



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**PAULO ALEXANDRE LIMA SANTIAGO**

**ESTUDO DA REDUÇÃO DE ACETOFENONAS UTILIZANDO  
BIOCATALISADORES DA REGIÃO AMAZÔNICA PARA OBTENÇÃO DE  
SUBSTÂNCIAS COM ELEVADA PUREZA ENANTIOMÉRICA DE  
INTERESSE FARMACOLÓGICO**

**MANAUS  
2017**

**PAULO ALEXANDRE LIMA SANTIAGO**

**ESTUDO DA REDUÇÃO DE ACETOFENONAS UTILIZANDO  
BIOCATALISADORES DA REGIÃO AMAZÔNICA PARA OBTENÇÃO DE  
SUBSTÂNCIAS COM ELEVADA PUREZA ENANTIOMÉRICA DE INTERESSE  
FARMACOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque  
Co-Orientador: Prof. Dr. Sergio Duvoisin Junior**

**MANAUS  
2017**

**PAULO ALEXANDRE LIMA SANTIAGO**

**ESTUDO DA REDUÇÃO DE ACETOFENONAS UTILIZANDO  
BIOCATALISADORES DA REGIÃO AMAZÔNICA PARA OBTENÇÃO DE  
SUBSTÂNCIAS COM ELEVADA PUREZA ENANTIOMÉRICA DE INTERESSE  
FARMACOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação: 24/03/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque - UEA  
Orientadora

---

Profa. Dra. Cecília Verônica Nunez - INPA  
Membro interno

---

Profa. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura - UFAM  
Membro externo

**MANAUS  
2017**

## RESUMO

A busca por novos biocatalisadores é de grande interesse para a indústria biotecnológica e farmacêutica. As enzimas são substâncias encontradas em vegetais e microrganismos e se apresentam como excelentes catalisadores devido à sua capacidade de sintetizar substâncias químicas biologicamente ativas. Algumas destas substâncias são bastante difundidas na produção de fármacos, como os álcoois enantiomericamente puros. Sua síntese pode ser realizada utilizando células integras de vegetais ou de microrganismos em reações de biorredução assimétrica de cetonas. Diante da vasta biodiversidade presente na região amazônica e a necessidade de investigações nesta área, este trabalho teve como objetivo realizar a bioprospecção de novos biocatalisadores, a fim de avaliar seu potencial em reações de biorredução enantiosseletiva de acetofenonas substituídas. Foram testados os vegetais *Daucus carota* (cenoura), *Zingiber officinale* (gengibre), *Manihot esculenta* (mandioca), *Ipomoea batatas* (batata doce), *Solanum melongena* (berinjela), e as diferentes partes das plantas amazônicas *Cissus gongylodes* (cipó kupá), *Solanum sessiliflorum* (cubiu) e *Xanthosoma violaceum* (taioba roxa), além de diferentes cepas de fungos do gênero *Aspergillus*. Os fungos foram avaliados quanto à produção de álcool desidrogenase (ADH), enzima envolvida nas reações de biorredução. As reações de redução da *p*-aminoacetofenona, *p*-hidroxiacetofenona, *p*-nitroacetofenona e *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona foram avaliadas em três sistemas reacionais: orgânico (hexano), bifásico (hexano e tampão) e aquoso (tampão). Os fungos foram cultivados por um período de cinco dias, foram filtrados e os micélios postos para secar. Para os vegetais foi realizada uma etapa de asepsia e em seguida estes foram cortados em pequenos pedaços. Após isto 50 mg dos micélios secos ou 10 g dos vegetais cortados foram adicionados ao meio reacional (40 mL) contendo o substrato carbonílico previamente solubilizado. Após 24 horas, a reação foi analisada por cromatografia em fase gasosa equipada com coluna quiral. Todos os fungos produziram ADH, sendo 5 cepas selecionadas para as reações biocatalíticas. O fungo *Aspergillus brasiliensis* foi o que apresentou os melhores percentuais de conversão para as reações de redução da *p*-nitroacetofenona ( $c = 53,7\%$ ), *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona ( $c = 32,2\%$ ) ambas em sistema bifásico, e em meio orgânico a cepa foi capaz de reduzir a *p*-aminoacetofenona ( $c = 11\%$ ), sendo que todas estas reações apresentaram valores de excesso enantiomérico  $>99\%$ . Dentre os vegetais, destacou-se a reação de redução da *p*-aminoacetofenona mediada pelo tubérculo da taioba roxa que promoveu a maior conversão ao produto enantiomericamente puro (93,6%) em meio orgânico. Na redução da *p*-hidroxiacetofenona, a cenoura foi o melhor biocatalisador, formando apenas um enantiômero, com 45,5% de conversão em meio bifásico. Para a *p*-nitroacetofenona, o cipó-kupá promoveu a formação de apenas um produto com 13,9% de conversão em meio bifásico. Para a *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona, a mandioca e o tubérculo da taioba roxa forneceram 34,6% de conversão ao álcool quiral em meio aquoso. A fim de avaliar a influência do tempo de reação, da concentração do substrato e do pH sobre as conversões a produto, foi realizado um planejamento experimental para alguns sistemas biocatalíticos. Para o *A. brasiliensis* o tempo e o pH foram as variáveis que influenciaram significativamente a obtenção do álcool quiral ( $p > 0,05$ ), sendo que o menor tempo e o maior pH levaram às maiores percentagens de conversão. Dos ensaios realizados com os vegetais, a batata doce foi influenciada diretamente pelo pH durante a reação de redução da *p*-nitroacetofenona. Neste trabalho foram obtidos resultados que demonstram o potencial biocatalítico dos fungos do gênero *Aspergillus* e de vegetais encontrados da região amazônica, com destaque para a taioba roxa. Espera-se com estes resultados que mais pesquisas sejam realizadas a fim de se explorar o potencial biotecnológico destes organismos com ênfase na biocatálise.

Palavras-chave: Biocatálise, *Aspergillus*, Vegetais, Biorredução, Enantiosseletividade.

## ABSTRACT

The search for new biocatalysts is of great interest to the biotechnology and pharmaceutical industries. Enzymes are substances found in plants and in microorganisms, and present themselves as excellent catalysts due to their ability to synthesize chemical substances that are biologically active. Some of these compounds are widespread in drug production, such as enantiomerically pure alcohols. Its synthesis can be carried out using whole cells of vegetables or microorganisms in the asymmetric bioreduction reactions of ketones. Considering the vast biodiversity present in the Amazon region and the need for research in this area, this work aimed to bioprospect new biocatalysts, in order to evaluate its potential on the enantioselective bioreduction reactions of acetophenones. The vegetables *Daucus carota* (carrot), *Zingiber officinale* (ginger), *Manihot esculenta* (cassava), *Ipomoea potatoes* (sweet potato), *Solanum melongena* (eggplant), and different parts of Amazon plants *Cissus gongyloides* (Cipó kupá), *Solanum sessiliflorum* (cubiu) and *Xanthosoma violaceum* were tested. Different fungi strains of the genus *Aspergillus* were also tested. The fungi were evaluated regarding its production of alcohol dehydrogenase (ADH), enzyme involved in the bioreduction reactions. The reactions of *p*-aminoacetophenone, *p*-hydroxyacetophenone, *p*-nitroacetophenone and *p*-methoxy-*m*-nitroacetophenone were evaluated in three reaction systems: organic (hexane), biphasic (hexane and buffer), and aqueous (buffer). The fungi were cultivated for a period of five days, then were filtered and set to dry. For the vegetables, an asepsia step was performed and then they were cut into small pieces. Thereafter, 50 mg of the dried mycelia or 10 g of the sliced vegetables were added to the reaction medium (40 mL) containing the previously solubilized carbonyl substrates. After 24 hours, the reaction was analyzed by gas chromatography equipped with a chiral column. All tested fungi produced ADH, and 5 strains were selected for the biocatalytic reactions. Fungus *A. brasiliensis* presented the best conversion percentages for the reduction of *p*-nitroacetophenone ( $c = 53.7\%$ ), and *p*-methoxy-*m*-nitroacetophenone ( $c = 32.2\%$ ), both in a biphasic system. In organic medium, the strain was able to reduce the *p*-aminoacetophenone ( $c = 11\%$ ). All these reactions presented enantiomeric excess  $> 99\%$ . Among the tested vegetables, the reduction of *p*-aminoacetophenone mediated by the tuber of purple taioba presented an outstanding result ( $c = 93.6\%$ ) of only one chiral alcohol, in organic medium. For the reduction of *p*-hydroxyacetophenone, the carrot was the best biocatalyst, forming only one enantiomer, with 45.5% conversion in biphasic medium. For *p*-nitroacetophenone, the cipó-kupá promoted the formation of only one product with 13.9% conversion in the two-phase medium. For *p*-methoxy-*m*-nitroacetophenone, cassava and purple taioba tuber provided 34.6% conversion to the chiral alcohol in aqueous medium. To evaluate the influence of reaction time, substrate concentration and pH over the conversion values, it was performed an experimental design for some of the biocatalytic systems. For *A. brasiliensis*, time and pH were the variables that significantly influenced chiral alcohol production ( $p > 0.5$ ), with the shortest time and the highest pH leading to the highest conversion rates. For the tests performed with the vegetables, sweet potato was directly influenced by pH during the reduction reaction of *p*-nitroacetophenone ( $p > 0.05$ ). In this work were obtained results that demonstrate the biocatalytic potential of fungi of the genus *Aspergillus* and of several plants found in the Amazon region, especially purple taioba. It is expected that researchs on this area can be carried out to explore the biotechnological potential of organisms with an emphasis on biocatalysis.

Key words: Biocatalysis, *Aspergillus*, Vegetables, Bioreduction, Enantioselectivity.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação internacional das enzimas.....	20
Tabela 2 - Cofatores e coenzimas de algumas enzimas.....	23

## LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO I

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2 <sup>2</sup> para as reações biocatalíticas mediadas por <i>Aspergillus</i> sp. realizadas em meio orgânico.....	56
Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2 <sup>3</sup> para as reações biocatalíticas mediadas por <i>Aspergillus</i> sp. realizadas em meio bifásico.....	57
Tabela 3 - Resultados da prospecção da atividade de ADH em fungos do gênero <i>Aspergillus</i> em meio suplementado com fucsina básica.....	60
Tabela 4 - Cepas de <i>Aspergillus</i> sp. selecionadas para serem utilizadas como biocatalisadores.....	65
Tabela 5 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas por <i>Aspergillus</i> sp. nos diversos sistemas biocatalíticos.....	65
Tabela 6 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -hidroxiacetofenona mediadas por <i>Aspergillus</i> sp. nos diversos sistemas biocatalíticos.....	67
Tabela 7 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -nitroacetofenona mediadas por <i>Aspergillus</i> sp. nos diversos sistemas biocatalíticos.....	68
Tabela 8 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona mediadas por <i>Aspergillus</i> sp. nos diversos sistemas biocatalíticos.....	70
Tabela 9 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas por <i>Aspergillus brasiliensis</i> em meio orgânico.....	71
Tabela 10 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -nitroacetofenona mediadas por <i>Aspergillus brasiliensis</i> em meio bifásico.....	72
Tabela 11 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona mediadas por <i>Aspergillus brasiliensis</i> em meio bifásico.....	73
Tabela 12 - Estimativa dos efeitos ( $p \leq 0,05$ ) para conversão das reações de redução da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona obtidos com o planejamento experimental fatorial 2 <sup>3</sup> utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> em meio bifásico.....	74
Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para a conversão a produto das reações de redução da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona obtida com o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> utilizando o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> em meio bifásico.....	75

## LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO II

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo $2^2$ para as reações biocatalíticas mediadas por vegetais realizadas em meio orgânico.....	86
Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo $2^3$ para as reações biocatalíticas mediadas por vegetais realizadas em meio bifásico.....	86
Tabela 3 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas por vegetais nos diversos sistemas biocatalíticos.....	87
Tabela 4 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -hidroxiacetofenona mediadas por vegetais nos diversos sistemas biocatalíticos.....	89
Tabela 5 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -nitroacetofenona mediadas por vegetais nos diversos sistemas biocatalíticos.....	90
Tabela 6 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona mediadas por vegetais nos diversos sistemas biocatalíticos.....	92
Tabela 7 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas pela beringela em meio orgânico.....	93
Tabela 8 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio orgânico.....	94
Tabela 9 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio bifásico.....	95
Tabela 10 - Estimativa dos efeitos ( $p \leq 0,05$ ) para conversão das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona obtidos com o planejamento experimental $2^3$ utilizando a batata doce em meio bifásico.....	97
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para a conversão a produto das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona obtida com o planejamento fatorial completo $2^3$ utilizando a batata doce em meio bifásico.....	98



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral de um processo químico.....	15
Figura 2 - Diagrama da variação de energia livre em função do caminho de uma reação espontânea na presença e ausência de catalisador. ....	17
Figura 3 - Métodos de obtenção do ácido adípico. ....	18
Figura 4 - Estrutura tridimensional da urease. ....	19
Figura 5 - Estruturas tridimensionais da pepsina (a), tripsina (b) e quimotripsina (c). ....	20
Figura 6 - Modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer. ....	21
Figura 7 - Modelo do encaixe induzido. ....	21
Figura 8 - Mecanismo da regra dos três pontos.....	22
Figura 9 - Reações de oxidorredução em substratos carbonílicos.....	23
Figura 10 - Formas oxidada e reduzida da coenzima NAD.....	24
Figura 11 - Efeito de uma solução opticamente ativa no plano de polarização da luz.....	25
Figura 12 - Esquema de catálise de reação promovida por uma enzima. ....	26
Figura 13 - Estrutura dos isômeros da talidomida.....	26
Figura 14 - Produtos naturais obtidos a partir de álcoois quirais. ....	28
Figura 15 - Estrutura geral de uma cetona.....	29
Figura 16 - Processo de Hock. ....	29
Figura 17 - Reação de obtenção de uma acetofenona. ....	30
Figura 18 - Acetofenona como precursora de diferentes substâncias.....	30
Figura 19 - Redução quiral de uma cetona. ....	31
Figura 20 - Redução de cetonas promovida por transferência de hidreto. ....	31
Figura 21 - Reação de redução da butanona gerando uma mistura racêmica. ....	32
Figura 22 - Biorredução da <i>p</i> -nitroacetofenona.....	33
Figura 23 - Redução da <i>p</i> -nitroacetofenona em meio bifásico. ....	33
Figura 24 - Variedade de cores das colônias do gênero <i>Aspergillus</i> . ....	34
Figura 25 - Redução da <i>p</i> -nitroacetofenona mediada por células de <i>Aspergillus terreus</i> . ....	35
Figura 26 - Abertura de anel de epóxido mediada por <i>Aspergillus niger</i> . ....	35
Figura 27 - Hidroxilação da progesterona mediada por <i>Aspergillus niger</i> . ....	35
Figura 28 - Biorredução de acetofenonas utilizando <i>Daucus carota</i> (cenoura). ....	36
Figura 29 - Biorredução de acetofenonas a partir de células de talos de <i>Carica papaya</i> ....	36
Figura 30 - Biorredução da <i>m</i> -metoxiacetofenona acetofenonas mediada por gengibre. ....	36
Figura 31 - Redução de acetofenonas mediada por vegetais. ....	37
Figura 32 - Taioba roxa ( <i>Xanthosoma violaceum</i> ). ....	39
Figura 33 - Cubiu ( <i>Solanum sessiliflorum</i> ). ....	39
Figura 34 - Cipó kupá ( <i>Cissus gongylodes</i> ). ....	41

## LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO I

Figura 1 - Estrutura dos substratos carbonílicos utilizados nas reações de biorredução..	52
Figura 2 - Biorredução da acetofenonas substituídas mediada por <i>Aspergillus</i> sp.....	55
Figura 3 - Cromatograma da <i>p</i> -aminoacetofenona e dos álcoois quirais (padrão racêmico).....	57
Figura 4 - Cromatograma da <i>p</i> -nitroacetofenona e dos álcoois quirais (padrão racêmico).....	58
Figura 5 - Cromatograma da <i>p</i> -hidroxiacetofenona e dos álcoois quirais (padrão racêmico).....	58
Figura 6 - Cromatograma da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona e dos álcoois quirais (padrão racêmico).....	58
Figura 7 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas por <i>Aspergillus brasiliensis</i> em meio orgânico.....	71
Figura 8 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da <i>p</i> -nitroacetofenona mediadas por <i>Aspergillus brasiliensis</i> em meio bifásico.....	72
Figura 9 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona mediadas por <i>Aspergillus brasiliensis</i> em meio bifásico.....	74
Figura 10 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para as conversões das reações de redução da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona mediadas pelo fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> em meio bifásico.....	76
Figura 11 - Superfícies de resposta para as conversões das reações de redução da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona mediadas pelo fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> em meio bifásico como uma função do pH e do tempo de reação (a); e como uma função da concentração de substrato e do tempo de reação (b).....	77

## LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO II

Figura 1 - Estrutura dos substratos carbonílicos utilizados nas reações de biorredução..	83
Figura 2 - Biorredução da acetofenonas substituídas mediada por vegetais.....	85
Figura 3 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas pela beringela em meio orgânico.....	94
Figura 4 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio orgânico.....	95
Figura 5 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio bifásico.....	96
Figura 6 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para as conversões das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio bifásico.....	98
Figura 7 - Superfícies de resposta para as conversões das reações de redução da <i>p</i> -aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio bifásico como uma função do pH e do tempo de reação (a); e como uma função da concentração de substrato e do tempo de reação (b).....	92

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1 PROCESSOS QUÍMICOS E QUÍMICA VERDE.....	15
2.2 CATALISADORES.....	17
2.3 ENZIMAS.....	19
<b>2.3.1 Mecanismos de Catálise Enzimática</b> .....	21
2.4 OXIDORREDUTASES E REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....	22
2.5 ENANTIÔMEROS.....	25
<b>2.5.1 Separação de Enantiômeros</b> .....	27
2.6 ÁLCOOIS QUIRAIS.....	27
2.7 ACETOFENONAS.....	29
2.8 REAÇÕES DE REDUÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS VIA QUÍMICA.....	31
2.9 REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS.....	32
<b>2.9.1 Reações de Biorredução com Fungos</b> .....	33
<b>2.9.2 Reações de Biorredução com Vegetais</b> .....	35
2.10 BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA COMO FONTE DE BIOCATALISADORES.....	37
<b>2.10.1 <i>Xanthosoma violaceum</i> (taioba roxa)</b> .....	38
<b>2.10.2 <i>Solanum sessiliflorum</i> (cubiu)</b> .....	39
<b>2.10.3 <i>Cissus gongylodes</i> (cipó kupá)</b> .....	40
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	42
4.1 OBJETIVO GERAL.....	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43
<b>CAPÍTULO I</b> .....	50
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	51
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
2.1 REAGENTES.....	52
2.2 EQUIPAMENTOS.....	53
2.3 MICRORGANISMOS.....	53
2.4 SÍNTESE DOS PADRÕES RACÊMICOS.....	53
2.5 TESTE DE ATIVIDADE DE ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH).....	54
2.6 PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR (LINHAGENS DE <i>Aspergillus</i> ).....	54
2.7 REAÇÕES BIOCATALÍTICAS DOS SUBSTRATOS CARBONÍLICOS.....	54
2.8 ANÁLISE EM CROMATÓGRAFO GASOSO DE FASE QUIRAL (CGQ).....	55
2.9 DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO E DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO.....	55

2.10 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	56
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
3.1 SÍNTESE DOS ÁLCOOIS RACÊMICOS.....	57
3.2 PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH).....	59
3.3 REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO.....	65
3.3.1 Redução da <i>p</i> -aminoacetofenona.....	65
3.3.2 Redução da <i>p</i> -hidroxiacetofenona.....	66
3.3.3 Redução da <i>p</i> -nitroacetofenona.....	67
3.3.4 Redução da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona.....	69
3.4 ESTUDO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS BIOCATALÍTICAS UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	70
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>80</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>83</b>
2.1 REAGENTES.....	83
2.2 EQUIPAMENTOS.....	83
2.3 VEGETAIS.....	84
2.4 SÍNTESE DOS PADRÕES RACÊMICOS.....	84
2.5 REAÇÕES BIOCATALÍTICAS DOS SUBSTRATOS CARBONÍLICOS.....	84
2.6 ANÁLISE EM CROMATÓGRAFO GASOSO DE FASE QUIRAL (CGQ).....	85
2.7 DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO E DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO.....	85
2.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	86
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
3.1 REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO.....	87
3.1.1 Redução da <i>p</i> -aminoacetofenona.....	87
3.1.2 Redução da <i>p</i> -hidroxiacetofenona.....	88
3.1.3 Redução da <i>p</i> -nitroacetofenona.....	90
3.1.4 Redução da <i>p</i> -metoxi- <i>m</i> -nitroacetofenona.....	91
3.2 ESTUDO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS BIOCATALÍTICAS UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	92
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Enantiômeros são moléculas orgânicas ou inorgânicas que possuem a possibilidade de existir em pares. Em sistemas biológicos frequentemente encontra-se apenas um dos dois enantiômeros possíveis. Por outro lado, ao se realizar uma reação catalisada quimicamente é produzido um par de enantiômeros (mistura racêmica). Enantiômeros ocorrem apenas em compostos cujas moléculas possuem pelo menos um centro estereogênico, sendo assim, não sobreponível à sua imagem especular (ROMERO, 1998; BRUICE, 2006; SOLOMONS e FRYHLE, 2010).

Enzimas, também chamadas de biocatalisadores, são utilizadas na indústria de alimentos, fibras têxteis, detergentes, couro, medicamentos, química, cosméticos, entre outros. Sua capacidade de reconhecer um dos enantiômeros de uma mistura racêmica ou de uma mistura enriquecida em um dos isômeros é uma característica importante em áreas em que a pureza ótica dos produtos é imprescindível. Portanto, a utilização de enzimas na síntese de blocos quirais de construção tem despertado interesse, visando a produção de substâncias bioativas (JONES, 1986; BON et al., 2008).

Atualmente, a síntese de substâncias enantiomericamente puras tem sido desenvolvida para uma série de finalidades, e a principal delas é a síntese de drogas ou fármacos, pois grande parte destes possui pelo menos um centro quiral. É importante considerar que os enantiômeros de uma substância bioativa podem apresentar efeitos farmacológicos e toxicológicos diferentes. Sendo assim, os enantiômeros de um par podem ser ambos benéficos ou um deles benéfico e o outro indesejado, podendo ser tóxico, inibidor ou inativo (BON et al., 2008; BORMAN, 1997). Para que essas substâncias sejam sintetizadas, os biocatalisadores possuem um papel fundamental, pois possuem elevado grau de seletividade por um enantiômero (MATSUDA, YAMANAKA e NAKAMURA, 2009).

Esta capacidade seletiva permite que os biocatalisadores sejam usados por químicos em diferentes abordagens de síntese de substâncias opticamente puras, sejam usando enzimas isoladas ou células íntegras de vegetais ou microrganismos (ZHENG e XU, 2011). Os biocatalisadores podem atuar em condições reacionais brandas, possuem alta especificidade pelo substrato ou reação devido à presença de um sítio ativo em sua estrutura. Tais propriedades melhoram a eficiência da reação e favorecem a formação de substâncias opticamente puras, sendo assim, diferentes enzimas e microrganismos têm sido usados em abordagens experimentais diferentes (DURÁN, CONTI e RODRIGUES, 2000; ISHIGE e SHIMIZU, 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007).

A reação biocatalítica mais estudada é a de hidrólise, pois as enzimas da classe das hidrolases são de fácil manuseio e elevada estabilidade. As reações de oxidação e redução

promovidas pelas oxidorreduções estão em segundo lugar como mais estudadas (MATSUDA, YAMANAKA e NAKAMURA, 2009). Esta reação é importante para a obtenção de álcoois quirais a partir de cetonas pró-quirais e por isso esta classe de enzimas é frequentemente usada nos produtos de química fina e da indústria farmacêutica (DIEDERICHS et al., 2015). Tendo esta vasta aplicação na síntese de álcoois enantiomericamente puros, houve um aumento do número de oxidorreduções disponíveis no mercado. As principais empresas que comercializam essas enzimas na forma de kit de rastreio de reação de redução são a Diacel e a Codexis (MATSUDA, YAMANAKA e NAKAMURA, 2009).

Substratos pró-quirais como acetofenonas são de grande importância para a indústria farmacêutica, pois seus derivados tais como a xantoxilina, taxol e brefeldina possuem importantes atividades biológicas. Seus demais derivados podem ser utilizados como veículo para o princípio ativo de medicamentos, aditivos de gomas de mascar e como fragrâncias em perfumes, detergentes e cremes (SOARES, 2000).

O Brasil é um país importador de enzimas e o uso destas em processos industriais é inferior, quando comparado com outros países. Este quadro tende a diminuir, pois o Governo Federal instituiu através do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação, a produção e desenvolvimento de enzimas como ponto estratégico no desenvolvimento do país (MONTEIRO e NASCIMENTO, 2009). Tendo em vista o consumo de enzimas e sua vasta aplicação na indústria, fazem-se necessárias pesquisas para a obtenção de novas enzimas ou no melhoramento do desempenho de catálise de enzimas já conhecidas.

Neste contexto, o presente estudo pretende avaliar a conversão e a enantiosseletividade da reação de redução de acetofenonas substituídas em diferentes sistemas de reação utilizando como biocatalisadores células íntegras de microrganismos e diferentes partes de plantas (fruto, folha, caule, raiz ou tubérculo), incluindo espécies da região Amazônica, a fim de se obter substâncias com elevada pureza enantiomérica.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PROCESSOS QUÍMICOS E QUÍMICA VERDE

A indústria química é atualmente um sistema complexo que envolve a fabricação de aproximadamente 100 mil substâncias diferentes através de três mil processos químicos diversos utilizados por distintas indústrias. Um processo químico é, em geral, a rota sintética usada para que se possa obter um determinado produto como corantes, aromas, fragrâncias e medicamentos (ZHANG, 2006). Tais processos podem ser desenvolvidos nas indústrias de pequeno, médio e grande porte usando diferentes tecnologias. Em geral, a estrutura de um processo químico pode ser dividida em etapas de acordo com a Figura 1. Uma rota sintética ideal pode ser definida como aquela que se pode obter o produto final partindo de matérias primas acessíveis, em uma operação rápida, segura, com o menor impacto ambiental e com um bom rendimento (PESSOA, MACH e HEMERLY, 2001).

Figura 1 - Estrutura geral de um processo químico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

O impacto ambiental de uma indústria química é largamente conhecido, sendo assim, o ramo da Química Verde ou Química Sustentável tem como principais interesses obter reações químicas com elevado rendimento, redução ou eliminação de substâncias tóxicas, eliminação de resíduos e melhor eficiência energética (SHELDON, 2000; ANASTAS e KIRCHHOFF, 2002; TUCKER, 2006).

A química verde procura desenvolver produtos ou processos que reduzam ou eliminem a utilização e geração de substâncias tóxicas, contribuindo assim com questões globais como as alterações climáticas, produção de energia, redução no consumo de água, produção de alimentos e de substâncias menos agressivas ou tóxicas (ANASTAS e KIRCHHOFF, 2002). Para atingir tal objetivo a química verde tem como fundamentos doze princípios, são eles (ANASTAS, 1998; DUPONT, 2000; LENARDÃO et al., 2003):

1. **Prevenção.** Evitar a produção do resíduo é melhor do que tratá-lo ou “limpá-lo” após sua geração.
2. **Economia de Átomos.** Deve-se procurar desenhar metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final.



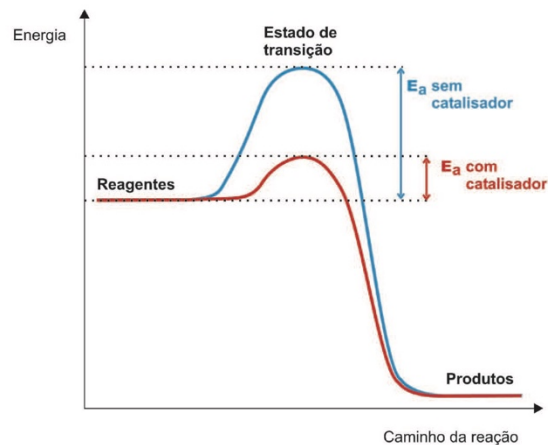
3. **Síntese de Produtos Menos Perigosos.** Sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente.
4. **Desenho de Produtos Seguros.** Os produtos químicos devem ser desenhados de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos.
5. **Solventes e Auxiliares mais Seguros.** O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, devem ser inócuas.
6. **Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima.** A utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não renováveis, sempre que técnica e economicamente viável.
7. **Busca pela Eficiência de Energia.** A utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes.
8. **Evitar a Formação de Derivados.** A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção / desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos.
9. **Catálise.** Reagentes catalíticos (os mais seletivos possíveis) são melhores que reagentes estequiométricos.
10. **Desenho para a Degradação.** Os produtos químicos precisam ser desenhados de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente.
11. **Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição.** O desenvolvimento futuro de metodologias analíticas que viabilizem o monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas se faz necessário.
12. **Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes.** As substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

Dentre os conceitos da química verde podem ser destacados os de número 4 (desenho de produtos seguros), 8 (evitar a formação de derivados) e 9 (catálise) pois estão diretamente ligados ao desenvolvimento da biocatálise, que busca por catalisadores mais eficientes, seletivos e não tóxicos.

## 2.2 CATALISADORES

Os processos industriais que envolvem reações químicas estão presentes na maioria das manufaturas de produtos ou bens consumidos pelo homem, e muitas dessas reações são mediadas por catalisadores químicos, (princípio 9, citado acima), sendo as reações catalíticas melhores do que reações não catalíticas. Um catalisador é uma substância que faz variar a velocidade de uma reação química sem que ele próprio seja alterado durante o processo (BROWN e LEMAY, 2007), ou se for alterado regenera-se ao final da reação. O catalisador diminui a barreira de ativação ou energia de ativação entre os reagentes e produtos, conforme mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Diagrama da variação de energia livre em função do caminho de uma reação espontânea na presença e ausência de catalisador.



Fonte: desenvolvimentovirtual.com (2016).

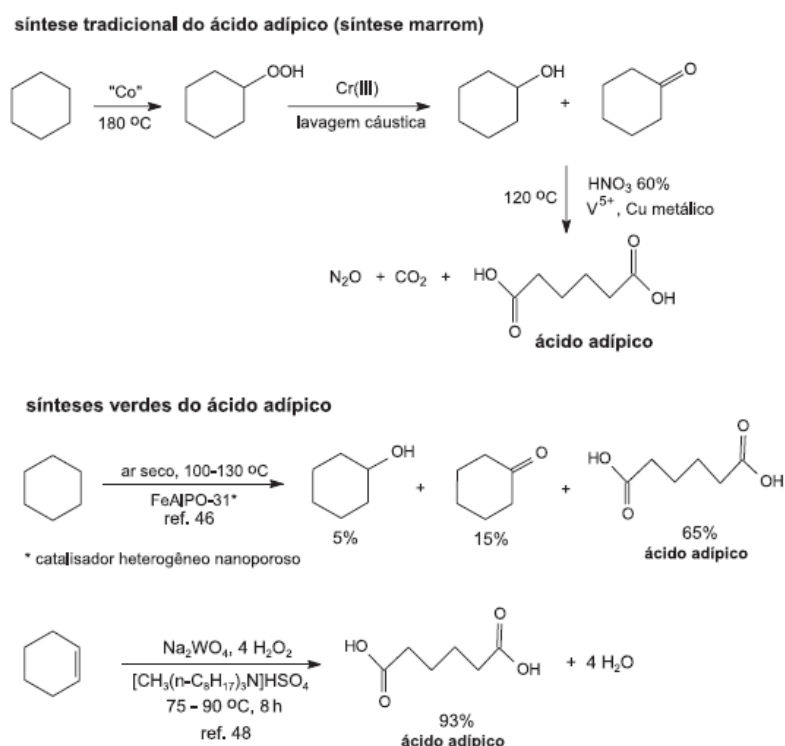
As reações catalíticas podem ser divididas em catálise homogênea e catálise heterogênea. De maneira geral, as reações que usam catalisadores heterogêneos são consideradas limpas, pois são mais seletivas e economicamente viáveis devido à possibilidade de se reciclar e reutilizar o catalisador (LENARDÃO et al., 2003; MONTEIRO e NASCIMENTO, 2009).

