tucumã. Entretanto, realizou-se a resolução do zerumbol racêmico com a enzima Novozyme 435 lipase B de *Candida antarctica*. O zerumbol racêmico foi eficientemente resolvido pela enzima comercial obtendo-se boa conversão (50%), altos excessos enantioméricos (>99% e >99%) e excelente razão enantiomérica (>200).

De modo geral, obtiveram-se resultados bastante promissores com biocatalisadores alternativos para redução enantiosseletiva de cetonas, com elevado excesso enantiomérico e porcentagem de conversão. Um resultado que se destacou foi a seletividade de duas cepas fúngicas onde os enantiômeros foram formados distintamente com cada uma das cepas. Com este resultado pode-se visualizar a prospecção de diferentes biocatalisadores com enantiosseletividades distintas para uma mesma reação.

## 6. Perspectivas

A partir dos resultados obtidos têm-se como perspectivas:

Fazer testes de atividade enzimáticas com os fungos endofíticos que obtiveram os melhores resultados.

Identificar o produto obtido da redução do acetoacetato de etila com os fungos endofíticos.

Utilizar outras cetonas para testar a eficiência nas reações de redução enantiosseletiva com a casca do tucumã

Realizar reações de redução com os fungos CF02\_03 e CF03\_05 para verificar se a enantiosseletiva é mantida por outros substratos e identificar os enantiômeros obtidos para a reação da *p*-nitroacetofenona.

Isolar, caracterizar e determinar a configuração absoluta dos compostos obtidos nas diferentes biotransformações realizadas.

Publicar os resultados obtidos em revistas indexadas da área

## 7. REFERÊNCIAS

AITKEN, R.A.; KILÉNYI, S.N. **Asymmetric Synthesis**. London: Blackie Academic & Professional, 1992. p. 1-63.

ALBUQUERQUE, P.M.; WITT, M.A.; STAMBUK, B.U.; NASCIMENTO, M.G. Influence of sugars on enantioselective reduction using *Saccharomyces cerevisiae* in organic solvent. **Process Biochemistry**, v. 42, p.141-14, 2007.

ATLAS, R.M. **Principles of Microbiology**. 2<sup>a</sup> ed Boston: McGraw- Hill, p.1035-1045, 1996.

ATWALE, V.; MANJREKAR, N.; ATAWALE M. Lipase-catalysed synthesis of geranyl methacrylate by transesterification: study of reaction parameters. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 4797- 4800, 2002.

BALDASSARRE, F.; BERTONI, G.; CHIAPPE, C.; MARIONI, F. Preparative synthesis de alcohols chiral. **Journal Molecular Catalysis**. v. 11, p.55-58, 2000.

BARE, G.; JAQUES, P.H.; HUBERT, J.B.; RIKIR, R.; THONART, P.H. Bioconversion of a L – carnitin precursor in a one–or two phase system. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.28, p. 445 - 456, 1991.

DANIELI, B.;BERTARIO, A.;CARREA G.;REDIGOLO, B.; SECUNDO F.; RIVA S. **Helvetica Chimica Acta**. Chemo-enzymatic Synthesis of 6"-O-(3-Arylprop-2-enoyl) Derivatives of the Flavonol Glucoside Isoquercitrin, v.76, p. 2981–2991,1993.

BOM, E.P.S.; PEREIRA JUNIOR, N. Biocatalisadores. In: BOM, E.P.S.; PEREIRA JUNIOR, N. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional. 1999.113p.

BONNEAU, P.R.; MARTIN, R.; LEE, T.; SAKOWICZ, R.; MARTICHONOK, V.; HOGAN J. K.; GOLD, M.; JONES, J. Enzymes in Organic Synthesis. Present and Future. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.7, p. 357, 1996.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; TALLARICO, M.; PUPO, P.; BONATO, S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thiridazine. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 77,p.669–674, 2007.

BRENELLI, E. C. S. **Redução de alguns compostos carbonílicos derivados de fenil cetonas empregando-se fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*)**. 1994, 173f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

BROWN, H.C.; PARK, W.S.; CHO, B.T; RAMACHADRAN, P.V. Selective reductions. 40. A critical examination of the relative effectiveness of various reducing

agents for the asymmetric reduction of different classes of ketones. **Journal Organic Chemistry**. v.52, p. 54-56, 1987.

SOLOMONS, T.W.G; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 8<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: RJ, 2005. 715p.

CALVACANTE, P. B.: **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 6<sup>a</sup> Ed. Edições Cejup - Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 1996.

CARVALHO, P.O; CALAFATTI, S.A; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; CONTENSINI, F.J. ; BIZACO, R. Potencial de Biocatálise Enantiosseletiva de lípases microbianas. **Química Nova**, v.28, p.1614-1621, 2005.

CHARTRAIN, M.; GREASHAM, R.; MOORE, J.; REIDER, P.; ROBINSON, D.; BUCKLAND, B. Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals. **Journal Molecular Catalytic**. v. 11, p. 503- 512, 2001.

CHEN, C.S.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIR, C.J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. **Journal American Chemical Society**. v. 104, p.7294-7299, 1984.

COLLEN, G. **Isolamento de fungos filamentosos produtores de lípase faculdade de farmácia da UFMG**. 2006. 206f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal de Belo Horizonte, Belo Horizonte.

COMASSETO, J.V.; ANDRADE, L.H.;OMORI, A.T.;ASSIS, L.F.;PORTO A.L.M. Deracemization of aryl ethanolols and reduction of acetophenones by whole fungal cells of *Aspergillus terreus* CCT 4083, *Aspergillus terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT4964. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.29, p.55-61, 2009.

CORDELL, G.A.; LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; MATTOS, M.C. Vegetables as Chemical Reagents. **Journal Natural Products**. v.70, p.478-492, 2007.

COREY, E. J.; BAKSHI, R. K.; SHIBATA, S. Highly enantioselective borane reduction of ketones catalyzed by chiral oxazaborolidines. Mechanism and synthetic implications. **Journal American Chemistry Society**. v.109, p.5551-5555, 1987.

COREY, E.J.; BAKSHI R.K... A new system for catalytic enantioselective reduction of achiral ketones to chiral alcohols. Synthesis of chiral  $\alpha$ -hydroxy acids. **Tetrahedron Letters**. v.31, p. 611- 614, 1990.

COREY, E.J.; HELAL, C.J. Reduction of Carbonyl Compounds with Chiral Oxazaborolidine Catalysts: A New Paradigm for Enantioselective Catalysis and a Powerful New Synthetic Method. **Angewandte Chemie International Edition in English**. v.91, p.1986-2012, 1998.

COREY, E.J.; LINK, J.O. A new chiral catalyst for the enantioselective synthesis of secondary alcohols and deuterated primary alcohols by carbonyl reduction. **Tetrahedron Letters**. v.30, p.6275- , 1989.

CZUK, R.; GLANZER, B.I. Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry. **Chemical Reviews**, 91, 49, 1991.

DE CONTI, R.; RODRIGUES, R.J.A.; MORAN, S.J.P. Biocatálise: Avanços recentes. **Química Nova**, v. 24, p. 672- 675, 2001.

DEHYDROGENASE.ORG. Atualizada em 2009 Mar 20 [Acesso em: 20 mar de 2009] Disponível em: <<http://dehydrogenase.org>>.

DERMIJIAN, D.S.; SHAH, P.C.; MORÍS, A.; VARAS, F. Screening for novel enzymes In: FRESSNER, W.D. **Biocatalysis from Discovery to Application**. Berlin: Springer. 2000. 197p.

DONG Y.; YANG Q.; JIA S., QIAO C. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae* cells, **Biochemistry Engineer Journal**, v.37, p.226–230, 2007.

ELIEL, E.L; WILEN, S.H.; MANDER, L.N. Stereochemistry of Organic Compounds. **John Wiley & Sons Inc**. v. 56, p.96-99, 1994.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3<sup>a</sup> ed. Berlin: Springer Verlag. 1997. 402p.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 5 ed. Berlin: Springer-Verlag. 2007. 402 p.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: a text book**. 5<sup>a</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 2004. 402p.

FABER, K.; PATEL, R. Chemical biotechnology a happy marriage between chemistry and biotechnonology; asymmetric synthesis via green chemistry. **Current Opinions Biotechnlology**, v.11, p. 517-519, 2000.

FRÁTER, G. Über die Stereospezifität der  $\alpha$ -Alkylierung von  $\beta$ -Hydroxycarbonsäureestern. Vorläufige Mitteilung. **Helvetica Chimica Acta**. v. 62, p. 2825-2828, 1979.

FONSECA, A. M.; MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; CORDELL, G. A.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS,L. Coconut water (*Cocos nucifera* L.) A new biocatalyst system for organic synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.57, p.78-82, 2009.

GARRET, R.H.; GRISHAM, C.M. Biochemistry. **College Publishing**, v. 4, p.11-16, 1995.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v.63, p.1721-1764, 2007.

GOLDBERG, K.; SCHOER, K.; LUTZ, S. Biocatalytic ketone reduction – a powerful tool for the production of chiral alcohols – part I: process with isolated enzymes. **Applied Microbiol Biotechnology**, v.76, p.237- 248, 2007.

GOTOR-FERNANDEZ, V.; BRIEVA, R.V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal Molecular Catalysis**, v.40, p.111-120, 2006.

GOULD, J. B. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. John Wiley and sons: New York. 1975. 176p.

GUNSTONE, F.D. Enzymes as Biocatalysis in the modification of natural lipids. **Journal Science Food Agriculture**, v.79, p.1535-1549, 1999.

HANSON, J.R. The microbiological transformation of diterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 9, p.139- 151,1992.

HERCULES, V. F. **Resolução enzimática de alcoóis racêmicos com lípase de *Candida antarctica* e redução de cetonas com fungos de origem marinha**. 2008. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade de São Paulo, São Paulo.

HOMANN, M.J.; VAIL, R.; MORGAN, B.; SABESAN, V.; LEVY, C.; DODDS, D.R.; ZACKS, A. Enzymatic Hydrolysis of a Prochiral 3-Substituted Glutarate Ester, an Intermediate in the Synthesis of an NK<sub>1</sub>-NK<sub>2</sub> Dual Antagonist. **Advanced Synthesis Catalytic**, v.343, p.744-749, 2001.

ISHIGE, T.H.K.; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. **Current Opinion Chemistry Biology**, v. 9, p. 174-180, 2005.

JOHANSON, T.; KATZ, M.; GORWA; GRAUSLUND, M. F. Strain engineering for stereoselective bioreduction of dicarbonyl compounds by yeast reductases. **FEMS Yeast Reserve**, v. 5, p.513-525, 2005.

JONES, J.B. **Comprehensive Organic Synthesis Selectivity**. Pergamon Press: Oxford, 1991. 183p.

JONES, R. P. PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts the effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, v.16, p.42-49,1981.