Um exemplo do uso de um catalisador em uma reação química é o da síntese do ácido adípico. Este ácido é um produto químico importante, pois é usado para a fabricação do nylon-6,6 que está presente em capacetes, tapetes, reforço de pneus, partes de automóveis, dentre outros (LENARDÃO et al., 2003). Sua produção está em torno de 2,2 milhões de toneladas ao ano e para sua obtenção é necessário o uso do ácido nítrico como agente oxidante em uma de suas etapas. Este processo industrial é responsável pelo lançamento de 5% a 8% de todo  $N_2O$  antropogênico, substância que contribui para a destruição da camada de ozônio aumentando assim o efeito estufa (DICKINSON e CICERONE, 1986).

Atuando de maneiras diferentes, porém com os mesmos objetivos, Thomas et al. (2001) e Noyori (2001) desenvolveram métodos experimentais onde não se utiliza mais o ácido nítrico para a produção do ácido adípico, tornando assim o processo mais eficiente e economicamente atraente. Em seu experimento, Thomas et al. (2001) utilizou a catálise heterogênea e o ar como agente oxidante, enquanto Noyori usou condições de catálise de transferência de fase e água oxigenada como agente oxidante. Em ambos os casos a necessidade do uso de solventes e a produção de resíduos tóxicos foi eliminada. O processo de obtenção industrial do ácido adípico e as reações dos referidos trabalhos estão apresentadas na Figura 3 (THOMAS et al., 2001; SATO, AOKI e NOYORI, 1998).

A biocatálise enquadra-se na tecnologia limpa de processos químicos, e essa é promovida por enzimas que atuam de maneira similar aos catalisadores químicos diminuindo a energia de ativação e aumentando a velocidade das reações. As enzimas possuem ainda uma grande vantagem sobre os catalisadores químicos por serem de ocorrência natural, ou seja, são encontradas em organismos facilitando sua obtenção (LENARDÃO et al., 2003; ALBUQUERQUE, 2007; MONTEIRO e NASCIMENTO, 2009).

Figura 3 - Métodos de obtenção do ácido adípico.



Fonte: Lenardão et al. (2003).

## 2.3 ENZIMAS

Enzimas são proteínas formadas por longas cadeias de aminoácidos sucessivamente ligados uns aos outros por meio de ligações peptídicas em uma sequência geneticamente determinada (ENZIMAS CATALISADORAS DE REAÇÕES, 2006).

Com base na termodinâmica, enzimas são catalisadores biológicos que reduzem a energia de ativação das reações químicas em sistemas biológicos. A energia de ativação é a energia mínima necessária para que uma molécula de reagente ou de substrato (S) alcance o estado de transição enzima-substrato (ES) para que possa ser convertida a produto (P). A velocidade da reação  $S \rightarrow P$  depende do número de moléculas de substrato que alcançam o estado de transição por unidade de tempo. Na presença de uma enzima apropriada, operando a temperatura ambiente, uma reação pode se processar  $10^8$  a  $10^{11}$  vezes mais rapidamente que uma mesma reação não catalisada (MOTTA, 2002).

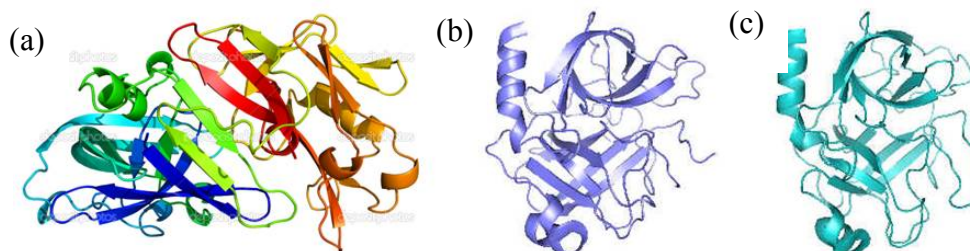
Esta classe de moléculas foi inicialmente utilizada pelo homem de maneira inconsciente para a produção de pães e vinhos em tempos antigos. O termo enzima foi citado pela primeira vez por volta de 1878 por Willian Kühne para designar as substâncias contidas nos extratos de levedura usados em experimentos de fermentação. Em 1897, Eduard Buchner estudou que os extratos de levedura podiam realizar a fermentação do açúcar à álcool e provou que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas das células vivas. Esta descoberta lhe conferiu o prêmio Nobel de Química de 1907. Em 1926, James Summer isolou e cristalizou a urease (Figura 4) sendo assim demonstrada a origem protéica das enzimas. Em 1930, Northrop e Stanley realizaram estudos mais aprofundados de cristalografia de outras três enzimas digestivas (a pepsina, a tripsina e a quimotripsina) (Figura 5), tais estudos concederam aos três pesquisadores o prêmio Nobel de Química em 1946 (MONTEIRO e NASCIMENTO, 2009; NOBEL PRIZE, 2015b).

Figura 4 - Estrutura tridimensional da urease.



Fonte: <http://www.ufrgs.br> (2011).

Figura 5 - Estruturas tridimensionais da pepsina (a), tripsina (b) e quimotripsina (c).



Fonte: <http://brasilecola.uol.com.br/> (2016).

Devido a sua propriedade de promover reações químicas em sistemas biológicos, tornando-as muito mais rápidas que a reação não catalisada, as enzimas são consideradas as biomoléculas mais importantes para os seres vivos havendo situações onde uma pequena queda ou aumento na atividade enzimática acarreta em problemas fisiológicos graves. A singularidade dessa classe de biomoléculas decorre do elevado grau de especificidade a um determinado tipo de reação sob as quais atuam. Algumas enzimas podem ser específicas para determinado tipo de ligação, como por exemplo, a capacidade da  $\alpha$ -amilase de romper unicamente as ligações  $\alpha$ -1,4 das moléculas de amido, ou ainda podem ser específicas para um tipo particular de isômero ótico, como por exemplo, a oxidação da  $\beta$ -D-glicose pela glicose oxidase (NELSON e COX, 2002).

Devido aos grandes avanços do isolamento e identificação de novas enzimas, em 1956 a União Internacional de Bioquímica criou uma Comissão Internacional de Enzimas para estabelecer critérios para a sua nomenclatura e a classificação, a fim de evitar a nomenclatura aleatória de uma mesma enzima estudada por diferentes pesquisadores. As enzimas foram divididas em seis classes de acordo com o tipo de reação que catalisa, conforme com a Tabela 1 (NELSON e COX, 2002).

Tabela 1 - Classificação internacional das enzimas.

Número	Classe	Tipo de reação que catalisam
1	Oxidoredutases	Reações de oxidação ou redução
2	Transferases	Transferência de grupos como amina, fosfato, acil, carboxil entre moléculas
3	Hidrolases	Reações de hidrólise de ligações covalentes
4	Liasas	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos deixando dupla ligação
5	Isomerases	Reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos
6	Ligases	Condensação de moléculas, usando ATP como fonte de energia

Fonte: NELSON e COX, 2002.

### 2.3.1 Mecanismos de Catálise Enzimática

O metabolismo celular é caracterizado por um sistema extremamente complexo de reações químicas inter-relacionadas. Todas essas reações devem ocorrer de maneira simultânea com velocidades controladas cuidadosamente para que a vida seja mantida (BROWN e LEMAY, 2007).

Apesar da enzima ser uma macromolécula, a reação é catalisada em um local específico da enzima, chamada de sítio ativo. As substâncias que sofrem as reações nesses sítios ativos são chamadas de substrato. A primeira teoria apresentada para explicar a elevada especificidade das enzimas foi fornecida por Emil Fischer em 1894. Segundo seu postulado, a especificidade das enzimas se deve ao fato de que tanto as enzimas quanto os substratos são complementares geometricamente e a este modelo dá-se o nome de chave-fechadura, conforme mostrado na Figura 6. Este mecanismo foi aceito por muitas décadas, no entanto, atualmente não é mais utilizado, pois segundo este modelo a enzima assume uma estrutura tridimensional extremamente rígida (NOBEL PRIZE, 2015a; BROWN e LEMAY, 2007; MONTEIRO e NASCIMENTO, 2009; PINHEIRO, 2010).

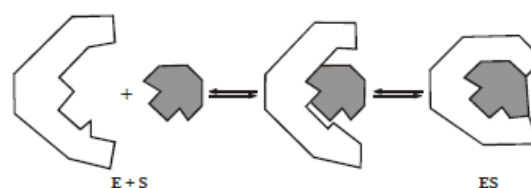
Figura 6 - Modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer.



Fonte: <http://slideplayer.com.br/> (2016).

A hipótese de Kosland, mais moderna, considera a enzima como tendo um encaixe induzido, considerando assim que o sítio ativo não precisa apresentar uma forma geométrica rígida, devendo, contudo, existir um arranjo espacial preciso e específico dos grupamentos R (cadeia lateral) dos aminoácidos, arranjo esse que é induzido pelo contato com o substrato. O sítio ativo de uma enzima ocupa apenas uma parte pequena da enzima. Este mecanismo pode ser observado na Figura 7 (MOTTA, 2002; VIEIRA, 2003).

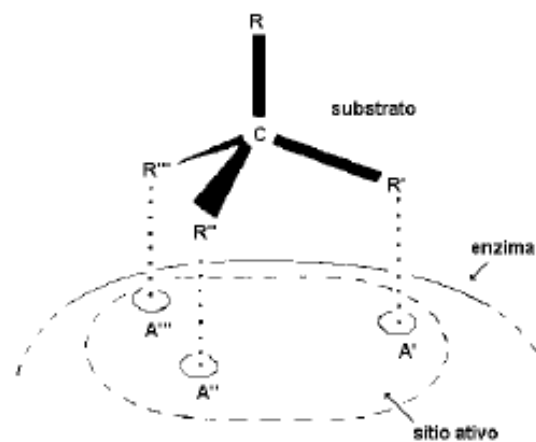
Figura 7 - Modelo do encaixe induzido.



Fonte: <http://pt.slideshare.net/> (2012).

Outro modelo muito utilizado para explicar a elevada especificidade das enzimas foi o proposto por Ogston em 1948. Este modelo sugere que a enzima seja altamente enantiosseletiva e para isso o substrato deve se manter fixo tridimensionalmente no espaço em três pontos distintos com o sítio catalítico da enzima. Dessa maneira, a conformação e composição química do sítio ativo determinam a especificidade da enzima e a eficiência da catálise da reação. De maneira geral, as cadeias laterais de aminoácidos contendo grupos funcionais tais como ácido carboxílico, imidazol e amina estão associados ao mecanismo da reação, podendo estabilizar espécies de transição (Figura 8) (FABER, 1997).

Figura 8 - Mecanismo da regra dos três pontos.



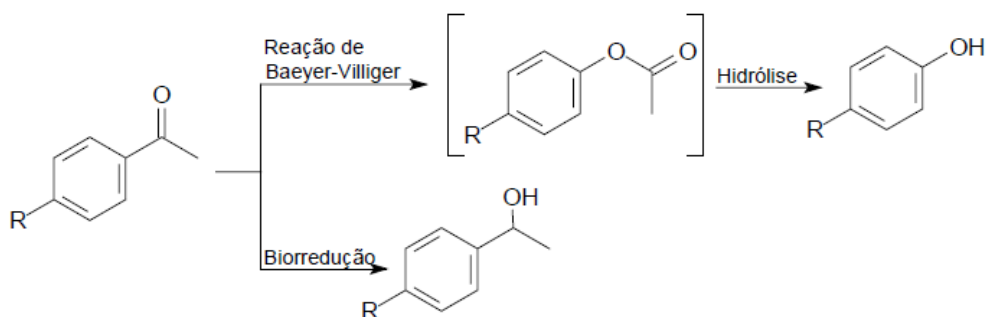
Fonte: PALMER e BONNER (1995).

Tanto no modelo proposto por Kosland quanto por Ogston a interação entre a enzima e o substrato resulta em um complexo de enzima-substrato que é resultado das ligações formadas entre o substrato e as cadeias laterais de vários aminoácidos dentro do sítio ativo. Estas ligações são principalmente do tipo não covalente, como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e dispersões de London. As ligações não covalentes são de natureza fraca e tal característica é de extrema importância, pois desta maneira o substrato convertido em produto pode ser liberado do sítio ativo (SILVERMAN, 2000).

#### 2.4 OXIDORREDUTASES E REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Oxidoredutases são enzimas que oxidam ou reduzem substratos pela transferência de hidrogênio ou elétrons (COELHO, 2008) e podem ser divididas em oxidases, oxigenases e desidrogenases. Dentre estas, as álcool desidrogenases são as responsáveis pela catálise da redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos e derivados, já as mono-oxigenases transformam substratos carbonílicos em ésteres pela oxidação de Baeyer-Villiger. O esquema geral destas reações pode ser observado na Figura 9 (KEPPLER, 2005).

Figura 9 - Reações de oxidorredução em substratos carbonílicos.



Fonte: KEPPLER (2005).

Essas enzimas somente atuam com o auxílio de substâncias de caráter não proteico chamadas de cofatores, que são subdivididos em metais e coenzimas, conforme os exemplos apresentados na Tabela 2 (COELHO, 2008).

Tabela 2 - Cofatores e coenzimas de algumas enzimas.

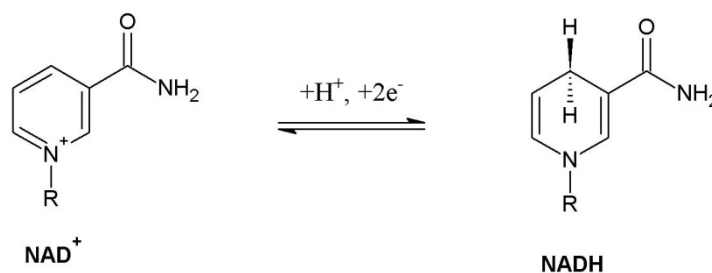
<b>Cofatores</b>	<b>Enzima</b>
Zn <sup>2+</sup>	Anidrase Carbônica
Ca <sup>2+</sup>	α-Amilase, Pectina Liase
Ni <sup>2+</sup>	Urease
Mn <sup>2+</sup>	Superóxido Dismutase
<b>Coenzimas</b>	
FAD	Monoamina Desidrogenase
NAD	Lactato Desidrogenase, Álcool Desidrogenase
Coenzima A	AcetilCoA Carboxilase
Biotina	Piruvato Carboxilase

Fonte: COELHO, 2008.

A coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) na sua forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) e na sua forma reduzida (NADH) é encontrada nas células de todos os seres vivos e funcionam de maneira geral como transportadores de elétrons que são produzidos nas mais diversas reações enzimáticas em um organismo vivo. As enzimas e coenzimas atuam conjuntamente para catalisar as reações, onde a coenzima e o substrato se ligam à enzima e após o substrato ser reduzido e a coenzima oxidada, todos se dissociam da enzima (MATSUDA, YAMANAKA e NAKAMURA, 2009; CAMPBELL e FARRELL, 2011). Na Figura 10 estão apresentadas as estruturas químicas dos cofatores NAD<sup>+</sup> e NADH.



Figura 10 - Formas oxidada e reduzida da coenzima NAD.



Fonte: Adaptado de TAMAMES (2015).

As reações envolvendo biotransformação podem ser divididas em sistemas que empregam células inteiras ou enzimas isoladas. A utilização de enzimas isoladas como biocatalisadores apresentam a vantagem de alta especificidade, pois não existe a competição pelo substrato por diferentes enzimas, além de maior produtividade e da facilidade de isolamento de produtos. No entanto, as enzimas da classe oxidoreductase necessitam da regeneração de cofatores durante o processo de biotransformação. O elevado custo destes cofatores implica numa desvantagem significativa na utilização dessas enzimas isoladas. Sendo assim, uma das metodologias mais comumente usadas em biotransformação é através da utilização das células íntegras de microrganismos ou plantas, pois dessa maneira todo o maquinário enzimático está disponível para que possam ser catalisadas inúmeras reações. Além disso o uso de células íntegras apresenta um baixo custo. Como desvantagem, podem ocorrer reações paralelas devido ao metabolismo celular, o que implica em maior competição pelo substrato (RODRIGUES e MORAN, 2004; CÁNOVAS e IBORRA, 2005; ROCHA, 2008).

Tradicionalmente, o estudo da catálise enzimática envolvendo as oxidoreductases limitava-se ao uso de meio aquoso, o que restringia sua aplicação em diversos setores da indústria. Assim, foram iniciadas pesquisas dedicadas a explorar a biocatálise nos chamados meios reacionais não convencionais, nos quais estão incluídos os solventes orgânicos e o sistema bifásico (BARON, 2003).

O uso de meio orgânico na biocatálise amplia as possibilidades de aplicação das enzimas. As principais vantagens em realizar reações neste tipo de meio são, uso de substratos insolúveis em água, variação na especificidade e seletividade enzimática, facilidade de recuperação de produtos e do biocatalisador, menor risco de contaminação microbiana (no caso de aplicação de células íntegras de microrganismos), aumento da termoestabilidade do biocatalisador e maior facilidade de integração com etapas de síntese química (ILLANES, 1994).

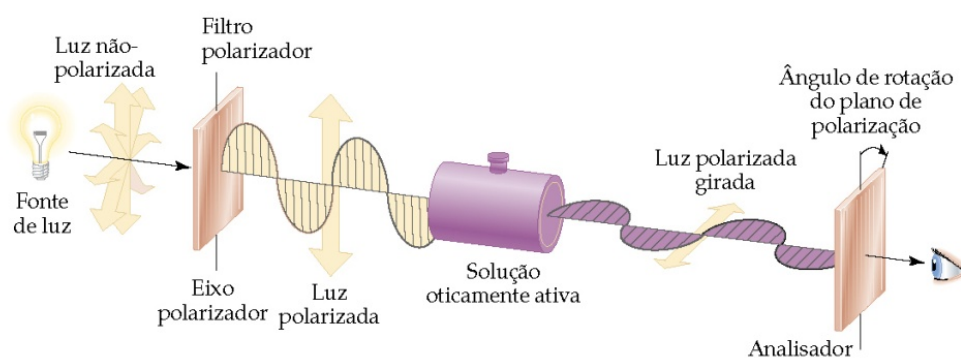
Já o sistema bifásico apresenta como principais vantagens a redução da inibição da enzima pelo substrato, aumento do rendimento da reação devido a interface formada pela separação das duas fases, além das citadas para o meio orgânico (MENG e XU, 2010).

## 2.5 ENANTIÔMEROS

Quando duas ou mais substâncias químicas possuem a mesma composição, porém com um arranjo de átomos diferentes, são chamados de isômeros. O isomerismo é um aspecto característico de moléculas orgânicas e inorgânicas. Apesar de isômeros serem substâncias do mesmo grupo funcional ou agrupamento de átomos, eles geralmente diferem em uma ou mais propriedades físicas ou químicas, como cor, solubilidade, atividade biológica ou de velocidade de reação com algum reagente. Podem ser considerados dois tipos principais de isomeria nos compostos orgânicos: os isômeros estruturais (ocorrem quando a diferença entre os isômeros pode ser explicada por fórmulas estruturais planas) e os estereoisômeros (possuem as mesmas ligações, porém diferem nos arranjos espaciais das ligações) (BROWN e LEMAY, 2007; SOLOMONS e FRYHLE, 2010).

O estereoisomerismo é a forma mais importante de isomeria, pois é subdividido ainda em isomeria geométrica e ótica. Os isômeros óticos, chamados de enantiômeros, são substâncias que possuem imagens especulares que não podem ser superpostas entre si, são difíceis de serem separadas e possuem grande possibilidade de serem formadas como misturas racêmicas, ou seja 50% de um enantiômero (*R*) e 50% do outro enantiômero (*S*). A maioria dessas substâncias apresenta as mesmas propriedades químicas e físicas, exceto o desvio da luz polarizada, devido sua capacidade de desviar a rotação do plano de luz polarizada, além da possibilidade de possuírem propriedades biológicas diferentes. A influência de um composto opticamente ativo frente à polarização da luz em um plano é exemplificado na Figura 11 (ROMERO, 1998; BROWN e LEMAY, 2007; PINHEIRO, 2010).

Figura 11 - Efeito de uma solução opticamente ativa no plano de polarização da luz.

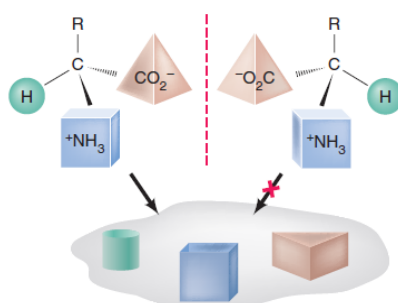


Fonte: BROWN e LEMAY (2007).

As propriedades biológicas dos enantiômeros relacionadas com a quiralidade podem muitas vezes ser comparadas com a especificidade das mãos para com suas respectivas luvas. A especificidade de uma ligação de uma molécula quiral a um sítio receptor quiral só é favorável de uma única maneira, ou seja, se a molécula ou sítio do receptor biológico não

apresenta a conformação que favorece o encaixe, a resposta fisiológica natural não ocorrer. Na presença de uma enzima, a reação de um isômero ótico seria catalisada enquanto o outro isômero não reagiria, sendo assim, um isômero ótico pode produzir um efeito fisiológico específico na célula, enquanto sua imagem especular produz um efeito diferente ou não produz efeito algum. Uma reação hipotética de um par de enantiômeros com uma enzima é demonstrado na Figura 12, onde apenas um dos pares pode fazer a ligação por três pontos do sítio de ligação da enzima (BROWN e LEMAY, 2007; SOLOMONS e FRYHLE, 2010).

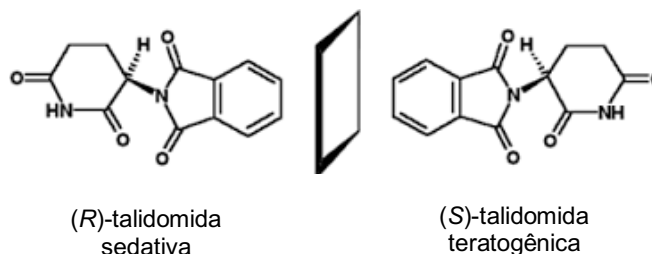
Figura 12 - Esquema de catálise de reação promovida por uma enzima.



Fonte: SOLOMONS e FRYHLE (2010).

Importante citar ainda que a maioria dos fármacos são quirais e normalmente apenas uma das formas de imagem especular fornece o efeito desejado, e a outra imagem é geralmente inativa ou menos ativa podendo inclusive ser tóxica. A talidomida (Figura 13) é um exemplo clássico de um fármaco com efeitos colaterais severos. Este medicamento foi usado durante vários anos para aliviar os sintomas de náuseas em mulheres grávidas. Porém, em 1963 foi descoberto que um dos isômeros da talidomida era a causa da má-formação congênita em muitas crianças nascidas após o uso deste fármaco pelas mães (SOLOMONS e FRYHLE, 2010; PINHEIRO, 2010).

Figura 13 - Estrutura dos isômeros da talidomida.



Fonte: Isômeros perigosos (2011).

### 2.5.1 Separação de Enantiômeros

A separação de compostos que são imagens especulares não-sobreponíveis um do outro tem sido alvo de recentes estudos. A cromatografia gasosa com fase estacionária quiral é uma técnica que vem sendo empregada na separação de enantiômeros.

O termo cromatografia é difícil de ser definido rigorosamente, pois, este nome tem sido aplicado a diversos sistemas e técnicas. Todos esses métodos, no entanto, apresentam em comum o uso de uma fase estacionária e de uma fase móvel. A cromatografia é uma técnica na qual os componentes de uma mistura são separados com base nas diferenças de velocidade nas quais são transportados através de uma fase fixa estacionária por uma fase móvel líquida ou gasosa (BRAITHWAITE e SMITH, 1996).

Na cromatografia gasosa os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contidas dentro de uma coluna. Ao se realizar uma separação por cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e injetada no início da coluna cromatográfica e a sua eluição é feita por um fluxo gasoso inerte, que é característico deste tipo de técnica, pois a fase móvel não deve interagir com as moléculas do analito tendo função somente de transportar o analito através da coluna (McNAIR e MILLER, 1998).

Para efetuar a separação de enantiômeros se faz necessário a adição de agentes de resolução quiral na fase móvel ou estacionária (AHUJA, 2000). As fases estacionárias quirais recebem uma maior atenção, pois o agente quiral é imobilizado sobre a superfície de um suporte sólido, facilitando assim as interações que podem ocorrer entre o agente de resolução quiral e o analito (FELIX, 2001; SCHURIG, 2001). Essas fases estacionárias podem ser produzidas a partir de ciclodextrinas que são oligossacarídeos cíclicos que consistem de no mínimo seis unidades de glicose unidas por ligação  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). São conhecidas ciclodextrinas com 12 ou mais resíduos de glicose, mas apenas os quatro primeiros homólogos, com seis, sete, oito e nove unidades de glicose,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\sigma$  respectivamente, são largamente utilizados. Dentre elas a  $\beta$ -ciclodextrina é a mais usada devido ao baixo custo. Estas fases quirais apresentam como vantagens o alto grau de inércia o que permite a análise de substâncias polares sem derivatização, compatibilidade com todas as técnicas de injeção e elevada estabilidade térmica permitindo o uso de temperaturas mais baixas para a eluição de amostras polares (PORTE, PORTE e OLIVEIRA, 2014).

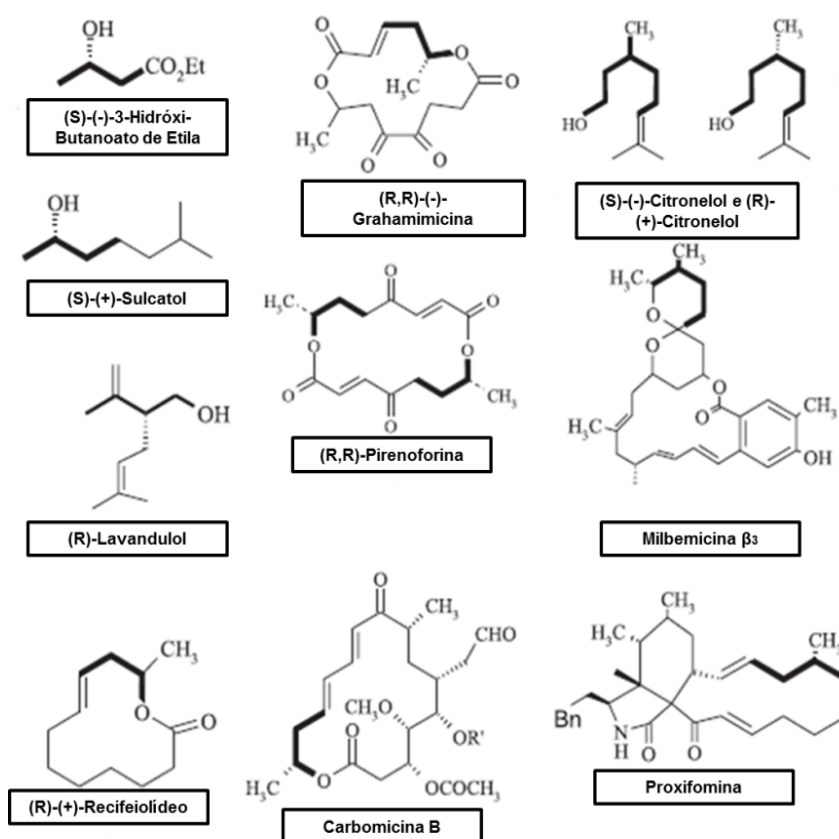
### 2.6 ÁLCOOIS QUIRAIS

Álcoois quirais são conhecidos como importantes blocos de construção na síntese de compostos bioativos usados pela indústria farmacêutica, agroquímica, química fina, de

aromas e diversos outros compostos quirais de importância biológica. O (S)-(-)-3-hidróxibutanoato de etilaoticamente ativo, é um dos álcoois quirais mais utilizados como precursor quiral em síntese orgânica. A partir dele pode-se sintetizar o (S)-(+)-sulcatol, importante insumo para a síntese de outros produtos naturais; (R)-lavandulol, importante aditivo na indústria de perfumes; o (R)-(+)-recifeiolídeo, macrolídeo natural isolado do *Cephalosporium recifei*; a (R,R)-(-)-grahamimicina, macrodiolídeo de atividade antibiótica reconhecida; a (R,R)-pirenoforina, um diolídeo representativo de ocorrência natural com atividade fungicida, e a partir de sulcatole a carbomicina B, um outro antibiótico macrolídeo (TEMBA, OLIVEIRA e DONNICI, 2003).

Os terpenostambém possuem a função álcool e seus derivados sendo de grande importância em síntese orgânica, quer como precursores, quer como auxiliares quirais, sendo vários de origem natural. Existem exemplos de destaque de síntese total partindo-se de terpenóis: a síntese da milbemicina  $\beta_3$  a partir do (S)-(-)-citronelol e a síntese de proxifomina a partir do (R)-(+)-citronelol. As estruturas de todos estes compostos podem ser observadas na Figura 14 (TEMBA, OLIVEIRA e DONNICI, 2003).

Figura 14 - Produtos naturais obtidos a partir de álcoois quirais.



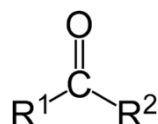
Fonte: Adaptado de TEMBA, OLIVEIRA e DONNICI (2003).

Um aspecto que deve ser levado em consideração para a obtenção destes compostos quirais é o controle estereoquímico, essencial para uma boa síntese enantiosseletiva. Sendo assim, reações catalisadas por células integras de microrganismos ou vegetais apresentam um grande potencial visto que as enzimas produzidas por esses organismos possuem alta seletividade e especificidade por um dos isômeros. O processo é vantajoso pois, tais organismos podem ser utilizados em reações envolvendo substâncias pró-quirais como as acetofenonas que possuem um grande potencial sintético pois, a partir destas substâncias são obtidos álcoois quirais utilizados em muitos setores industriais (YADAV et al., 2002; CORDELL et al., 2007; BOM et al., 2008; PINHEIRO, 2010).

## 2.7 ACETOFENONAS

Cetonas são compostos orgânicos que contém um grupo carbonila ligado a dois substituintes (R1 e R2) podendo ser saturados, insaturados, alifáticos, cíclicos ou aromáticos. Na Figura 15 pode ser observada a estrutura geral de uma cetona. As reações mais importantes envolvendo cetonas são de redução e condensação (BAUER JR, 2003; VELLASCO JÚNIOR, 2011).

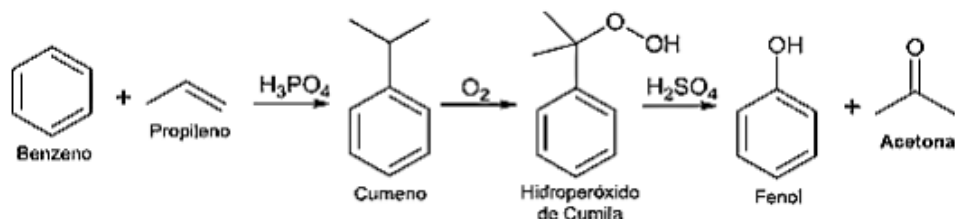
Figura 15 - Estrutura geral de uma cetona.



Fonte: BAUER JR (2003).

Sua produção se dá através do processo de Hock (Figura 16), usado para a obtenção de fenol. Neste processo o benzeno reage com o propileno na presença de ácido fosfórico, em seguida o isopropilbenzeno é oxidado pelo oxigênio do ar, gerando o hidroperóxido de cumila, que na presença de ácido sulfúrico é clivado liberando assim a acetona e o fenol (SIFNIADES, LEVY e BAHL, 2011).

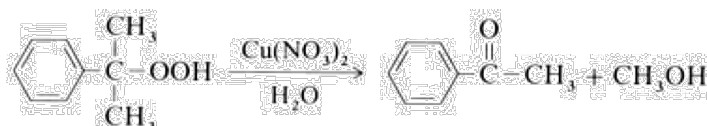
Figura 16 - Processo de Hock.



Fonte: Adaptado de VELLASCO JÚNIOR (2011).