KAGAN, H.B. **Comprehensive Organometallic Chemistry Wilkinson**. Pergamon Press: London, 1982. 198p.

KATZ, M.; FREJD, T.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Efficient anaerobic whole cell stereoselective bioreduction with recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Bioengineer**, v. 84, p.573-582, 2003.

KITAYAMA, T.; NAGAO, R.; MASUDA, T.; HILL, R.K.; MORITA, M.; TAKATANI, M.; SAWADA, S.; OKAMOTO, T. The chemistry of Zerumbone IV Asymmetric synthesis of Zerumbol. **Journal Molecular Catalytic**, v. 17, p. 75-79, 2002.

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

KRAMER, A.; PFANDER, H. C<sub>45</sub>- and C<sub>50</sub>-Carotinoide. 1. Mitteilung. Synthese von (**R**)- and (**S**)-Lavandulol. **Helvetica Chimica Acta**. v. 65, p-293-301, 1982.

KREUTZ, O. C. **Síntese de  $\alpha$ -oxo- $\alpha$ -metiloximas e redução enantiosseletiva com fermento de pão. Obtenção de intermediários para a preparação de 1,2-Aminoálcoois quirais**. 1999. 232f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advance*. v.20, p.239-267, 2002.

KOELLER, K. M.; WONG, C. H. "Enzymes for chemical synthesis". **Nature**. v.409, p.232-240, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. Enzimas. In: LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Savier: São Paulo, 2002. 975p.

LEÓN R.; FERNANDES P.; PINHEIRO H.M; CABRAL J.M.S. Whole-cell biocatalysis in organic media, **Enzyme Microbiological Technology**, v. 23, p.483-500, 1998.

LEONARD, V.; LAMARE, S.; LEGOY, M.D.; GRABER, M.J.M. Enantioselective acylation of R-2-pentanol in a solid/gas reactor catalysed by lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v, p.53-59, 2004.

LUO Y., M. LI W., WANG W. Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?. **Environmental and Experience Botany**, v. 63, p.378-384, 2008.

MACHADO, L. L.; MONTE, F.J.; OLIVEIRA, M.C.F.; MATTOS, M.C.; LEMOS, T.L.G.; FERNANDEZ, V.G. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.54, p.130-133, 2008.

MALGORZATA, Z.; PLENKIENWICZ, J. Enantioselective reduction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones by *Geotrichum candidum*, *Mortierella isabellina* and *Rhodotorula rubra* yeast. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.17, p.1958-1962, 2006.

MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.20, p.513-557, 2009.

MIDLAND, M.M. Asymmetric reductions organoborane reagents. **Chemical Reviews**, v.89, p.1553-1561, 1989.

MONTALBETTI, A.A.G.N.; FALQUE, V. Amide Bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, p. 10827-10852, 2005.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes & Solventes**. 2ª ed. São Paulo: Edgar Blücher Ltda, 1995. 630p.

NAKAMURA, K.; USHIO, K.; OKA, S.; OHNO, A. Stereochemical control in yeast reduction. **Tetrahedron Letters**, v.25, p.3979-3982, 1984.

NASCIMENTO, M.G.; ZANOTTO, S.P.; MELEGARI, S.P. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. **Química Nova**, v.25, p.567-571, 2002.

NOVOZYMES. Enzimas: lipase. Atualizada em 2010 jun 29 [Acesso em 2010 jun 29]. Disponível em: <<http://www.novozymes.com.br>>.

NOYORI, R. **Asymmetric Synthesis of Natural Products**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 605p.

OKADA, T.; MORRISSEY, M.T. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis. **Food Chemistry**, v.103, p.1411-. 2007.

OOSTEROM, M.W.V; RANTWIJK, F.V.; SHELDON, R.A. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. **Biotechnology Bioengineering**, v.49, p. 328-333, 1996.

PATROCÍNIO, A.F. **Acilsilanos e biorredução: Uma alternativa biológica para síntese  $\alpha$ -hidroxi-silanos opticamente ativos mediada por *Saccharomces cerevisiae***. 1999. 244f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

PEREIRA, R.S. **Fermento Biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) aspectos bioquímicos e biológicos e a influência deles em síntese orgânica assimétrica**. 1995. 137f. Tese de (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

PEDRINI, P.; GIOVANNI, P.P.; MANTOVANIA, M.; ANDREOTTI, E.; COLALONGO, C. Reduction screening with endophytic fungi: Synthesis of homochiral secondary alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 145-150, 2009.

PETERS, S.; DAMMEYER, B.; SCHULZ, B. Endophyte-host interactions I. Plant defense reactions to endophytic and pathogenic fungi. **Symbiosis**. v.25, p.193-211, 1998.

QMCWEB. Drogas quirais a esteroquímica dos fármacos. Florianópolis: UFSC; Atualizada em 2010 Out 9 [acesso em 2010 jul 18] Disponível em: <[www.qmc.ufsc.br/qmcweb/.../drogas\\_quirais.html](http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/.../drogas_quirais.html)>.



QUEZADA, M.A.; CARBALLEIRA, J.D.; SINISTERRA, J.V. Monascus kaoliang CBS 302.78 immobilized in polyurethane foam using iso-propanol as co-substrate: Optimized immobilization conditions of a fungus as biocatalyst for the reduction of ketones. **Bioresource Technology**. v.100, p. 2018-2025, 2009.

RAMINELLI, C.; COMASSETO, J.V.; ANDRADE, L.H.; PORTO, A.L.M. Kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Candida antarctica* lipase (Novozyme 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v.15, p. 3117– 3122, 2004.

REDMAN, R.; FREEMAN, S.; CLIFTON, D.R.; MORREL, J.; BROWN, G.; RODRIGUEZ, R.J. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. **Plant Physiology**, v.119, p.795-804, 1999.

RIVILLA, C.P.; CAFÊU, M.C.; CASATEJADA, J.V.; ARAUJO, A.R.; COLLADO, I.J. Asymmetric microbial reduction of ketones: absolute configuration of trans-4-ethyl-1-(1S-hydroxyethyl)cyclohexanol). **Tetrahedron: Asymmetry**, v.20, p.2666-2672, 2007.

ROBERTS, S.M. Biocatalysis for fine Chemicals synthesis. **Wiley: Weinheim**, 1999.

RODRIGUEZ, P.; BARTON, M.; ALDABALDE, V.; ONETTO, S.; PANIZZA, P.; MENENDEZ, B.; GONZALEZ, D. Are endophytic microorganisms involved in the stereoselective reduction of ketones by *Daucus carota* root?. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.49, p.8–11, 2007.

ROMERO, J.R. **Fundamentos de Estereoquímica dos Compostos Orgânicos**. Ribeirão Preto: Holos.1998. 108p.

ROCHA, L.C. **Redução de derivados de acetofenonas com fungos de origem marinha**. 2007. 106f. Dissertação de (Mestrado em Ciências área de concentração em Físico-Química- Universidade de São Paulo, São Carlos.

SAKAI, N.; AGEISHI, S.; ISOBE H.; HAYASHI Y.; YAYAMAMOTO, Y. Lipase promoted asymmetric trans-esterification of 4-alkyl-,3-alkyl- and 3,4 dialkyloxetan-2-ones with ring-opening. **Journal Chemical Society Perkin Trans**, v. 1, p.71–77, 2000.

SAKAMAKI, H.; ITOH K.; KITANAKA, S.; SAWADA, S.; HORIUCHI, C. A. Biotransformation of zerumbone by *Caragana chamlagu*. **Biotechnology Letters**. V. 30, p. 2025-2029, 2008.

SAXENA, R.K.; GHOSH, P.K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**. v. 77, p.101-115, 1999.

SERVI, S. Baker's yeast as a reagent in organic synthesis. **Synthesis**, v.1, p.1–25. 1990.

SHIMADA, Y.; MARUYAMA, K.; OKAZAKI, S.; NAKAMURA, M.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum candidum* lipase. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.71, p.951-1994.

SHIMIZU, S.; KATAOKA, M.; KITA, K. Chiral alcohol synthesis with yeast carbonyl reductases. **Journal Molecular Catalytic**, v.5, p.321-325, 1998.

SILVA, D.F.; EIRAS, A.E.; VASCONCELOS, S.D. Use of attractants for surveing dipteran populations in a rainforest area in northeastern. **International Congress of Entomology**, Book-XXI, I, 2000.

SILVA, V. D. **Biotransformação de compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados mediado por microorganismos**. 2009. 128f. Dissertação de (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

SILVERMAN, R.B. **The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**. San Diego: Academic Press, 2000. 717p.

SOLOMONS, T.W.G; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 8<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: RJ, 2005. 715p.

STEWART, J.D. Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. **Current Opinion in Biotechnology**, v.11, p.363–368, 2000.

TAKKEN, W. **Invertebre Reproduction and development**, v. 36, 1999.

TEMBA E. S.C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI C. L. Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. **Química Nova**. v. 26, p.112-122, 2003.

TENG R.W.; MCMANUS D.; AYLAWARD, J.; OGBOURNE S.; JOHNS J.; PARSONS, P.; BACIC, A. Regioselective acylation of 3-O-angeloylgingerol by *Candida antarctica* Lipase. **Fitoterapia**. v.80, p. 233-236, 2009.

VULFSON, E.N. **Em lipases: Their Structure, Biochemistry and Application**. Cambridge University Press: Great Britain, 1994. 75p.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Concentration of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids of marine oils using *Candida cylindracea* lipase: Optimization of reaction conditions. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v.75, p.1767-1774,1998.

WARD, O.P.; YOUNG, C.S. Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast. **Enzyme MicrobiologyTechnology**, v.12, p.485-493, 1990.

WENDHAUSEN, R. **Estudo Sobre Utilização De *Crisotila* Como Suporte De Células De *Saccharomyces cerevisiae* Para Uso Em Processo Contínuo De Fermentação Alcoólica e Biorreduções**. 1998. 150f. Tese (Doutorado em Química Orgânica)- Universidade de Campinas, São Paulo.