Através de um dos intermediários do mesmo processo citado acima podem ser obtidas as acetofenonas, principal produto da reação do hidróxido de cumila na presença de cobre (que age como catalisador) a uma temperatura de 100°C. As acetofenonas são as cetonas aromáticas mais simples. A reação de obtenção de uma acetofenona se dá de acordo com a reação mostrada na Figura 17 (SIEGEL e EGGERSDORFER, 2012).

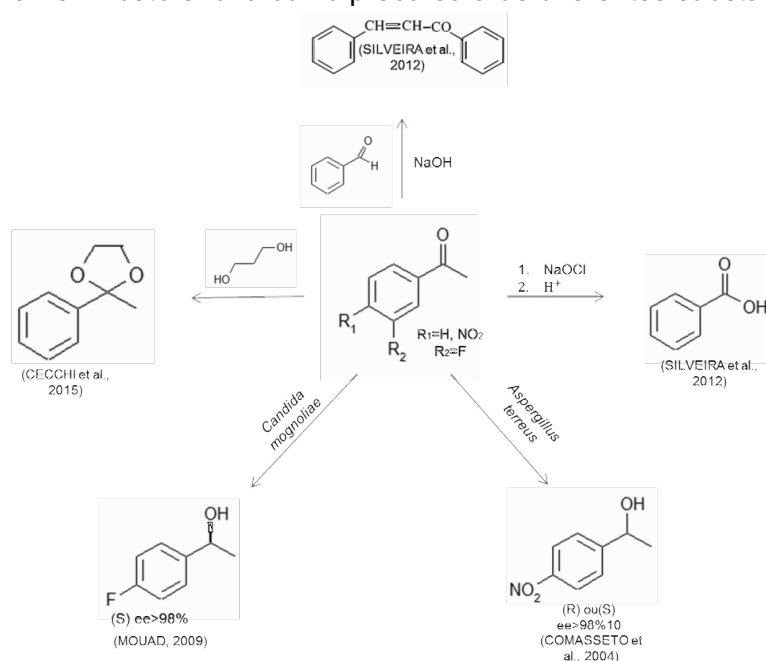
Figura 17 - Reação de obtenção de uma acetofenona.



Fonte: SIEGEL e EGGERSDORFER (2012).

Acetofenonas são substâncias que servem de matéria prima para a síntese de produtos farmacêuticos e como veículo para o princípio ativo do medicamento. São utilizadas na composição de fragrâncias e aditivos em gomas de mascar, porém, sua grande importância está no fato de ser um substrato pró-quiral sendo frequentemente utilizada como substrato em reações de biorredução para obtenção de substâncias assimétricas. Portanto são substratos de grande interesse para a indústria química e farmacêutica, por esse motivo inúmeros estudos são realizados tendo o objetivo de se obter álcoois opticamente puros pois, são usados como blocos de construção para a síntese de substâncias como o antifúngico Brefeldina ou o Taxol, usado no tratamento do câncer (OMORI, PORTAS e OLIVEIRA, 2012). Na Figura 18 estão apresentados alguns derivados da acetofenona.

Figura 18 - Acetofenona como precursora de diferentes substâncias.

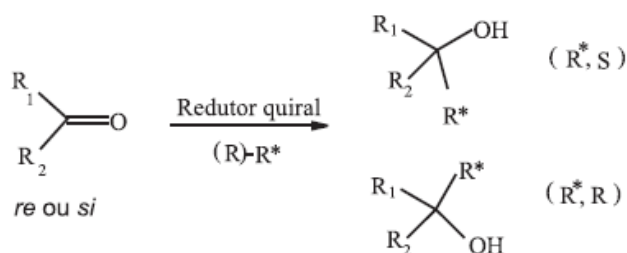


Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

## 2.8 REAÇÕES DE REDUÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS VIA QUÍMICA

O preparo de álcoois quirais pode ser realizado através de vias sintéticas complexas, porém sua obtenção pode ser realizada de modo mais simples usando-se um composto carbonílico quiral e um agente redutor quiral ou aquiral. A reação com agente redutor quiral induz a produção assimétrica, visto que as duas faces do plano das cetonas pró-quirais são enantiotópicas e, no estado de transição, formam intermediários diastereotópicos, formando assim um dos enantiômeros. No entanto, tal metodologia deve ser executada em inúmeras etapas elevando assim o seu custo, necessitando ainda de condições reacionais extremas com elevadas temperaturas, meios ácidos ou básicos. Este processo pode ser observado na Figura 19 (KAGAN, 1982; EMBERGER e HOPP, 1987; ELIEL, WILEN e MANDER, 1994).

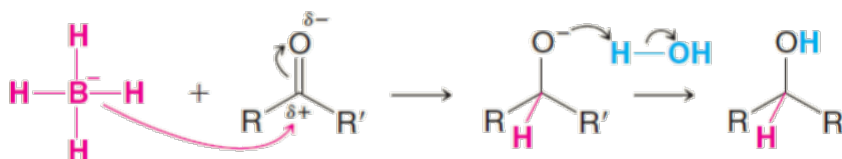
Figura 19 - Redução quiral de uma cetona.



Fonte: Adaptado de TEMBA, OLIVEIRA e DONNICI (2003).

A utilização dos agentes redutores aquirais como o borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) ou hidreto de lítio e alumínio ( $\text{LiAlH}_4$ ) para a redução de compostos carbonílicos é muito comum em síntese orgânica. A reação usando  $\text{NaBH}_4$  ocorre através da transferência de um íon hidreto do metal para o carbono da carbonila (Figura 20). Por ser o  $\text{NaBH}_4$  um agente redutor aquiral a transferência do hidreto ocorre dos dois lados do plano da carbonila gerando assim uma mistura racêmica (Figura 21) (TEMBA, OLIVEIRA e DONNICI, 2003; SOLOMONS e FRYHLE, 2010).

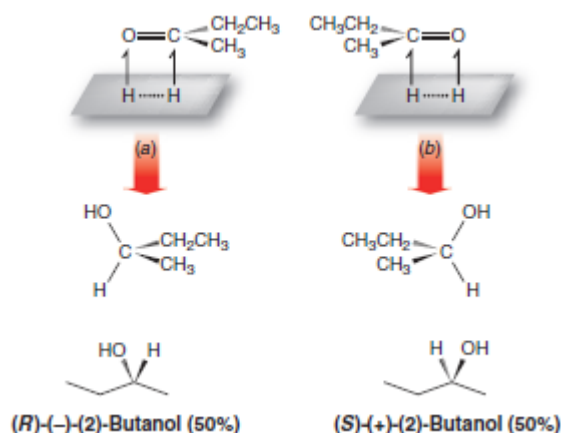
Figura 20 - Redução de cetonas promovida por transferência de hidreto.



Fonte: SOLOMONS e FRYHLE, 2010.



Figura 21 - Reação de redução da butanona gerando uma mistura racêmica.



Fonte: SOLOMONS e FRYHLE, 2010.

## 2.9 REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS

A biorredução consiste no uso de catalisadores naturais na transformação de substâncias químicas. Este tipo de metodologia é bastante versátil e está cada vez mais presente na indústria, pois as enzimas produzidas por organismos vivos possuem uma grande seletividade do ponto de vista estereoquímico, e operam em condições brandas de reação. Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de aperfeiçoar sua eficiência catalítica utilizando meios reacionais não convencionais (solventes orgânicos e sistemas bifásicos) (AIRES-BARROS, 2003; OMORI, PORTAS e OLIVEIRA, 2012).

O meio aquoso é o mais utilizado nas reações mediadas por células íntegras, pois oferece as condições ideais para a manutenção da célula além de ser um solvente verde. Diferente dos solventes orgânicos que podem interagir com a membrana lipídica, acarretando assim em seu rompimento, inativando ou desnaturando as enzimas ligadas a esta membrana, o meio aquoso “simula” o ambiente celular. No entanto, diversas substâncias orgânicas de interesse industrial e comercial são insolúveis em água. Sendo assim, o sistema bifásico é uma excelente alternativa para realizar a biotransformação desses substratos. O sistema bifásico é formado por uma fase aquosa e uma orgânica, na fase aquosa as células ficam suspensas e na orgânica estão os reagentes e os possíveis produtos formados. Durante a escolha da fase orgânica deve-se levar em consideração a capacidade de solubilizar tanto o produto e o substrato, bem como o coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água, Log P (HE et al., 2006; CAPELLO, FISCHER e HUNGERBÜHLER, 2007; HOLLMANN, ARENDS e HOLTSMANN, 2011).

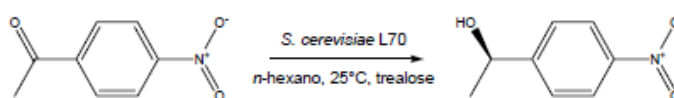
### 2.9.1 Reações de Biorredução com Fungos

Durante muito tempo os fungos têm sido usados pela humanidade na produção de alimentos, bebidas e fármacos. Entretanto, o potencial desses microrganismos e de suas enzimas para aplicação industrial somente se tornou possível com o avanço do conhecimento de sua fisiologia, metabolismo e genes (BOM et al., 2008). Podem-se citar cinco características importantes para o uso de microrganismos pela indústria, são elas: (1) a elevada superfície de contato com o meio líquido o que facilita o consumo de nutrientes fazendo com que as taxas de metabolismo e síntese de moléculas aumentem; (2) a imensa variedade de reações mediadas por eles; (3) facilidade de adaptação em diferentes ambientes de cultivo; (4) manipulação genética de cepas para o aumento da produção ou geração de produtos de interesse; (5) elevada capacidade de produzir um enantiômero (DEMAIN, 2000).

A biorredução mediada por leveduras têm sido estudada há mais tempo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão) é amplamente utilizada na produção de biomassa, etanol, alimentos, proteínas recombinantes, fármacos e outros produtos de interesse. Possui ainda tolerância a uma série de substâncias e solventes orgânicos. Suas enzimas catalisam as reações de redução de cetonas e aldeídos (ALBUQUERQUE, 2007).

Albuquerque (2007) realizou a redução da *p*-nitroacetofenona mediada por células de *S. cerevisiae* em meio orgânico e em sistema bifásico. Obteve elevada enantiosseletividade (ee > 99%), produzindo o álcool (S)-(-)-1,4-nitrofeniletanol em meio orgânico. Na Figura 22 pode ser observada a reação de biorredução da *p*-nitroacetofenona. Em sistema bifásico, na presença de trealose, a redução da *p*-nitroacetofenona ocorreu em 24 h de reação com a conversão de 98% do substrato e ee 93% para o (S)-(-)-1,4-nitrofeniletanol. O esquema desta reação pode ser observado na Figura 23.

Figura 22 - Biorredução da *p*-nitroacetofenona.



Fonte: Adaptado de Albuquerque (2007).

Figura 23 - Redução da *p*-nitroacetofenona em meio bifásico.



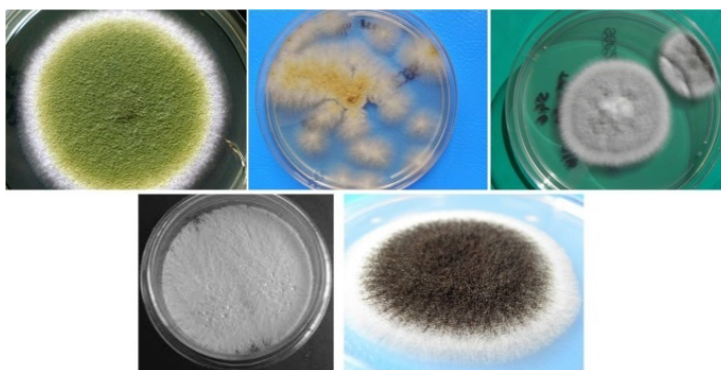
Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

Numerosos estudos da literatura científica apontam para o potencial de aplicação industrial de espécies como os fungos do gênero *Aspergillus*, como por exemplo o *A. awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, dentre outros (BOM et al., 2008).

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 por Micheli, mas somente em 1926 Tom e Church publicaram o primeiro trabalho sobre o gênero. Uma descrição mais completa sobre o gênero foi realizada por Rapper e Fennel em 1965, e neste trabalho foram descritas 132 espécies e 18 variedades (GEISER et al., 2007; BENNETT, 2010).

O gênero *Aspergillus* possui mais de 260 espécies (SAMSON e VARGA, 2009; BENNETT, 2010). Este gênero é considerado comum, pois é amplamente distribuído na natureza e sua abundância é maior nas regiões de climas tropicais e subtropicais (PITT e HOCKING, 1997; KLICH, 2002). Suas colônias apresentam uma grande variação de cores, sendo esta sua principal característica morfológica utilizada para classificação. Podem ser encontradas colônias com colorações em tons de verde, amarelo, cinza, branco e preto, conforme pode ser observado na Figura 24.

Figura 24 - Variedade de cores das colônias do gênero *Aspergillus*.

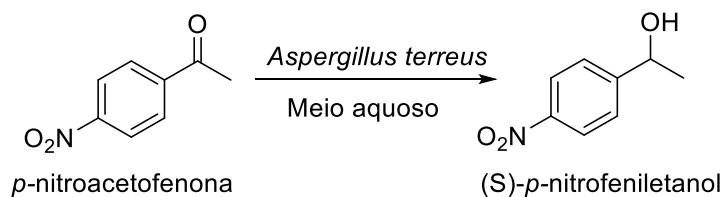


Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

Os fungos do gênero *Aspergillus* vêm sendo amplamente utilizados como biocatalisadores em síntese orgânica. Em um estudo realizado por Comasseto et al. (2004) verifica-se o excelente potencial destes microrganismos para reações de redução de acetofenonas nitro-substituídas, com conversões de 98% aos álcoois quirais correspondentes (COMASSETO et al., 2004; ROCHA, 2008). Na Figura 25 pode ser observado o esquema geral de uma reação mediada pelo fungo *A. terreus* estudada por Comasseto et al. (2004).

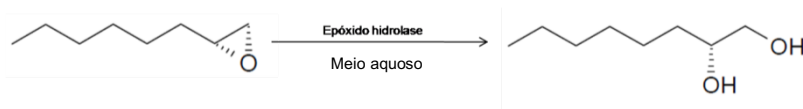
Estudos realizados com este gênero mostraram ainda a possibilidade da hidrólise de anéis epóxidos utilizando epóxido hidrolases. O produto foi obtido com pureza enantiomérica de 91% (MOUSSOU et al., 1998). Na Figura 26 está apresentado o esquema geral da reação mediada por enzimas de *A. niger*.

Figura 25 - Redução da *p*-nitroacetofenona mediada por células de *Aspergillus terreus*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

Figura 26 - Abertura de anel de epóxido mediada por *Aspergillus niger*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

Na indústria, o fungo *A. niger* é o mediador da reação de hidroxilação da progesterona na posição 11 $\alpha$ , o que elimina 37 etapas de síntese do esteróide, provocando uma considerável redução dos custos de produção (PETERSON, MURRAY e EPPSTEIN, 1952; PETERSEN, 2006). Na Figura 27 está o esquema geral da reação mediada por *A. niger*.

Figura 27 - Hidroxilação da progesterona mediada por *Aspergillus niger*.



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

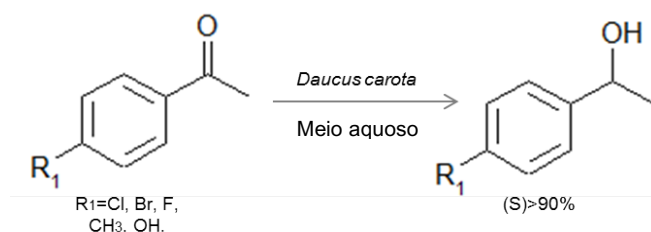
## 2.9.2 Reações de Biorredução com Vegetais

Células de vegetais são utilizadas em reações de biorredução de compostos carbonílicos e suas enzimas representam um importante meio para a obtenção de produtos de elevado valor agregado como fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas com elevada pureza ótica.

Uma descrição sobre as reações de biorredução utilizando pedaços de cenoura (*Daucus carota*) como catalisador foi feita por Yadav et al. (2002). As reações de acetofenonas substituídas foram realizadas em meio aquoso e na maioria dos casos a conversão completa aos álcoois quirais correspondentes foi obtida entre 40 e 50h com um rendimento de 70-80%

e excesso enantiomérico maior que 90%. O esquema geral das reações está apresentado na Figura 28.

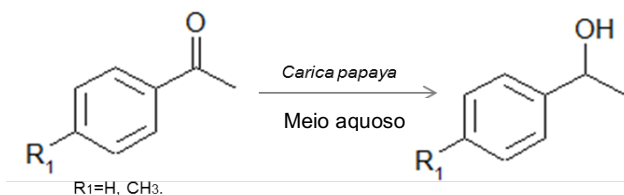
Figura 28 - Biorredução de acetofenonas utilizando *Daucus carota* (cenoura).



Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

O potencial enzimático utilizando de talos do mamoeiro para a reação de redução de acetofenonas em meio aquoso foi investigado por Jesus, Nogueira e Fonseca (2013) (Figura 29). A conversão a produto foi determinada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) com conversão de 45% para o 1-feniletanol.

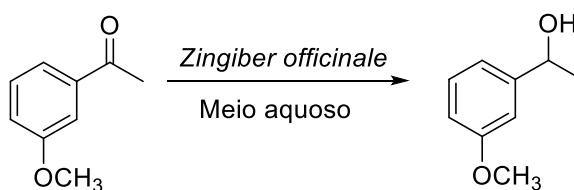
Figura 29 - Biorredução de acetofenonas a partir de células de talos de *Carica papaya*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

Alves et al. (2015) estudaram espécies vegetais encontradas na região Nordeste do Brasil, dando destaque para o *Zingiber officinale* (gengibre) como biocatalisador em reações de redução de acetofenonas. A reação foi realizada em meio aquoso e o produto foi obtido com um excesso enantiomérico de 89%. O esquema geral da reação pode ser observado na Figura 30.

Figura 30 - Biorredução da *m*-metoxiacetofenona acetofenonas mediada por gengibre.

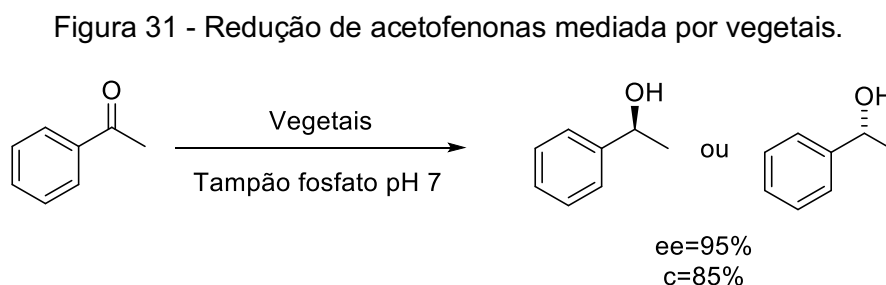


Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

Souza et al. (2012a) estudaram diversos vegetais cultivados no cerrado baiano, dentre eles a *Manihot esculenta* (mandioca), que foi utilizada na reação de biorredução de acetofenonas. O produto foi obtido com um excesso enantiomérico de 81% e conversão de 87,2%.

Usando meio aquoso, Souza et al. (2012b) estudaram a conversão de diversas acetofenonas substituídas utilizando a *Solanum melongena* (berinjela) como biocatalisador para as reações de redução. Seus melhores resultados foram com a *p*-bromoacetofenona com conversão (c) de 89,6% e excesso enantiomérico (ee) de 62%; com a *p*-nitroacetofenona c = 90,5% e ee = 99%; e com a *m*-aminoacetofenona c = 91,9% e ee = 50%.

A reação de redução da acetofenona mediada por vegetais em meio reacional tamponado com fosfato (pH = 7,0) foi realizada por Xu et al. (2010) (Figura 31). Foram utilizados os vegetais *Malus pumila* (maçã), *Daucus carota* (cenoura), *Cucumis sativus* (pepino), *Allium cepa* (cebola), *Solanum tuberosum* (batata), *Raphanus sativus* (rabanete branco) e *Ipomoea batatas* (batata doce). Para todas as reações os autores obtiveram bons resultados de conversão e excesso enantiomérico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

Portanto, verifica-se que as enzimas oriundas de espécies vegetais são responsáveis pela obtenção de diversas substâncias a partir de acetofenonas substituídas. Sabendo que na Região Amazônica encontra-se uma grande diversidade biológica de vegetais que são cultivados exclusivamente na região, se faz necessário o estudo dessas fontes de biocatalisadores para a obtenção de álcoois quirais.

## 2.10 BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA COMO FONTE DE NOVOS BIOCATALISADORES

A cobertura florestal brasileira corresponde atualmente a 477,7 milhões de hectares, dos quais, 89% estão na região amazônica que é considerada a maior floresta tropical do mundo. A região apresenta grande importância, pois possui a maior diversidade de animais e plantas do planeta. Além disso, o sistema hidrológico da bacia amazônica corresponde a um

quinto de toda a água doce do planeta (CLEMENT e HIGUCHI, 2006; BOUBLI e HRBEK, 2012).

Tal diversidade de plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias necessitam de preservação e estudo, pois estas são consideradas fontes de substâncias biologicamente ativas. Por isso diversas pesquisas de bioprospecção dos biomas brasileiros vêm sendo realizados objetivando a busca de bioprodutos com elevado valor agregado (BARREIRO e FRAGA, 1999; CORREIA, COSTA e FERREIRA, 2002).

Os números da biodiversidade amazônica são expressivos. São estimados que a região possua um terço do estoque genético da Terra, com mais de 60.000 espécies de plantas, sendo a metade de plantas superiores, de três à quatro mil espécies arbóreas muitas das quais são potencialmente madeiráveis e mais de 190 são palmeiras descritas (VALENTE e ALMEIDA, 2001; IBAMA, 2011).

As enzimas obtidas a partir dessa biodiversidade vêm sendo bastante estudadas, no entanto são poucos os relatos na literatura a respeito da utilização de vegetais amazônicos em processos biotecnológicos. Diante da crescente necessidade de busca por novos biocatalisadores, a biodiversidade vegetal amazônica é extremamente promissora para a pesquisa do seu potencial de aplicação em processos biocatalíticos.

A seguir são descritos os vegetais de origem amazônica que foram avaliados no presente estudo como biocatalisadores.

### **2.10.1 *Xanthosoma violaceum* (taioba roxa)**

O gênero *Xanthosoma* pertence ao grupo Caladidae da família Araceae e conta com cerca de 60 espécies disseminadas em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. Algumas são consideradas pelos etnobotânicos como a cultura de raiz mais antiga do mundo e são conhecidas por diversos nomes populares como taioba, malanga, guagui, taio, yautia, tanier, tania, new cocoyam, mangarito e taiá (MAYO e BOGNER, 1997; GONÇALVES, 2000).

O gênero possui origem nas Antilhas distribuindo-se na América do Sul, principalmente na Amazônia sendo cultivada ainda em países como África, Ásia, Japão, Egito e Nigéria. A taioba ocorre em áreas de floresta, no sub-bosque, à sombra da mata, preferencialmente, pois o clima é úmido e chuvoso. Em regiões de clima rigoroso a planta perde suas folhas no inverno. Devido ao seu tipo de crescimento, esta espécie não resiste à competição com outras de porte mais alto e compacto. Sua polinização é realizada principalmente por moscas e sua reprodução vegetativa ocorre por meio de estolões ou pelos caules subterrâneos conhecidos por rizomas ou tubérculos (SEGANFREDO et al., 2001; REVILLA, 2002). Na Figura 32 está apresentada a taioba roxa (*X. violaceum*).

Figura 32 - Taioba roxa (*Xanthosoma violaceum*).



Fonte: <http://www.onalee.com> (2016).

Os tubérculos da taioba são excelentes fontes de carboidratos e proteínas apresentando valores nutritivos semelhantes aos do inhame, sendo as taiobas mais ricas em elementos minerais. São duas vezes mais nutritivas que a batata devido a sua elevada quantidade de amido (LIMA, 2009).

#### **2.10.2 *Solanum sessiliflorum* (cubiu)**

O cubiu (Figura 33) é um vegetal nativo da região Amazônica, que foi primeiramente cultivado pelos povos indígenas da região antes da chegada dos europeus (SHULTES, 1984). Sob o ponto de vista econômico, o cubiu tem se mostrado uma importante matéria-prima para a agroindústria moderna, pois a planta é rudimentar, fácil de ser cultivada, muito produtiva dependendo do genótipo cultivado, podendo atingir 100 toneladas por hectares de frutos (SILVA FILHO et al., 1996).

Figura 33 - Cubiu (*Solanum sessiliflorum*).



Fonte: <http://www.sunshine-seeds.de> (2016).



A espécie apresenta carotenoides, como o  $\beta$ -caroteno e a luteína e compostos fenólicos, sendo o ácido 5-cafeoilquínico o majoritário (78% dentre os compostos fenólicos). Além disso, seu extrato apresenta elevada atividade antioxidante (RODRIGUES et al., 2013).

O cubiu é uma planta bem adaptada aos solos de várzea da Amazônia, sendo possível produzi-la com pouco ou nenhum insumo o que permite a sua comercialização a preços bem acessíveis (SILVA FILHO, ANUNCIÇÃO FILHO e NODA, 1998). Nos primeiros estágios de crescimento se desenvolve melhor em lugares sombreados demonstrando ainda uma excelente adaptação em solos ácidos e alcalinos (VILLACHICA, 1996). Cresce em áreas abertas e normalmente encontra-se em roças, sítios e tribos indígenas da região do rio Amazonas ao baixo do Solimões, cresce em temperaturas médias de 18 a 30°C com precipitação variando de 1500 a 45000 mm por ano.

O cubiu é propagado por sementes, pois, somente um fruto possui de 800 a 2000 sementes. A semeadura no campo pode ser feita em qualquer época do ano ou ainda as sementes podem ser germinadas em viveiros ou em canteiros comuns. Seus frutos podem ser utilizados sob a forma de doces, geleias, compotas, molhos, devido o conhecimento de algumas de suas características nutricionais. São aplicados ainda na indústria de cosméticos e medicamentos caseiros e industrializados com ação hipocolesterolêmica e hipoglicêmica (SILVA FILHO, 2002).

### **2.10.3 *Cissus gongylodes* (cipó kupá)**

O gênero *Cissus* é o maior da família Vitaceae, possui cerca de 350 espécies largamente distribuídas pelas regiões tropicais como África, Américas, Ásia e Austrália. Na América do Sul o *Cissus* é representado por 64 espécies sendo 17% delas com disco floral bem desenvolvido com folha simples e apenas uma semente por fruto. No entanto existem casos de espécies compostas por mais folhas e em seus frutos estão contidas um maior número de sementes (LOMBARDI, 2000). As espécies geralmente ocorrem em matas primárias, secundárias, cerrados, caatingas, campos, vegetações de altitude e litorânea. Seus arbustos são escandescentes, nodosos, com râmulos articulados, folhas inteiras ou lobadas com duas estípulas peciolares (CORREA, 1926; BERG, 1993; LOMBARDI, 2000).

Conhecido popularmente como cipó kupá, cará de espeinho, cipó-babão, uva-do-mato, parreira-brava e cupá o *C. gongylodes* utilizado para amenizar processos inflamatórios, cálculos renais e biliares. É largamente distribuído pela Colômbia, Venezuela, Peru e no Brasil nos estados do Pará, Maranhão, Ceará, Mato Grosso, Minas gerais e São Paulo (LOMBARDI, 2002).

A espécie é popularmente utilizada no tratamento de processos inflamatórios e de cálculos renais e biliares, e apresenta taninos, flavonóides e alcaloides (NAVARRO, 2009). O cipó kupá está apresentado na Figura 34.

Figura 34 - Cipó kupá (*Cissus gongylodes*).



Fonte:<http://www.ufrgs.br> (2016).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar reações de biorredução de acetofenonas substituídas em meio aquoso, meio orgânico e em sistema bifásico, utilizando como biocatalisador as células íntegras de *Aspergillus sp.* e de vegetais para obtenção de substâncias com elevada pureza enantiomérica.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar as reações de biorredução da *p*-aminoacetofenona, *p*-nitroacetofenona, *p*-hidroxiacetofenona e *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas por células de *Aspergillus sp.* e de vegetais para a produção de alcoóis opticamente puros;
2. Selecionar linhagens de *Aspergillus* produtores de álcool desidrogenase;
3. Avaliar o desempenho das reações biocatalíticas em sistema bifásico, meio orgânico e meio aquoso;
4. Analisar o produto da bioconversão a fim de selecionar os biocatalisadores que fornecem as melhores conversões a produto e os melhores excessos enantioméricos nessas reações;
5. Verificar o melhor sistema biocatalítico para a conversão dos substratos estudados.

## REFERÊNCIAS

- AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática**, Lisboa: LIDEL – Edições técnicas, 2003.
- 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.
- ALBUQUERQUE, P. M. **Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na redução de substratos carbonílicos**, 2007, 161p. Tese de doutorado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2007.
- ALVES, L. A.; BERTINIA, L. M.; BIZERRAA, A. M. C.; MATTOS, M. C.; MONTE, F. J. Q.; LEMOS, T. L. G.; *Zingiber officinale* (gingibre) como fonte enzimática na redução de compostos carbonílicos, **Química nova**, v. 38, n 4, p. 483-487, 2015.
- ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, current status and future challenges of green chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 9, p. 686-694, 2002.
- ANASTAS, P. T.; Warner, J.; **Green Chemistry: Theory and Practice**, Oxford: Oxford University Press, 1998.
- BARON, A.M., “Biocatálise em ambientes aquo-restrictos: comparação de diferentes sistemas reacionais”, tese de mestrado, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- BAUER JR, W. Methacrylic Acid and Derivatives. In John Wiley & Sons (Orgs). **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Weinheim: Wiley-VCH, v. 32, 2003.
- BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (Eds.) **Aspergillus: Molecular Biology and Genomics**. Caiser Academic Press, Portland, p. 1-17, 2010.
- BERG, M. E. V. D. **Plantas Medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2ed. p. 207, 1993.
- BON, E. P. S; ANTONIETA, M. F; LUÍSA, M. C; VERMELHO, A. B; PAIVA, C. L. A; BICCA., R. A; COELHO, R. R. R. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.
- BORMAN, S. Beta-peptides: natureimproved. **Chemical & Engineering News**, v.16, p. 32-35, 1997.
- BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic Methods**, 5º ed, Londres: Blackie, 1996.
- BROWN, T. L.; LEMAY, H. E. Jr.; **Química a ciência central**, 9º ed, São Paulo: Pearson, p. 512-899, 2007.
- BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**, v. 1. 4º ed. São Paulo: Pearson, 2006.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O.; **Bioquímica**, São Paulo: Cengage Learning, 2011.

CÁNOVAS, M.; IBORRA, J. L. Whole cell biocatalysts stabilizations for L-carnitine productions. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 3-4, p 149-158, 2005.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927-934, 2007.

COMASSETO, J. V.; ANDRADE, L.H.; OMORI, A. T.; ASSIS, L.F.; PORTO, A. L. M. Deracemization of aryl ethanols and reduction of acetophenones by whole fungal cells of *Aspergillus terreus* CCT 4083, *Aspergillus terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT 4964. **Jornal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 55-61, 2004.

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

CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 4, p. 130, 1926.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, n. 18, p. 499-514, 2000.

DICKINSON, R. E.; CICERONE, R. J.; Future global warning from atmospheric trace gases. **Nature**, v. 319, p 109-115, 1986.

DIEDERICHS, S.; LINN, K.; LUCKGEN, J.; KLEMENT, T.; GROSCH, J. H.; HONDA, K.; OHTAKE, H.; BUCHS, J.; High-level production of (5S)-hydroxyhexane-2-one by two thermostable oxidoreductases in a whole-cell catalytic approach. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 121, p. 37-44, 2015.

DUPONT, J.; Economia de átomos, engenharia molecular e catálise organometálica bifásica: conceitos moleculares para tecnologias limpas, **Química Nova**, v. 6, n. 23, p. 825-831, 2000.

DURÁN, N.; CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R. Biotransformations by microorganisms, organisms and enzymes: state of art. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 45, p.109-121, 2000.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H.; MANDER, L. N.; **Stereochemistry of Organic Compounds**, New York: John Wiley & Sons, cap.12, 1994.