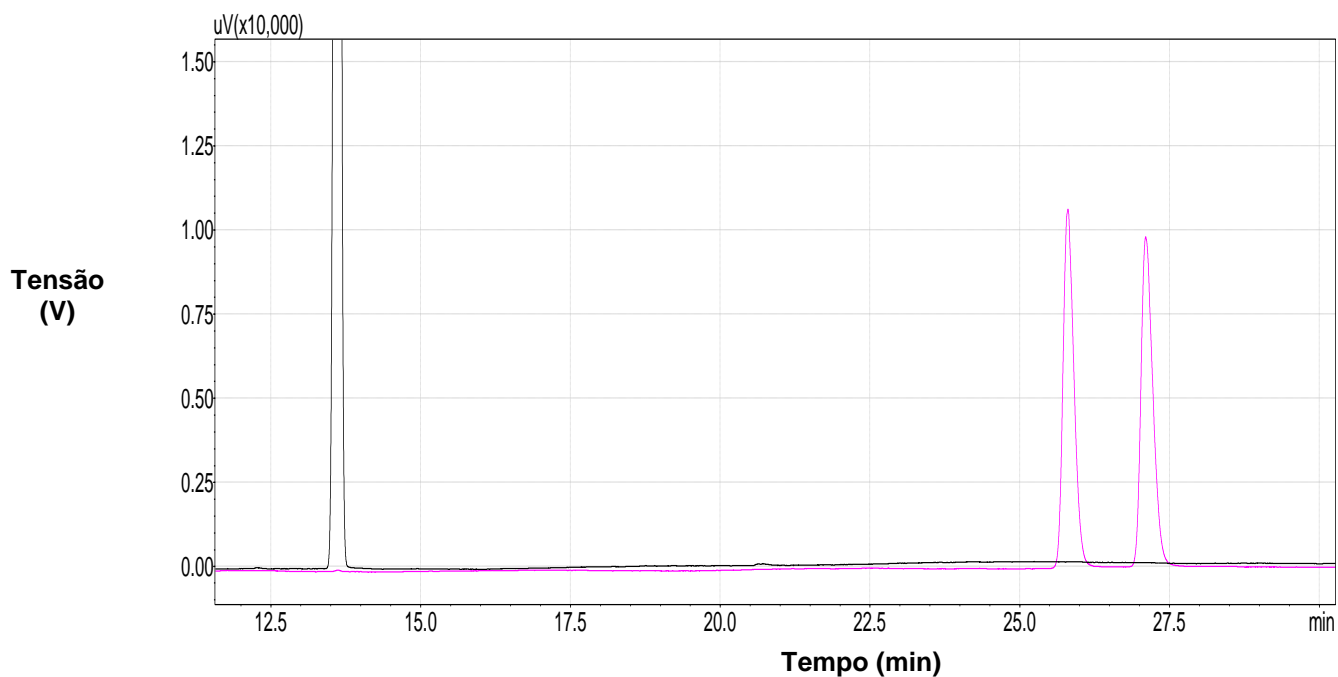
YADAVA, J.S.; NANDA, S.; THIRUPATHI-REDDY, P.; BHASKAR-RAO, A.J. Efficient Enantioselective Reduction of Ketones with *Daucus carota* Root. **Journal Organic Chemistry**. v.67, p.3900–3903, 2002.

ZANOTTO, S.P. **Utilização de Enzimas e Microrganismos para a Obtenção de Compostos Opticamente Ativos**. 2003. 115f. Tese de (Doutorado em Química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

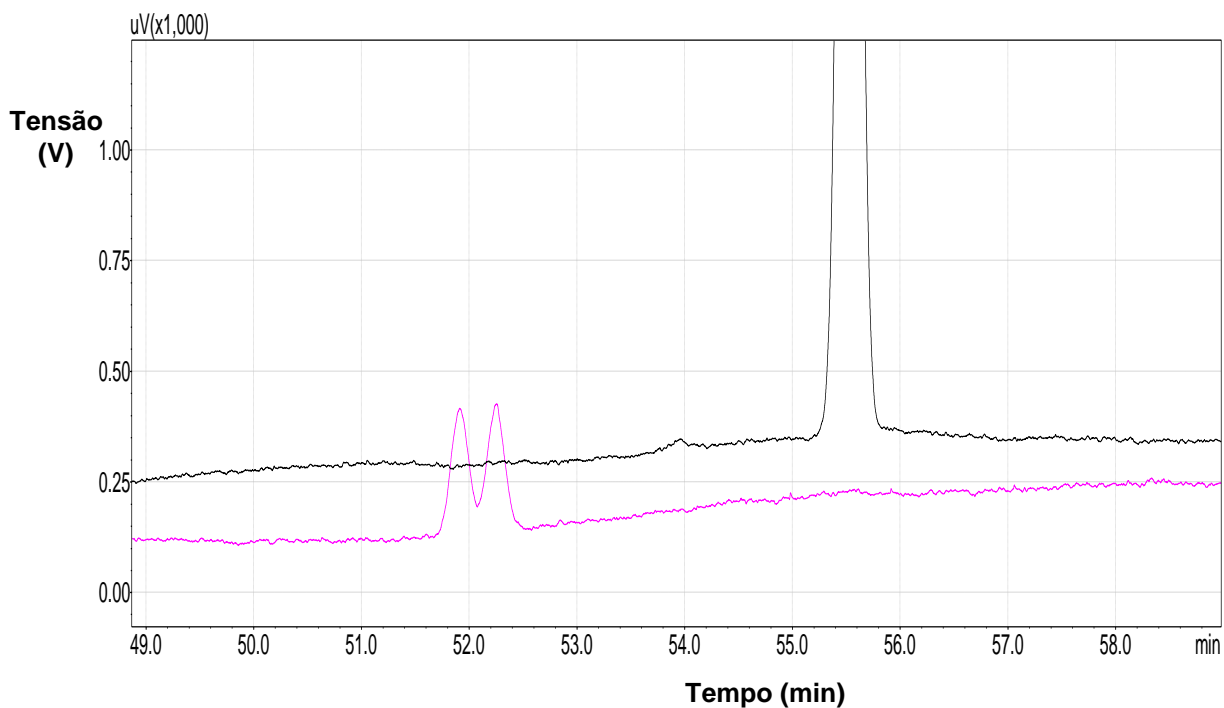
ZANOTTO, S.P.;ROMANO,I.P.;LISBOA,L.U.S.;JÚNIOR, S.D.;MARTINS, M.K.;LIMA, F.A.;SILVA, S. F.;ALBUQUERQUE, P.M. Potential Application in Biocatalysis of Mycelium-Bound Lipases from Amazonian Fungi. **Journal Brazilian Chemistry Society**. v.20, p.1046-1059, 2009.

ZIKMUNDOVA, M.; DRANDAROV, K.; BIGLER, L.; HESSE, M.; WERNER, C. Biotransformation of 2-Benzoxazolinone and 2-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-one by Endophytic Fungi Isolated from *Aphelandra tetragona*. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.4863-4870, 2002.

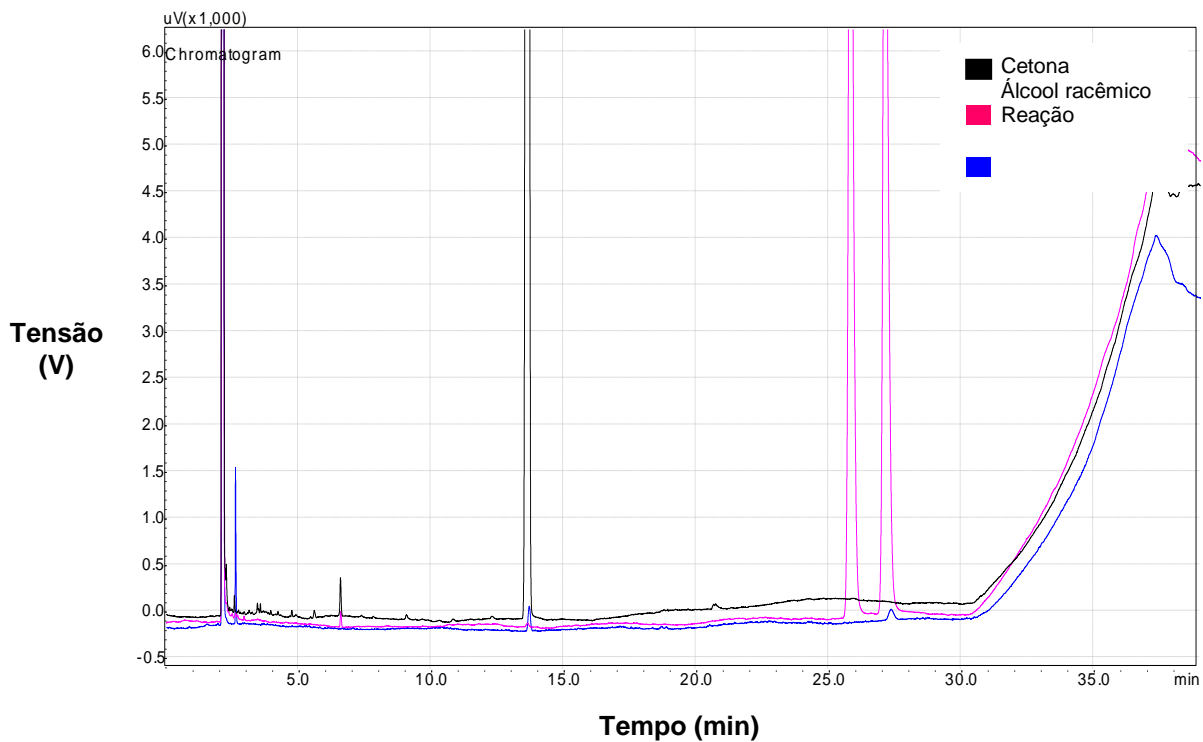
## 8. ANEXO



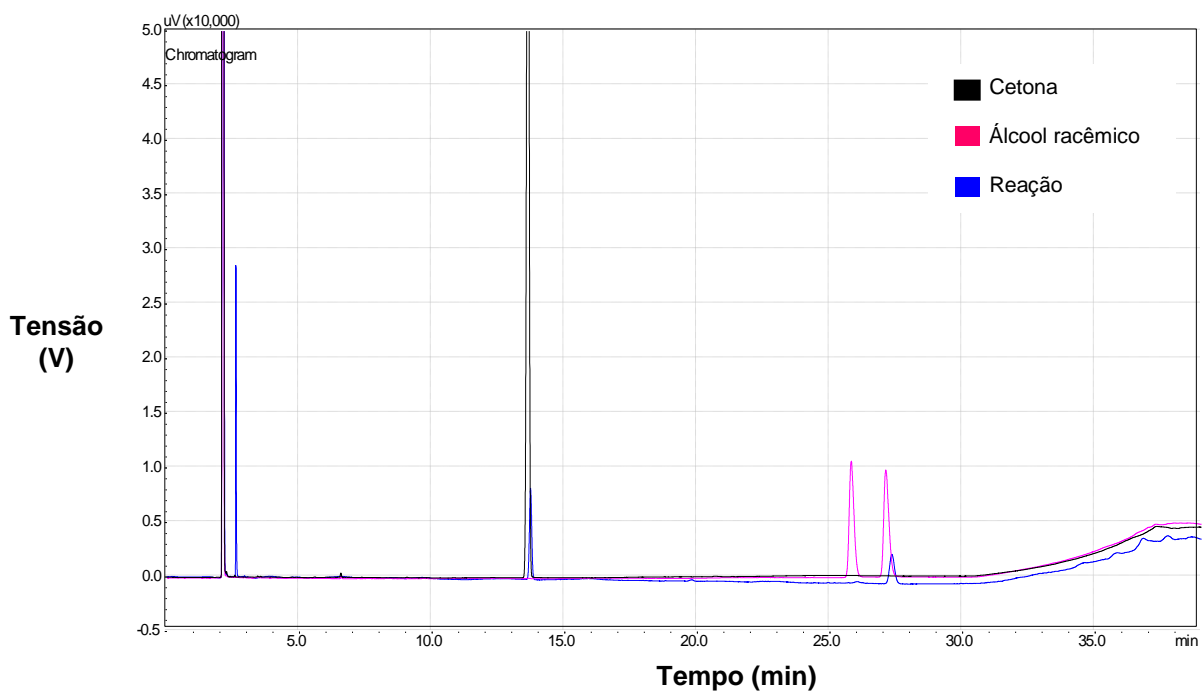
**Figura 45** – Cromatograma de CG-quiral do *p*-nitrofeniletanol racêmico (Conforme as condições descritos na **tabela 4**).