EMBERGER, R.; HOPP, R.; Synthesis and sensory characterization of menthol enantiomers and their derivatives for the use in nature identical peppermint oils. **Specialty Chemicals**, v. 7, p. 193-201, 1987.

ENZIMAS CATALISADORAS DE REAÇÕES BIOLÓGICAS. São Paulo: FUNCIONAIS & NUTRACÊUTICOS. 2006. Disponível em: <[http://www.insumos.com.br/funcionais\\_e\\_nutraceuticos/materias/86.pdf](http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/86.pdf)> Acesso em: 08 de nov. 2015

FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**, 3<sup>ed</sup>, New York: Springer-Verlag, 1997.

FELIX, G. Regioselectively modified polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 171-184, 2001.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, p 1-10, 2007.

GONÇALVES, E. G. *Xanthosoma riparium* (Araceae), a new species from Goiás, Brazil. **Novon**, v. 10, n. 1, p. 26-28, 2000.

HE, J. Y.; SUN, Z. H.; RUAN, W. Q.; XU, Y. Biocatalytic synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxy-butanoate in an aqueous-organic solvent biphasic system using *Aureobasidium pullulans* CGMCC 1244. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 244-249, 2006.

HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D. Enzymatic reductions for the chemist. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2285-2314, 2011.

ILLANES, A. **Biotecnología de Enzimas**, Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile, 1994.

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

ISÔMEROS PERIGOSOS. Mundo Educação. Disponível em: <<http://www.mundoeducacao.com/quimica/isomeros-perigosos.htm>> Acesso em 05 de Novembro de 2015.

JESUS, I. S. de; NOGUEIRA, F. B.; FONSECA, A. M.; Redução de compostos carbonílicos: os talos de mamoeiro (*Carica papaya*) como reagente biocatalisador, **Scientia Plena**, v. 9, n. 7, p. 1-8, 2013.

JONES, J. B. Enzymes in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 42, n. 13, p. 3351-3403, 1986.

KAGAN, H. B. In: **Comprehensive Organometallic Chemistry**; Wilkinson, G; Stone, G. A., (Eds.) London: Pergamon Press, v. 8, cap. 53, 1982.

KEPPLER, A. F. **Biotransformação de cetonas aromáticas e cíclicas promovidas por fungos**. 2005. 76 p. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2005.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmeldiagnose, 116 f, 2002.

LENARDÃO, J. E.; ANTÔNIO, R. F.; DABDOUB, M. J.; FERREIRA, A. C. B.; CRUZ, C. S.; “Green chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química nova**, v. 26, n. 1, p.123-129, 2003.

LIMA, T. de A. **Caracterização de compostos nutricionais e antinutricionais em taiobas (*Xanthosoma schott*)**. 2009. 69p. Dissertação de Mestrado em Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

LOMBARDI, J. A. Vitaceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. (Coords.) **Flora Fenológica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Hucitec, v. 2, p. 365-374, 2002.

LOMBARDI, J. A. Vitaceae: Gêneros *Ampelocissus*, *Ampelopsis* e *Cissus*. **Flora Neotropica**, v. 80, p. 1-250, 2000.

MATSUDA, R.; YAMANAKA R.; NAKAMURA K.; Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 5, p. 513-557, 2009.

MAYO, S. J.; BOGNER, P. C. **The Genera of Araceae**. Reino Unido: Kew Publishing, 1997.

McNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic Gas Chromatography**, New York: Wiley, 1998.

MENG, F.; XU, Y. Improved production of (*R*)-2-octanol via asymmetric reduction of 2-octanone with *Oenococcus soeni* CECT4730 in a biphasic system. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 2, p. 144-149, 2010.

MONTEIRO, V. N.; NASCIMENTO, R. S.; Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, Ano 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MOTTA, P. W. **Bioquímica Básica**, Medbook. Cap. 2. 2002.

MOUSSOU, P.; ARCHELAS, A.; BARATTI, J.; FURTOSS, R. Determination of the regioselectivity occurring during oxirane ring opening by epóxido hydrolases: a theoretical analysis and a new method for its determination. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 9, p. 1539-1547, 1998.

NAVARRO, F. F. *Cissus gongylodes*: caracterização farmacognóstica e investigação de aspectos preliminares da seguridade da utilização de extratos aquosos das folhas e caules. 2009. 70p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica**. 5ª ed. São Paulo: Sarvier, p. 183-200, 2002.

NOBEL PRIZE, Emil Fischer–Facts. Disponível em: < [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1902/fischer-facts.htm](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1902/fischer-facts.htm) > Acesso em: 04 de Novembro de 2015a.

NOBEL PRIZE, Award ceremony speech. Disponível em: < [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1946/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1946/press.html) > Acesso em: 02 de Novembro de 2015b.

OMORI, A. T.; PORTAS, V. B.; de OLIVEIRA, C. de S.; Redução enzimática do 4-(dimetilamino) benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): um experimento simples na compreensão da biocatálise. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 435-437, 2012.

PALMER, T.; BONNER, P. L.; **Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry** Cambridge: Woodhead, p. 67–75, 1995.

PESSOA, F. L. P.; MACH, E. Q.; HEMERLY, A. C.; **Introdução aos Processos Químicos**, Escola de Química UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, 2001.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**, 2006, 208 f. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C.; EPPSTEIN, S. H. Microbiological transformations of steroids. 1. Introduction of oxygen at carbon – 11 of progesterone. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 5933-5936, 1952.

PINHEIRO, D. S. **Redução enantiosseletiva de cetonas utilizando fungos endofíticos da Amazônia**. 2010. 111 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2<sup>o</sup>ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997.

PORTE, A.; PORTE, L. H. M.; OLIVEIRA, I. M. de. Cromatografia gasosa quiral na resolução de enantiômeros envolvidos em *flavours* de frutas, **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1679-1679, 2014.

REVILLA, J. **Plantas Úteis da Bacia Amazônica**. Manaus: INPA, v. 2, 2002.

ROCHA, L. C. **Redução de derivados de acetofenonas com fungos de origem marinha**. 2008. 126 p. Dissertação de Mestrado em Físico-Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2008.

RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. **Características gerais do processo catalítico por enzimas oxidorreduzases**. In: II Workshop de Biocatálise, UNICAMP – São Paulo, 2004.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 3022-3029, 2013.

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

SATO, K.; AOKI, M.; NOYORI, R. A "Green" route to adipic acid: direct oxidation of cyclohexenes with 30 percent hydrogen peroxide, v. 281, p 1646-1647, **Science**, 1998.

SCHURIG, V. Separation of enantiomers by gas chromatography, **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 275-299, 2001.

SEGANFREDO, R.; FINGER, F. L.; BORROS, R. S.; MOSQUIM, P. R. Influência do momento de colheita sobre a deterioração pós-colheita em folhas de taioba. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 316-319, 2001.

SHELDON, R. A. Atom utilizations, E factors and the catalytic solution. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Series IIC – Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 541-451, 2000.

SIEGEL, H.; EGGERSDORFER, M. Ketones. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Weinheim: Wiley-VCH, v. 20, p. 187-207, 2012.

SIFNIADES, S.; LEVY, A. B; BAHL, H. Acetone. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Weinheim: Wiley – VCH, 2011.

SILVA FILHO, D. F. da **Discriminação de etnovarietades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal, Solanaceae) da Amazônia, com base em suas características morfológicas e químicas**. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - Instituto de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2002.

SILVA FILHO, D. F. da; ANUNCIAÇÃO FILHO, C. J. da; NODA, H. Estimativas de herdabilidade e correlações entre caracteres em populações de Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazônia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 20, n.1, p. 60-67, 1998.

SILVA-FILHO, D. F. da; ANUNCIAÇÃO FILHO, C. J. da; NODA, H.; REIS, O. V. dos Variabilidade genética em populações naturais de cubiu da Amazônia. **Horticultura Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 9-15, 1996.



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

SOARES, M. F. **Aplicação da relação entre estrutura e retenção cromatográfica (qsrr) empregando diferentes descritores para cumarinas, acetofenonas e triterpenos. estudo de um novo índice para alcanos e alcenos**. 2000. 189 p. Tese de Doutorado em Química Analítica. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, 10<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: LTC, 189 p. 2010.

SOUZA, D. M.; PAIVA, M. S.; MAIA, F. F.; BRAGA, V. S.; LEMOS, T. L. G. de; MACHADO, L. L.; **Biorredução da acetofenona utilizando células íntegras de vegetais cultivados no Cerrado da Bahia**. In: Workshop de Biotatálise e Biotransformação, Fortaleza, 2012a.

SOUZA, J. M. O.; BERTINI, L. M.; SOARES, A. A.; SILVA, F. F. M.; MATTOS, M. C.; LEMOS, T. L. G.; **Biorredução da acetofenona e derivados utilizando células íntegras de *Solanum melongena* (Berinjela)**. In: In: Workshop de Biotatálise e Biotransformação, Fortaleza, 2012b.

TAMAMES, J. Acerca de biologia celular e molecular. Disponível em: <<http://bmc.jtamames.eu/index.html>> Acesso em 02 de Novembro de 2015.

TEMBA, A. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI, C. L.; Álcoois quirais: Métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimetria. **Química Nova**, v – 26, n – 1, p 112 – 122, 2003.

THOMAS, J. M.; RAJA, R.; SANKAR, G.; BELL, R. G.; LEWIS, D. W. Benign by design. New catalysts for an environmentally conscious age, **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1087-1101, 2001.

TUCKER, J. L. Green chemistry, a Pharmaceutical Perspective. **Organic Process Research and Development**, v. 10, n. 2, p.315-319, 2006.

VALENTE, R. M.; ALMEIDA, S. S. **As palmeiras de Caxiuanã: informações botânicas e utilização por comunidades ribeirinhas**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi/ Universidade Federal do Pará, p. 54, 2001.

VARGA, J. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 5-6, p. 627-640, 2004.

VELLASCO JÚNIOR, W. T. J; Métodos de preparação industrial de solventes e reagentes químicos. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p 339-343, 2011.

VIEIRA, R. **Fundamentos de Bioquímica**: Textos didáticos. Belém – PA. 2003.

VILLACHICA, H. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia**. In: Tratado de Cooperacion Amazonica, p. 367, 1996.

XU, C.; ZHONGHUA, Y.; RONG, Z.; GAI, Y.; JIABAO, Y.; Production of chiral aromatic alcohol by asymmetric reduction with vegetable catalyst, **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n 6, p. 1029-1033, 2010.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; THIRUPATHI-REDDY, P.; BHASKAR-RAO, A. J. Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 3900-3903, 2002.

ZHANG, T. Y.; Process chemistry: the science, business, logic and logistics. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 7, p. 2583-2595, 2006.

ZHENG, G. W.; XU, J. H.; New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 784-792, 2011.

## CAPÍTULO I

**Estudo da redução de acetofenonas utilizando fungos do gênero *Aspergillus* para obtenção de substâncias com elevada pureza enantiomérica de interesse farmacológico**

Estudo da redução de acetofenonas utilizando fungos do gênero *Aspergillus* para obtenção de substâncias com elevada pureza enantiomérica de interesse farmacológico.

Santiago, P. A. L.; Duvoisin Junior, S.; Albuquerque, P. M.

*Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil.*

## Resumo

A busca por novos biocatalisadores é de grande interesse das indústrias química e farmacêutica, uma vez que estes favorecem a formação de produtos enantiomericamente puros com alta especificidade e eficiência. A redução assimétrica de acetofenonas mediada por fungos configura-se como uma ferramenta interessante na preparação de álcoois quirais, importantes intermediários para a síntese de substâncias bioativas. A região Amazônica possui uma vasta diversidade de fungos que ainda não foi avaliada quanto às suas propriedades biocatalíticas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo investigar o uso de fungos do gênero *Aspergillus* sp. para reações de redução da *p*-aminoacetofenona, *p*-hidroxiacetofenona, *p*-nitroacetofenona e *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona. Inicialmente realizou-se uma triagem das linhagens produtoras de álcool desidrogenases em meio sólido. Os fungos selecionados foram utilizados nas reações de redução das acetofenonas substituídas. As reações de biorredução foram avaliadas em três sistemas: orgânico (hexano), bifásico (tampão fosfato e hexano) e aquoso (tampãofostato). Os fungos foram cultivados em meio líquido por um período de cinco dias, foram então filtrados e os micélios secos. 50 mg dos micélios secos foram adicionados ao meio reacional (40 mL) contendo o substrato carbonílico (1,0 mmol). Após 24 h, a reação foi analisada por cromatografia em fase gasosa equipada com coluna quiral. A atividade enzimática de oxidorreduções pôde ser observada para todas as reações, obtendo-se valores de excesso enantiomérico de até 99%. A cepa ATCC 9642 promoveu as maiores conversões a produto com elevada enantiosseletividade na redução da *p*-nitroacetofenona ( $c=53,7\%$ ) e da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona ( $c=32,2\%$ ) ambas em sistema bifásico, em meio orgânico a cepa ATCC9642 foi capaz de reduzir a *p*-aminoacetofenona com elevada enantiosseletividade ( $c=11\%$ ). No estudo das condições reacionais onde alterou-se o tempo, a concentração do substrato e o pH verificou-se que desses somente o tempo e o pH influenciaram de maneira significativa a redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona. Portanto, verifica-se o potencial de linhagens de *Aspergillus* como biocatalisadores em reações de redução enantiosseletivas.

## 1 INTRODUÇÃO

Os álcoois enantiomericamente puros são amplamente utilizados como blocos construtores de diversas substâncias e são largamente explorados pela indústria farmacêutica, agroquímica e de biotecnologia. Um método conhecido para obtenção dessas substâncias é através da reação de redução mediada por enzimas na redução de cetonas pró-quirais como as acetofenonas (XU, ZHOU e BORNSCHEUER, 2005; MAHMOUDIAN, 2009).

Enzimas são catalisadores biológicos altamente seletivos que atuam em condições reacionais brandas e abaixam a energia de ativação dessas reações fazendo assim com que a velocidade das mesmas aumente. Podem ser encontradas em tecidos de animais, plantas ou microrganismos. Fungos como os do gênero *Aspergillus* se mostram atraentes por produzirem enzimas da classe das oxidorreduções, capazes de biotransformar substratos

carbonílicos de forma eficiente para que assim se possam obter álcoois quirais com elevado grau de pureza enantiomérica (USAMI, MOTOOKA e MIYAZAWA, 2014). As acetofenonas são precursoras de álcoois quirais importantes para a produção de diversos fármacos e produtos naturais (HOMOLA et al., 2016), no entanto, faz-se necessária a elaboração de novas metodologias para a síntese de seus derivados com uma maior eficiência.

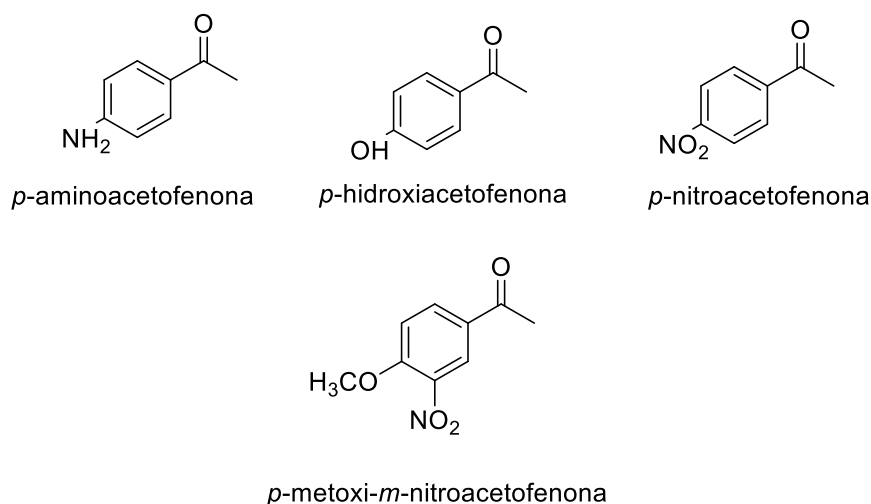
Portanto, no presente trabalho foram realizadas reações de redução em sistemas reacionais não convencionais como meio orgânico e sistema bifásico, com fungos do gênero *Aspergillus* esperando-se assim determinar uma metodologia eficiente para a redução enantiosseletiva de acetofenonas substituídas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 REAGENTES

Metanol (Panreac) e  $\text{NaBH}_4$  (Neon) foram utilizados na síntese dos padrões de álcoois racêmicos. Hexano (J.T. Baker grau HPLC) foi utilizado como meio orgânico nas reações de biorredução.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Synth) e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Synth) foram utilizados no preparo da solução tampão pH 7,0.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Synth) e ácido cítrico (Synth) foram utilizados no preparo da solução tampão pH 4,5. Os substratos carbonílicos (Figura 1) *p*-aminoacetofenona (Sigma), *p*-nitroacetofenona (Sigma), *p*-hidroxiacetofenona (Sigma) e *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona (Sigma) foram utilizados nas reações de redução. A análise preliminar dos produtos foi realizada em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) com base de alumínio (Merck). O meio Batata-Dextrose-Agar (BDA, Neogen) foi usado no cultivo dos fungos. Fucsina-básica (Synth) foi utilizada no teste de prospecção de álcool desidrogenase (ADH).