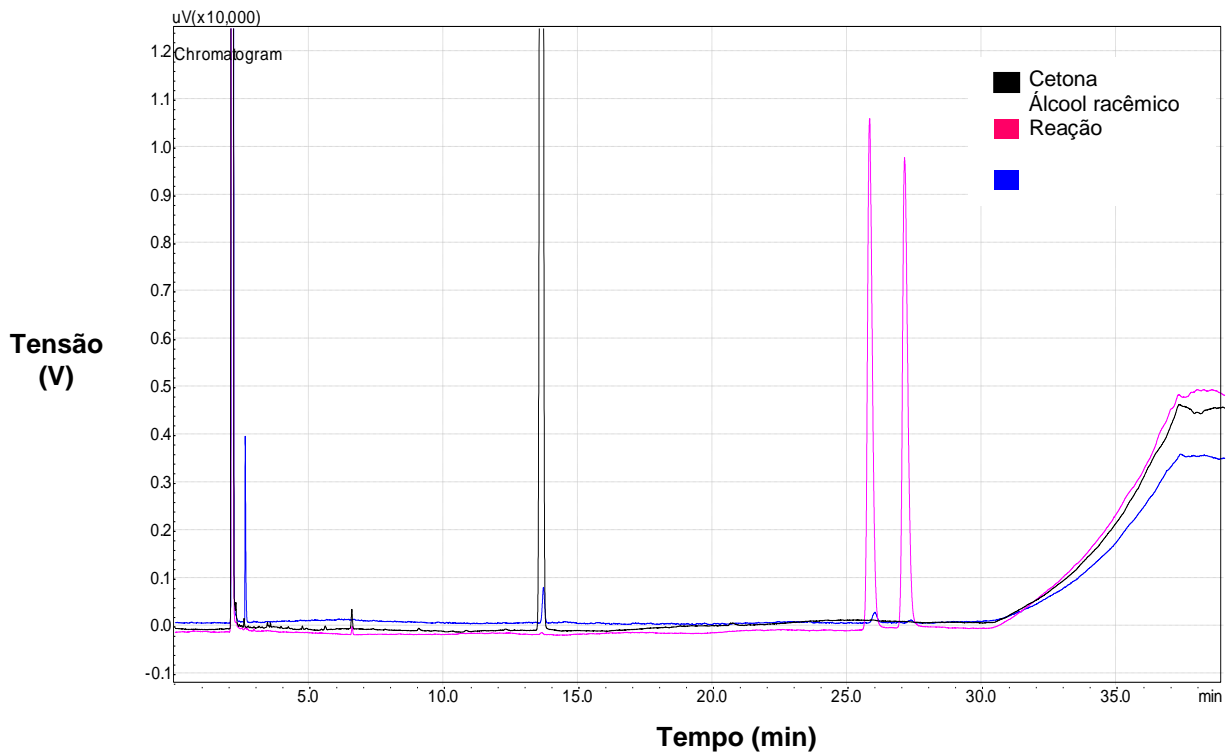
**Figura 46** – Cromatograma de CG-quiral do 2-clorofeniletanol racêmico (Conforme as condições descritos na **tabela 4**).



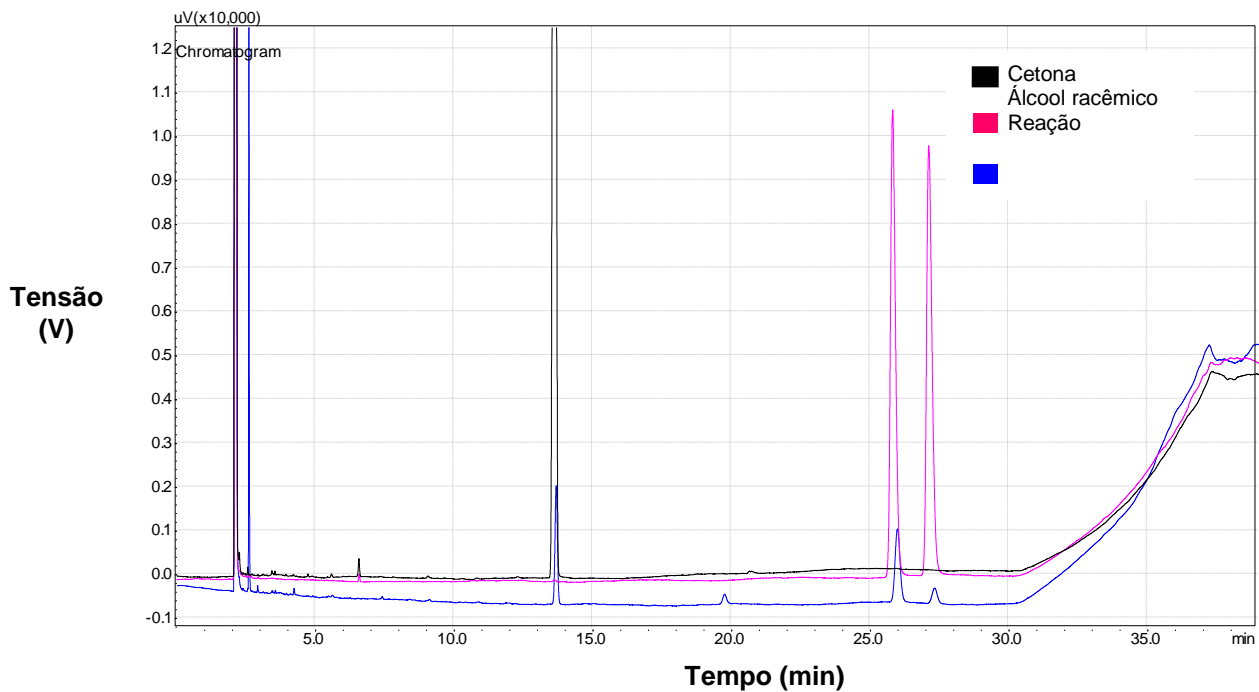
**Figura 47** – Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial *p*-nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 48 horas de reação utilizando fungo CF03\_05.



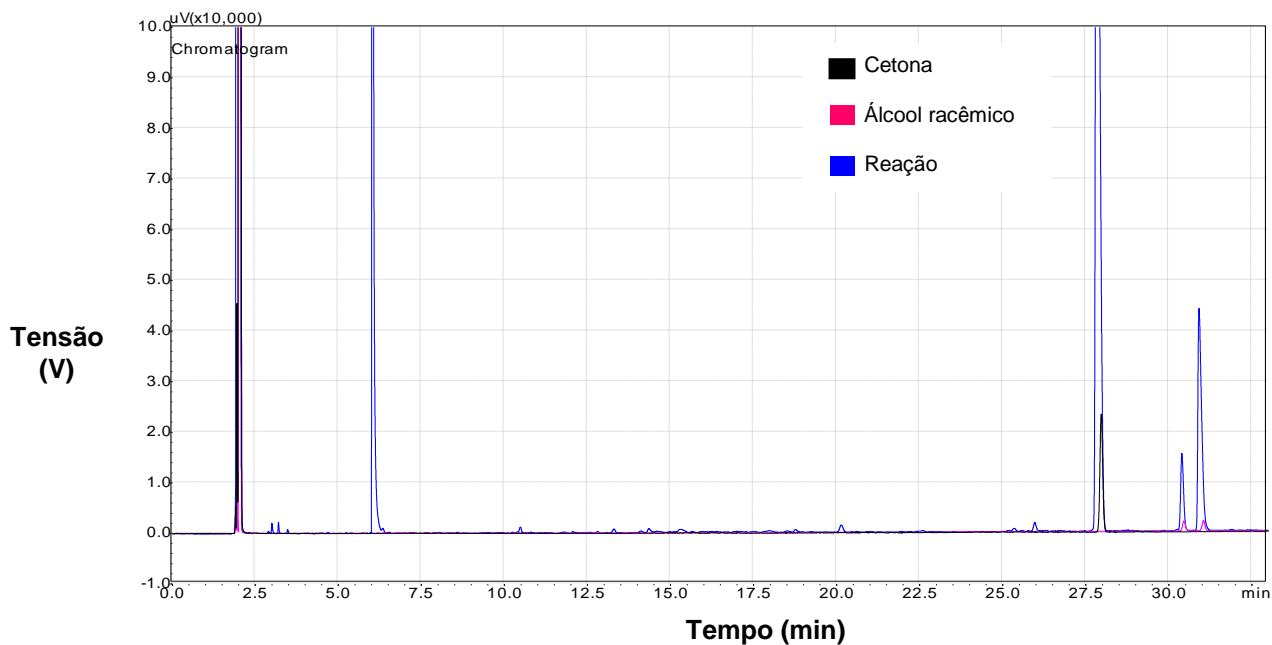
**Figura 48** – Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial *p*-nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 24 horas de reação utilizando fungo CF03\_05.



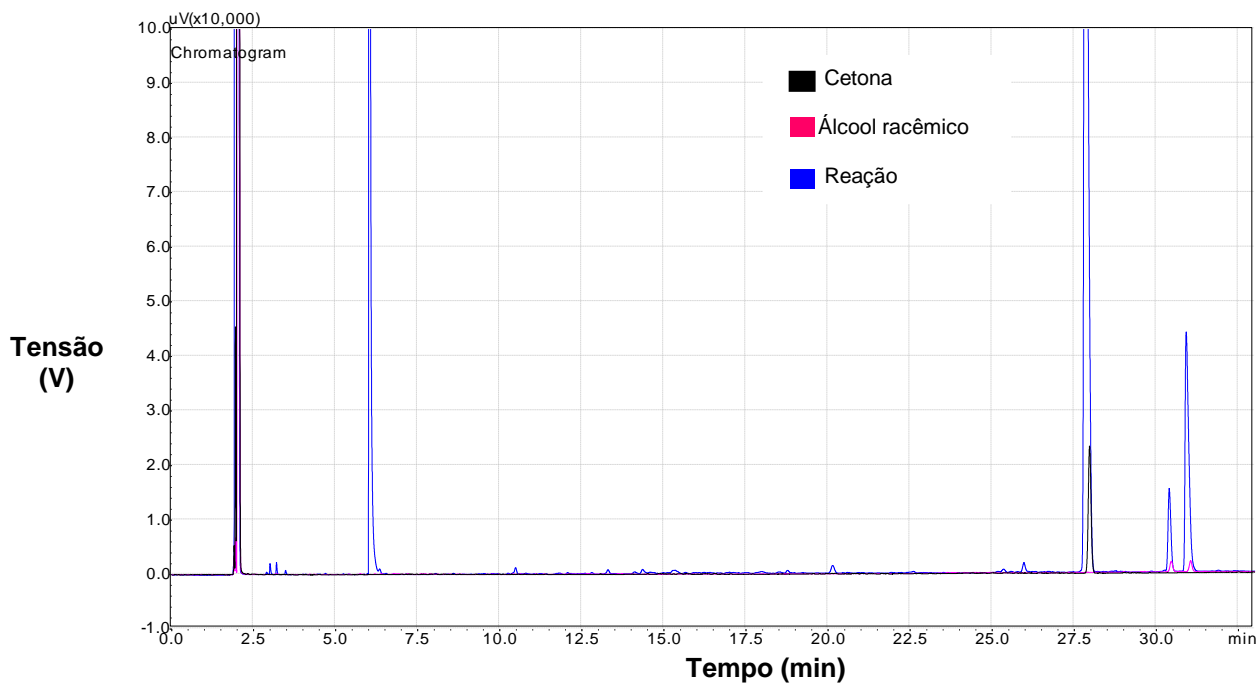
**Figura 49** – Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial *p*-nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF11\_02.



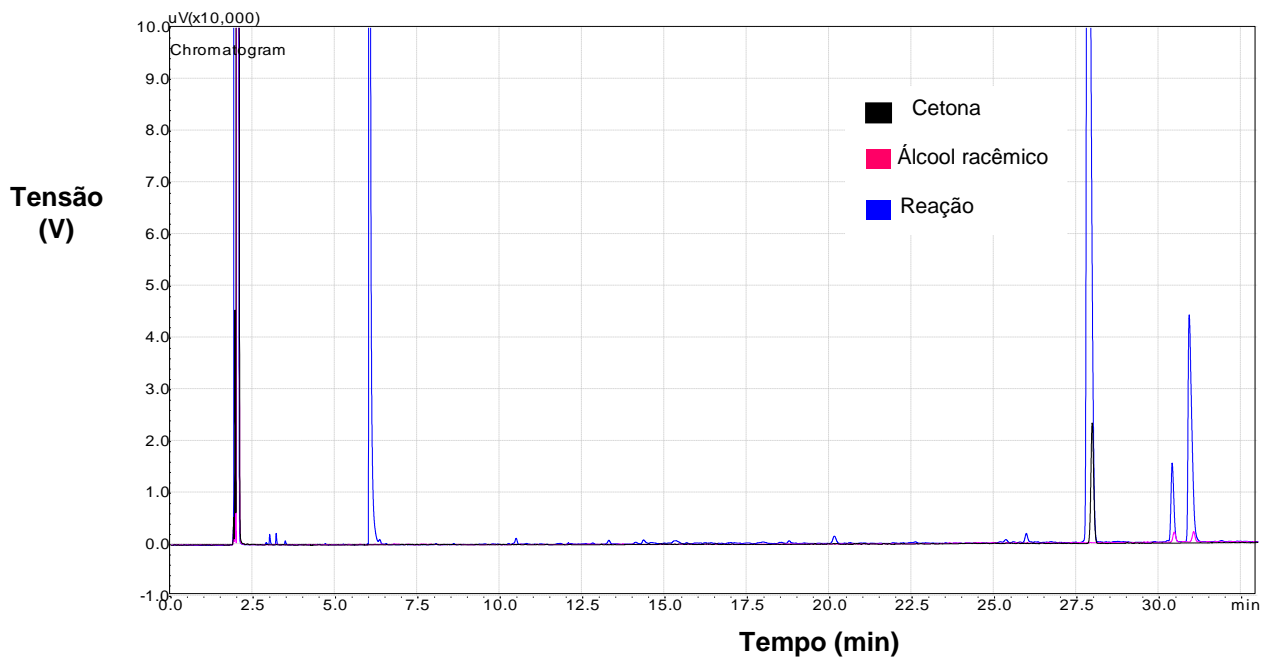
**Figura 50**– Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial *p*-nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF11\_02.



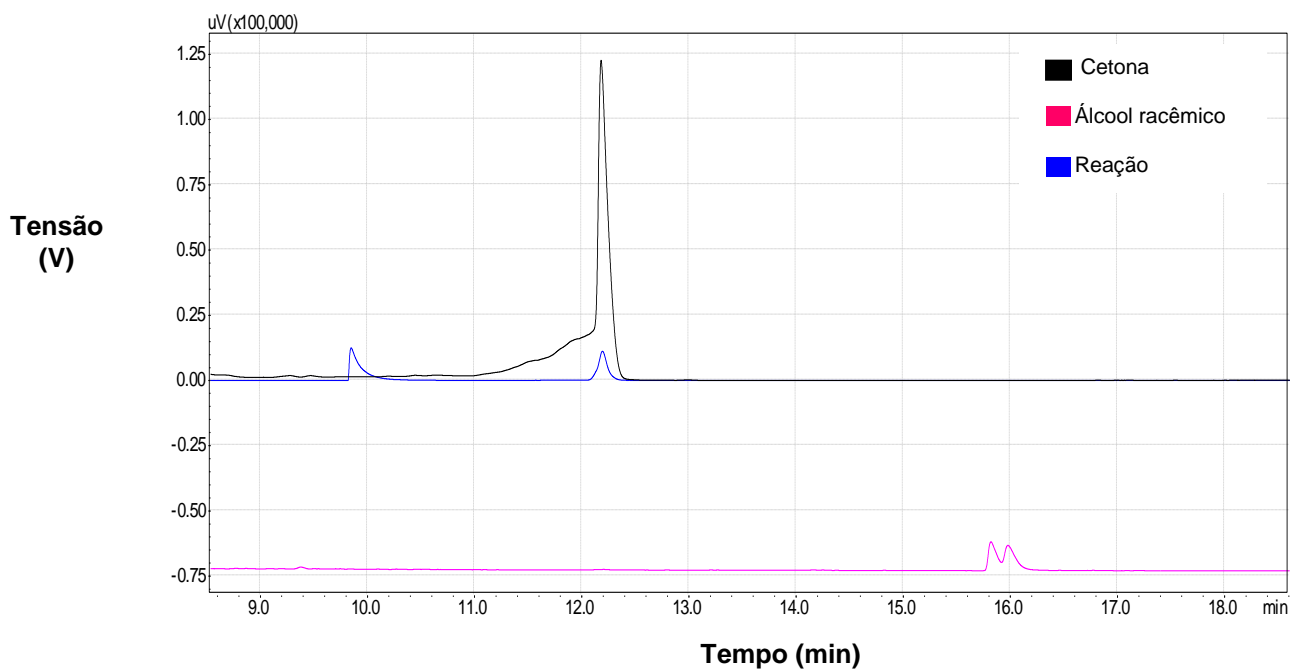
**Figura 51** – Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial  $\alpha$ -cloroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CG05\_04.



**Figura 52** – Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial  $\alpha$ -cloroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 24 horas de reação utilizando fungo CG05\_04.

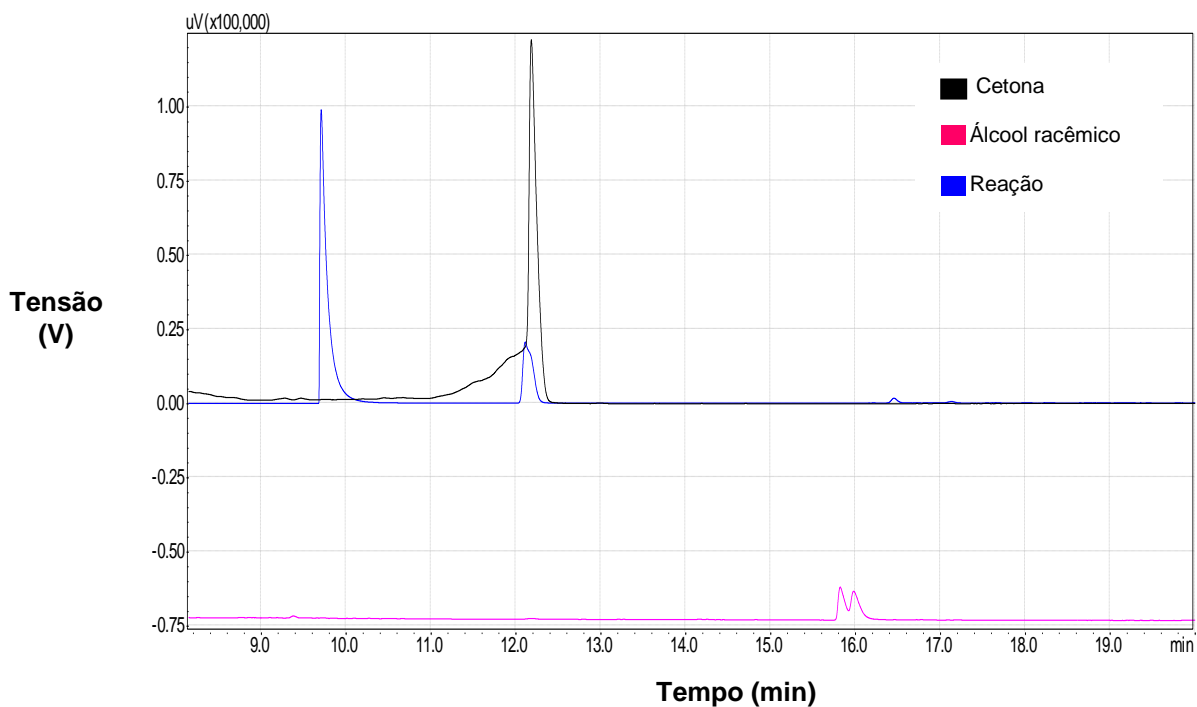


**Figura 53** – Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial  $\alpha$ -cloroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CG05\_04.

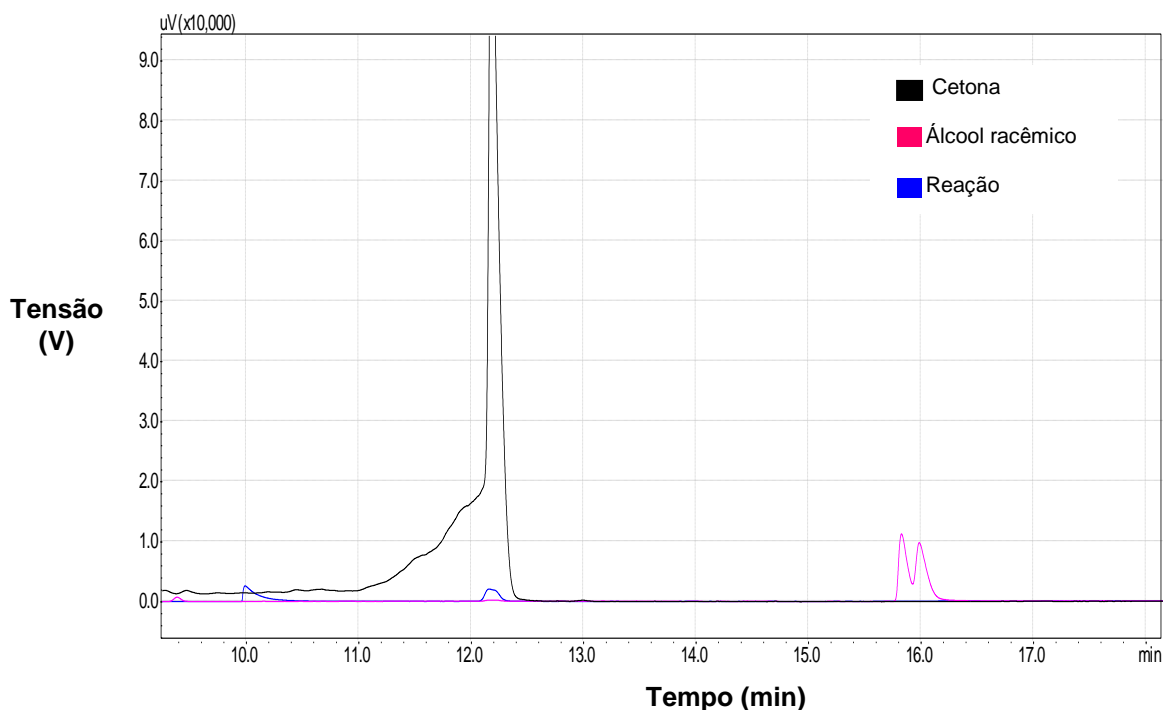


**Figura 54** – Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial alfacloroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF02\_03.

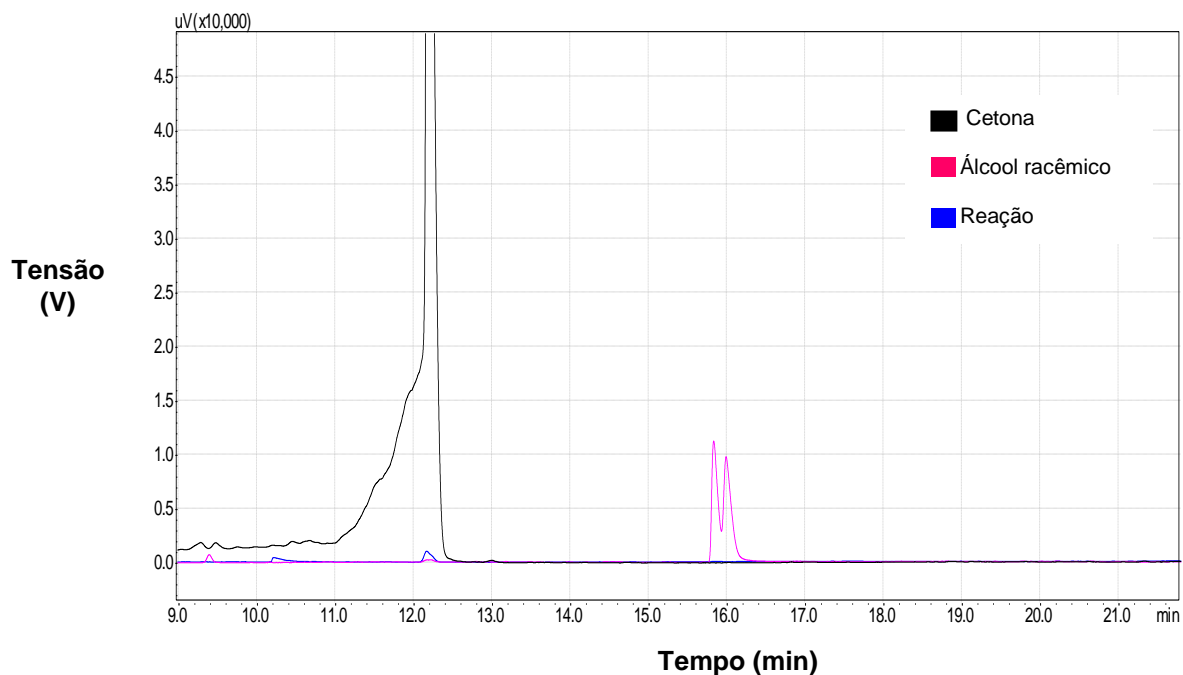




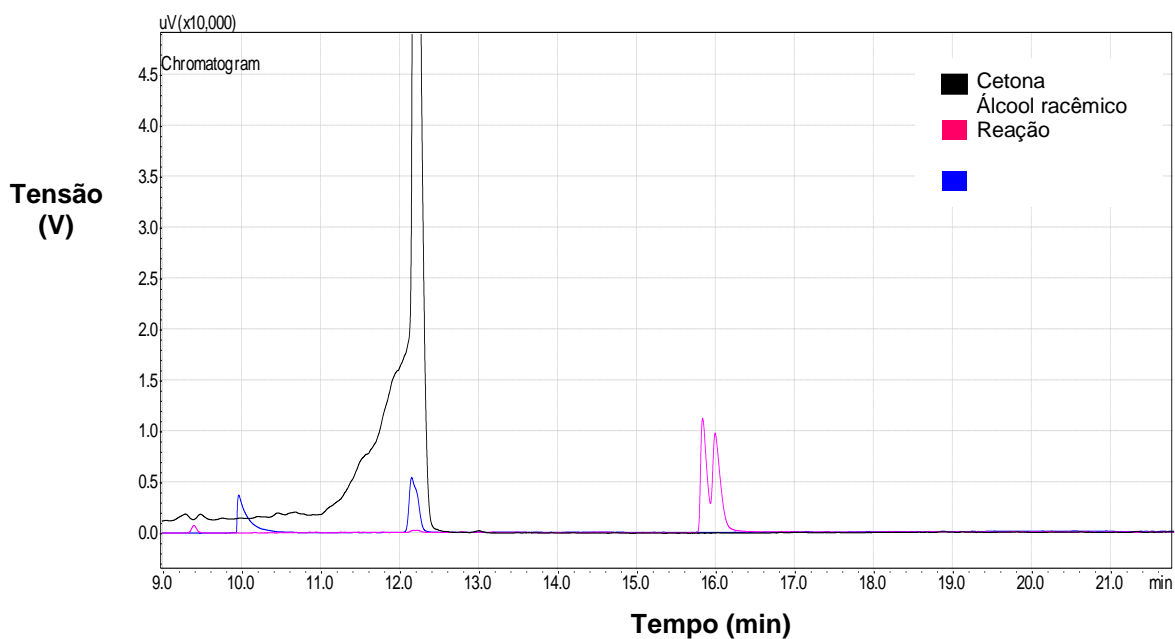
**Figura 55** – Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF03\_05.



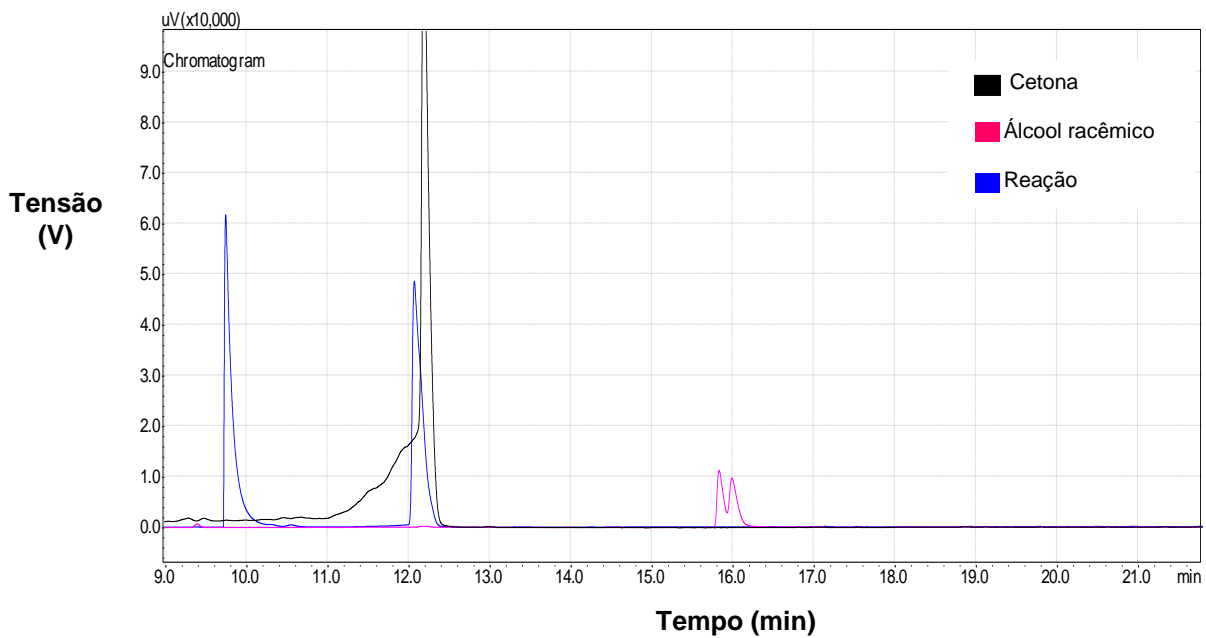
**Figura 56** – Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF01\_06.



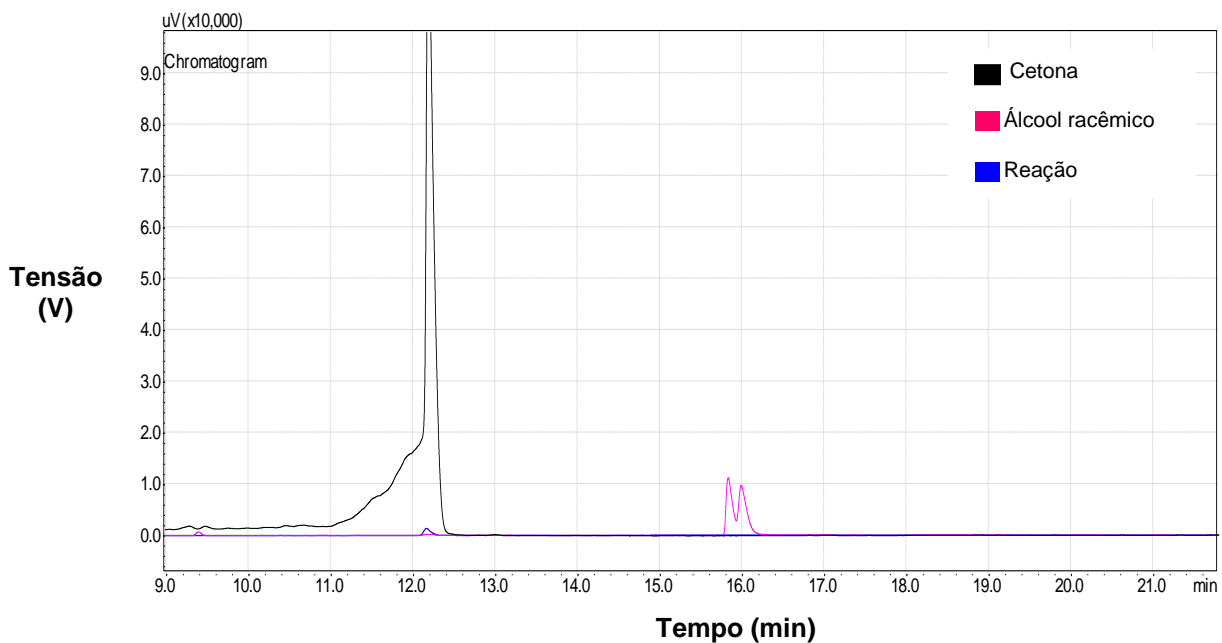
**Figura 57** – Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CF11\_02.



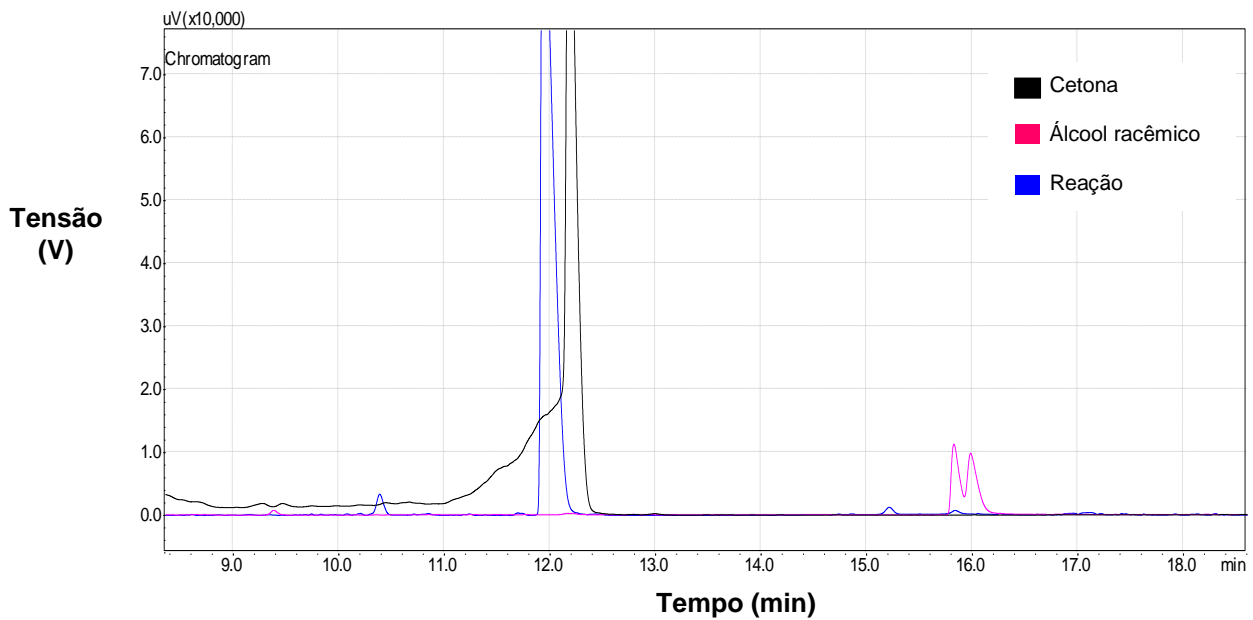
**Figura 58** – Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CG05\_04.



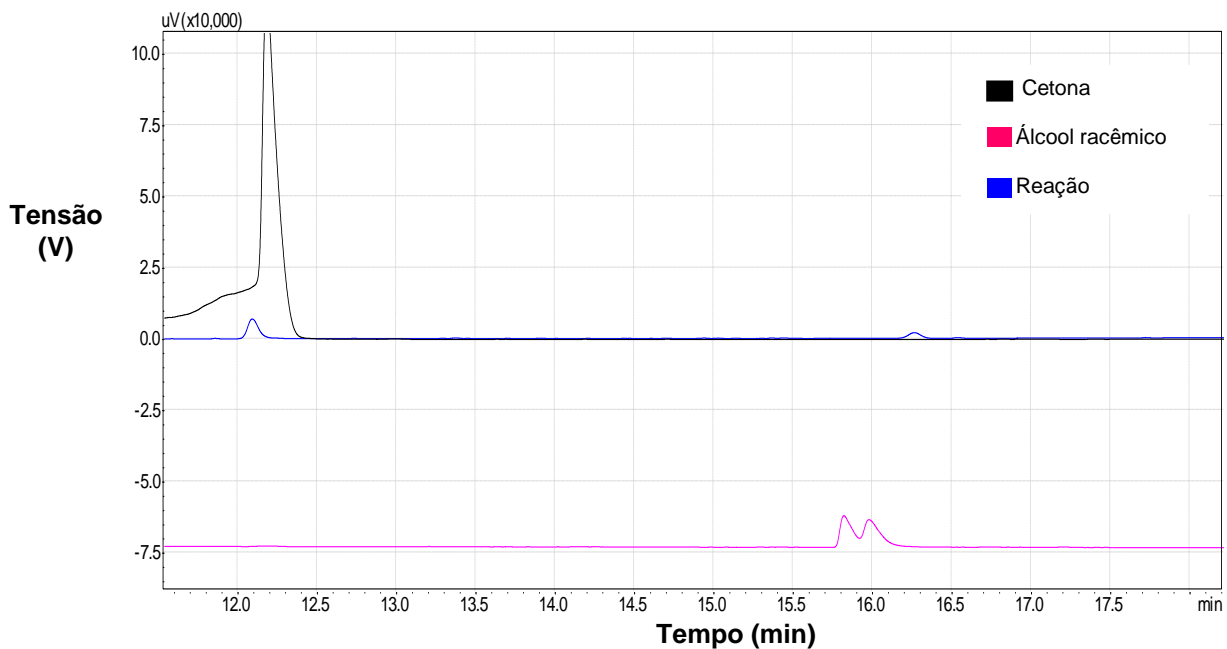
**Figura 59** – Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CG03\_08.



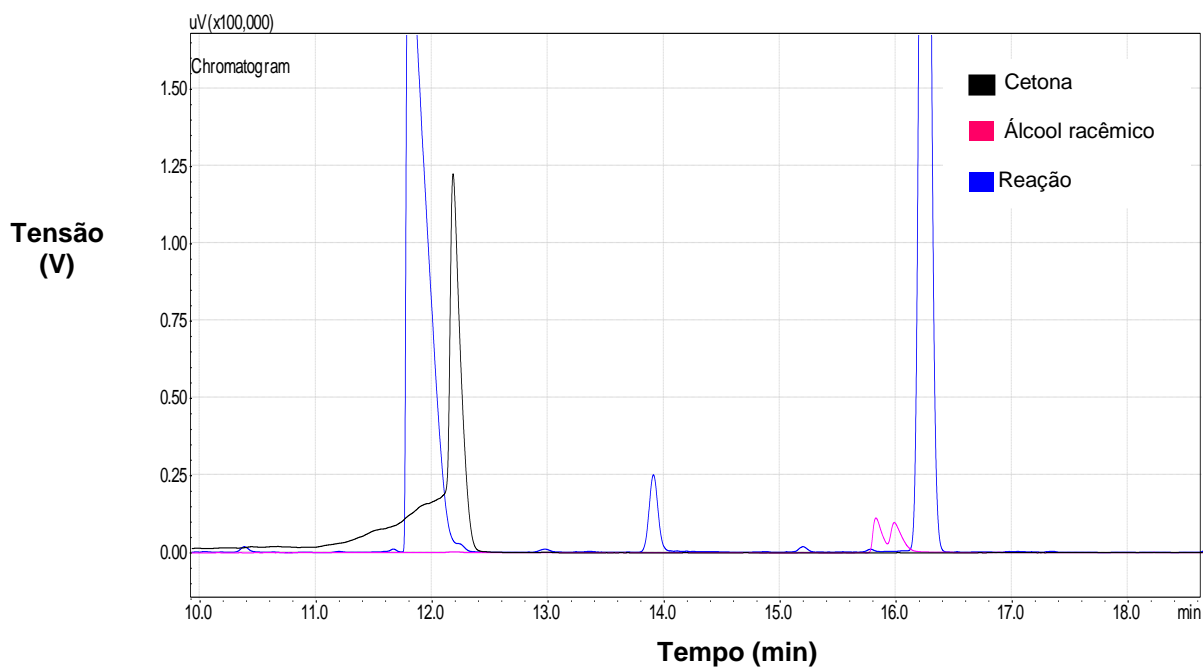
**Figura 60** – Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 72 horas de reação utilizando fungo CG02\_04.



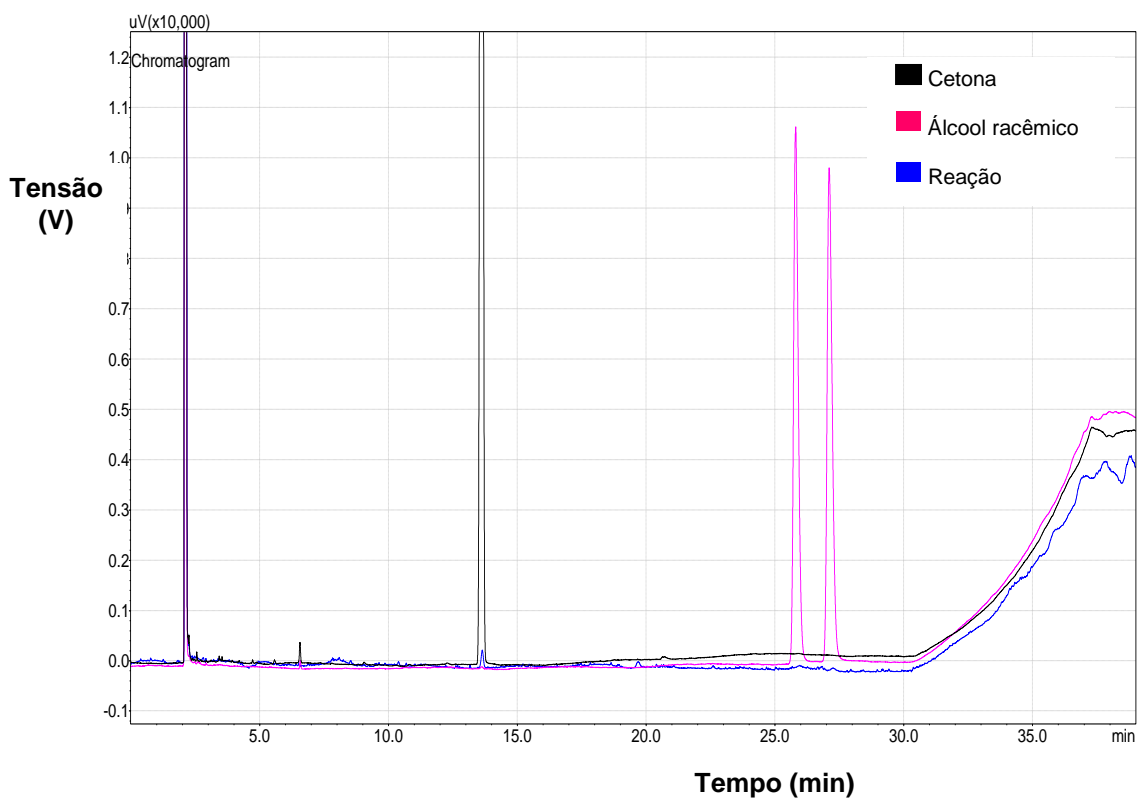
**Figura 61** – Sobreposição de Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 64 horas de reação utilizando **FP/T10%**.



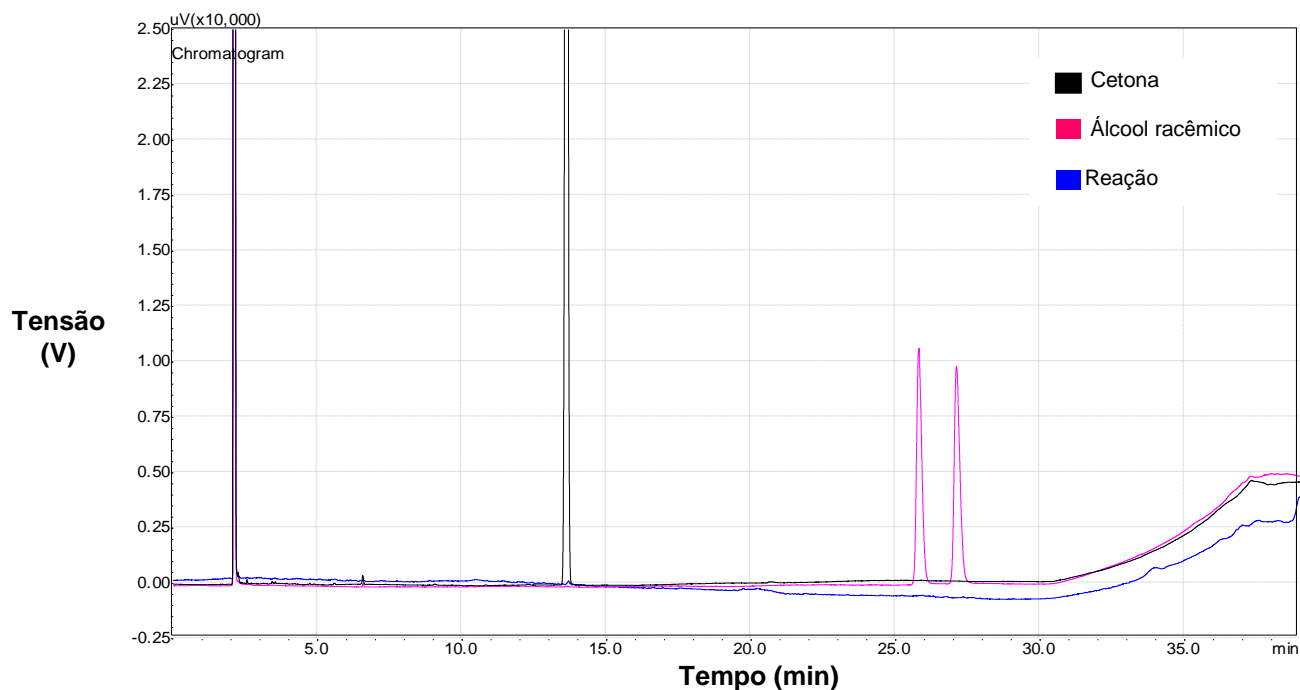
**Figura 62** – Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 36 horas de reação utilizando **CAT-1/S10%**.



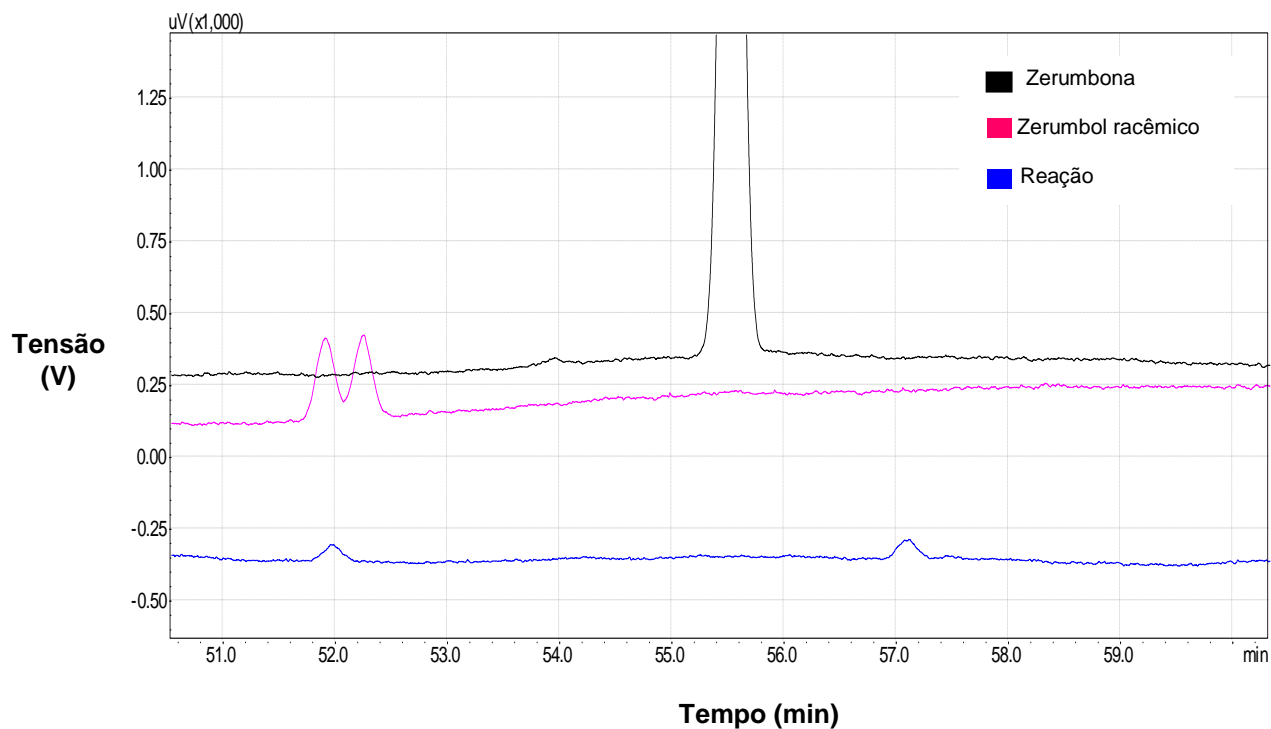
**Figura 63** – Cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial acetoacetato de etila (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 36 horas de reação utilizando **PE-2/S10%**.



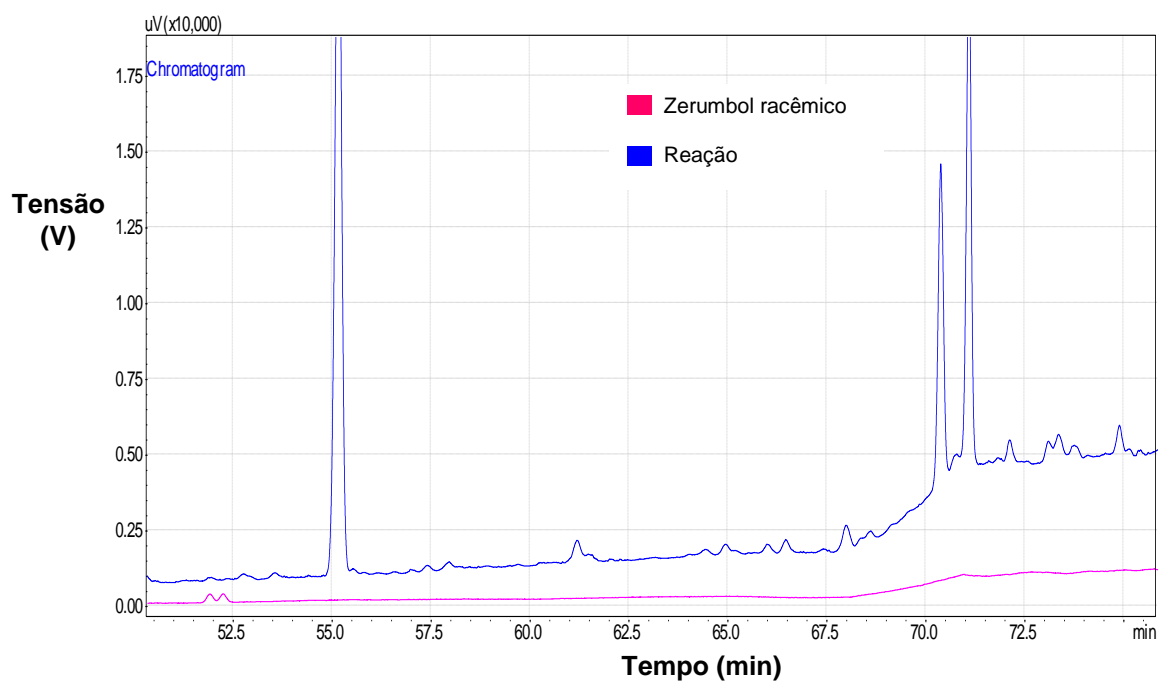
**Figura 64** – Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: a substância inicial *p*-nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 24 horas de reação utilizando a casca do tucumã.



**Figura 65** – Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: *p*-nitroacetofenona (cetona), o álcool racêmico obtido por redução via química e alíquota de 24 horas de reação utilizando a polpa do tucumã.



**Figura 66** – Sobreposição de cromatogramas: a substância inicial a zerumbona, o álcool racêmico obtido por redução via química e a alíquota de 46 horas da reação de resolução utilizando Novozyme 435.



**Figura 67**– Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral: o álcool racêmico obtido por redução via química e reação de redução da zerumbona com o fungo CG0308.