Figura 1 - Estrutura dos substratos carbonílicos utilizados nas reações de biorredução.



## 2.2 EQUIPAMENTOS

Os microrganismos foram manipulados em cabine de segurança biológica (Pachane) e seu crescimento foi realizado em câmara de crescimento biológico tipo BOD (Novatecnica). A autoclave (Phoenix Luterco) foi utilizada para esterilizar material ou descontaminar vidrarias. As reações de biorredução foram realizadas em agitador do tipo *shaker* (Tecnal) com controle de temperatura e agitação. Os padrões racêmicos foram concentrados em rotaevaporador (Fisatom). As reações de redução foram analisadas e seus respectivos produtos foram quantificados em Cromatógrafo em Fase Gasosa com Detector de Ionização de Chama e Detector de Condutividade Térmica (Shimadzu) equipado com coluna de fase quiral (SUPELCO – Beta DEX 325 30m x 0,25mm x 0,25µm).

## 2.3 MICRORGANISMOS

Os 18 fungos do gênero *Aspergillus* utilizados neste trabalho foram isolados como endófitos da espécie amazônica *Myrcia guianensis* por Banhos (2011) e encontram-se preservados na coleção de trabalho do laboratório de Química Aplicada à Tecnologia da Escola Superior de Tecnologia (EST-UEA). Neste estudo também foi utilizada uma cepa comercial de *Aspergillus brasiliensis* (ATTC - 9642).

Os microrganismos foram reativados de modo tripontual em placas de Petri contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA). O inóculo foi aplicado com o auxílio de ponteira de 200 µL e pipeta automática. Foram adicionados 10 µL para cada ponto da placa. Este método foi utilizado para a constatação da pureza do microrganismo, e logo em seguida as cepas foram incubadas em BOD por quatro dias a 28°C (SILVA, 2013a).

Posteriormente foram preparadas lâminas de microcultivo para confirmação da pureza das linhagens em nível microscópico. Os conídios foram suspensos em tubos criogênicos estéreis de 2,0 mL contendo 1,5 mL de glicerol a 20%, formando a suspensão de esporos padronizados na escala 1 de McFarland. As cepas foram mantidas em geladeira a 3°C.

## 2.4 SÍNTESE DOS PADRÕES RACÊMICOS

A redução dos substratos carbonílicos por via química foi realizada com o agente redutor NaBH<sub>4</sub> segundo metodologia descrita por Vogel (1974) com modificações. Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 1,0 mmol do substrato carbonílico dissolvido previamente em 20 mL de metanol e 3,0 mmol do agente redutor. A reação ocorreu à temperatura controlada, entre 20 e 25°C. A formação do produto foi acompanhada por CCD sendo usado como eluente hexano:acetato de etila na proporção de 9:1 ou 8:2. Em seguida

foram reveladas com luz U.V nos comprimentos de onda 254 nm e 265 nm. Por fim, a mistura reacional foi tratada com 15 mL de solução saturada de NaCl e logo em seguida extraída com 60 mL de éter dietílico. A fase orgânica foi em seguida rotaevaporada. Os álcoois racêmicos obtidos foram submetidos à análise em cromatógrafo gasoso com coluna de fase quiral (CGQ).

## 2.5 TESTE DE ATIVIDADE DE ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH)

O meio de cultura utilizado na prospecção da atividade de ADH foi o proposto por Ribeiro et al. (2013). Foram dissolvidos 50 mg de fucsina básica em um litro de meio sintético BDA. O meio foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C e 1 atm. Em seguida o meio foi vertido em placas de Petri estéreis e armazenado em geladeira até o dia do teste. Neste ensaio, o piruvato formado no metabolismo da glicose, segue para a rota da fermentação alcoólica produzindo o acetaldeído, que logo em seguida é reduzido a etanol pela ação da ADH. A fucsina básica reage com o acetaldeído, ocasionando sua redução a álcool promovida pela ADH, mudando a coloração das colônias do fungo para rósea (WU et al., 2007).

## 2.6 PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR (LINHAGENS DE *Aspergillus*)

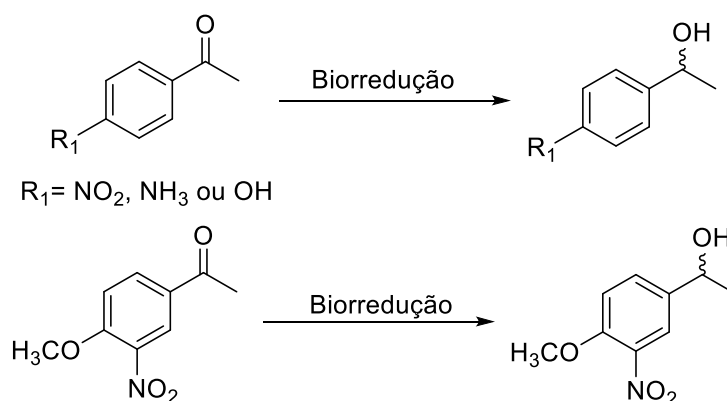
Em um béquer de 1 L foram adicionados 10 g de peptona e 20 g de dextrose que atua como fonte de carbono e indutor das oxidoredutases (KEPPLER, 2005). O meio pronto foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 120°C e 1atm por 15 minutos.

Os fungos foram cultivados em triplicata, e para isso foram inoculados 50 µL da suspensão de esporos, preparada de acordo com o item 4.6, em câmara de segurança biológica. Os frascos foram incubados a 30°C, sob agitação orbital constante de 150 rpm durante 5 dias. Os micélios dos fungos foram coletados do meio de cultura por meio de filtração a vácuo, em seguida foram lavados com água destilada e acetona e por fim foram secos durante 5 dias em dessecador (ZANOTTO et al., 2009).

## 2.7 REAÇÕES BIOCATALÍTICAS DOS SUBSTRATOS CARBONÍLICOS

As reações de biorredução mediadas por micélios ocorreram segundo o esquema apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Biorredução da acetofenonas substituídas mediada por *Aspergillus* sp.



Os micélios secos de *Aspergillus* sp. foram utilizados nas reações de redução das substâncias carbonílicas. Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 1,0 mmol dos substratos carbonílicos previamente solubilizados em DMSO e 50 mg do biocatalisador. Em seguida foram adicionados 40 mL de hexano (meio orgânico), ou 20 mL de hexano e 20 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 (meio bifásico), ou 40 mL de solução tampão fosfato pH 7 (meio aquoso). A mistura reacional foi levada ao agitador rotativo tipo *shaker* a 160 rpm e 30°C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os experimentos foram acompanhados durante 24 h. Os produtos das reações foram analisados por CGQ. As alíquotas retiradas dos experimentos realizados em meio aquoso foram extraídas com acetato de etila antes de serem analisadas (OMORI, PORTAS e OLIVEIRA, 2012).

## 2.8 ANÁLISE EM CROMATÓGRAFO GASOSO DE FASE QUIRAL (CGQ)

A análise da formação do produto foi realizada em cromatógrafo gasoso equipado com coluna de fase quiral sob as seguintes condições de análise: split na razão de 1:20, temperatura inicial e final da coluna de 100°C e 210°C, respectivamente e rampa de aquecimento de 4°C por minuto. A pressão do gás carreador H<sub>2</sub> foi de 75 kPa, a temperatura do injetor de 250°C e do detector 275°C. Os tempos de retenção dos álcoois quirais formados foram confirmados com a injeção dos padrões racêmicos.

## 2.9 DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO E DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO

Para a determinação da porcentagem de conversão (%c) e do excesso enantiomérico (ee), as alíquotas retiradas dos experimentos foram analisadas por CGQ. As áreas dos picos dos substratos e dos produtos foram comparadas e sua soma considerada 100% (AITKEN e KILÉNYI, 1992).



O grau de seletividade foi determinado segundo a equação abaixo.

$$ee (\%) = \frac{(R - S)}{(R + S)} \times 100$$

Onde *R* e *S* são as quantidades relativas dos enantiômeros (*R*) e (*S*).

## 2.10 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Após a triagem dos fungos nos diferentes sistemas biocatalíticos, foi realizado um planejamento fatorial, a fim de verificar a influência da concentração de substrato, do tempo de reação e do pH do meio sobre a conversão ao produto das reações de redução. O Software Statistica 7.0 foi utilizado para a análise dos dados, com nível de significância de 95%.

Para as reações em meio orgânico foi realizado um planejamento experimental fatorial completo  $2^2$ , utilizando como variáveis de estudo o tempo de reação (*t*) e a concentração do substrato carbonílico (*S*). A matriz do planejamento experimental está apresentada na Tabela 1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  para as reações biocatalíticas mediadas por *Aspergillus* sp. realizadas em meio orgânico.

Ensaio	S (mg/mL)	t (h)
1	30	24
2	50	24
3	30	360
4	50	360

S = concentração de substrato; t = tempo de reação.

Para as reações realizadas em sistema bifásico foi realizado um planejamento experimental fatorial completo  $2^3$ , utilizando como variáveis de estudo o tempo de reação (*t*), a concentração do substrato carbonílico (*S*) e o pH do meio aquoso. A matriz do planejamento está apresentada na Tabela 2. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo  $2^3$  para as reações biocatalíticas mediadas por *Aspergillus* sp. realizadas em meio bifásico.

Ensaio	S (mg/mL)	t (h)	pH*
1	30	24	4,5
2	50	24	4,5
3	30	360	4,5
4	50	360	4,5
5	30	24	7,0
6	50	24	7,0
7	30	360	7,0
8	50	360	7,0

S = substrato; t = tempo de reação. \*pH4,5= tampão citrato/fosfato; pH 7,0 = tampão fosfato.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 SÍNTESE DOS ÁLCOOIS RACÊMICOS

As reações de redução e oxidação de cetonas utilizando o  $\text{NaBH}_4$  e peroxiácidos já são bem conhecidas. Devido ao fato de serem reagentes aquirais, suas reações produzem misturas racêmicas de enantiômeros (50% *R* e 50% *S*) (SOLOMONS e FRYHLE, 2010). Neste estudo realizou-se a reação de redução dos substratos carbonílicos para a obtenção dos álcoois racêmicos padrões para as análises em cromatografia gasosa quiral.

Nas Figuras 3-6 estão apresentados os cromatogramas obtidos para as alíquotas das reações com  $\text{NaBH}_4$  dos substratos *p*-aminoacetofenona, *p*-nitroacetofenona, *p*-hidroxiacetofenona e *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona e dos respectivos álcoois racêmicos.

Figura 3 - Cromatograma da *p*-aminoacetofenona e dos álcoois quirais (padrão racêmico).

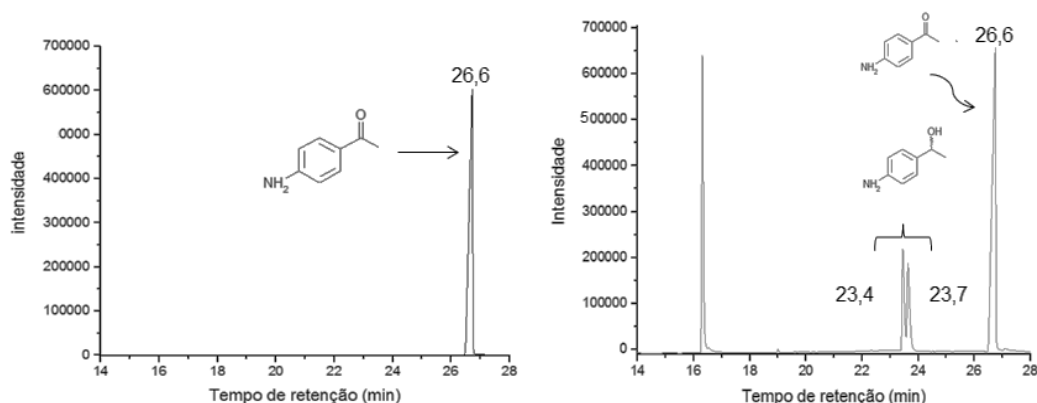


Figura 4 - Cromatograma da *p*-nitroacetofenona e dos álcoois quirais (padrão racêmico).

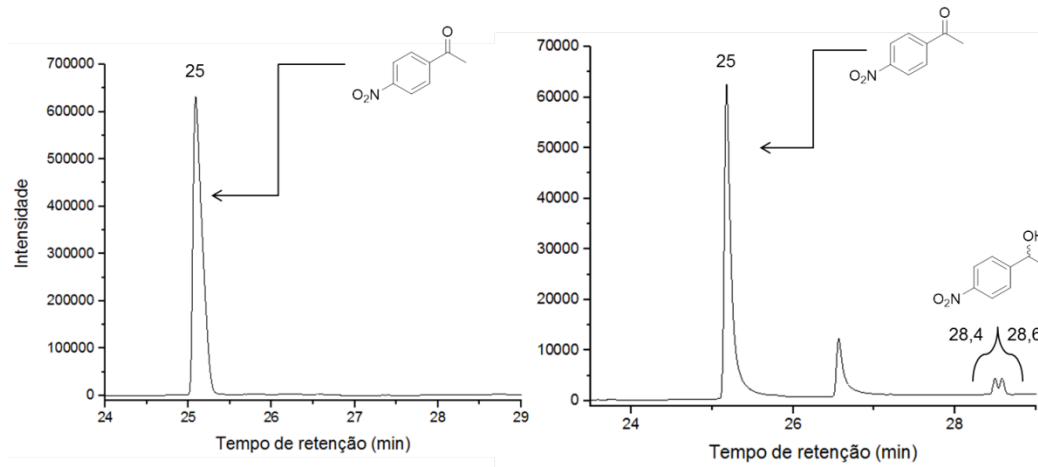


Figura 5 - Cromatograma da *p*-hidroxiacetofenona e dos álcoois quirais (padrão racêmico).

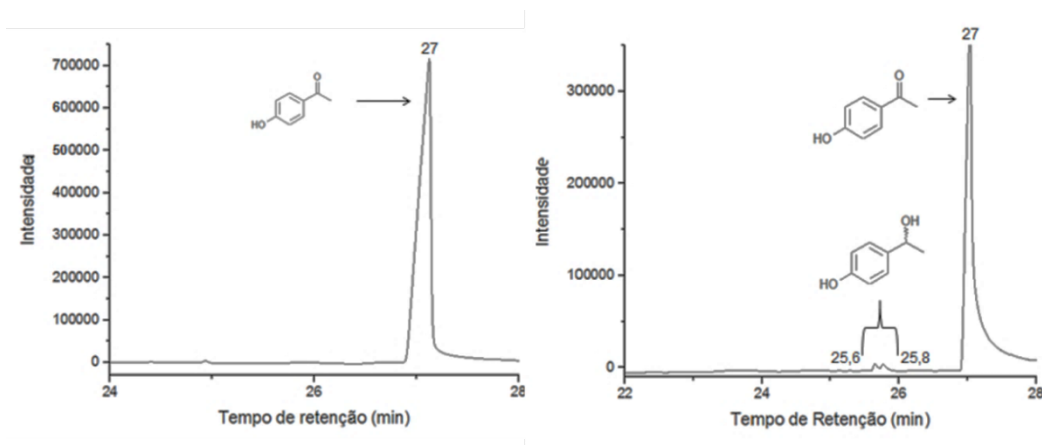
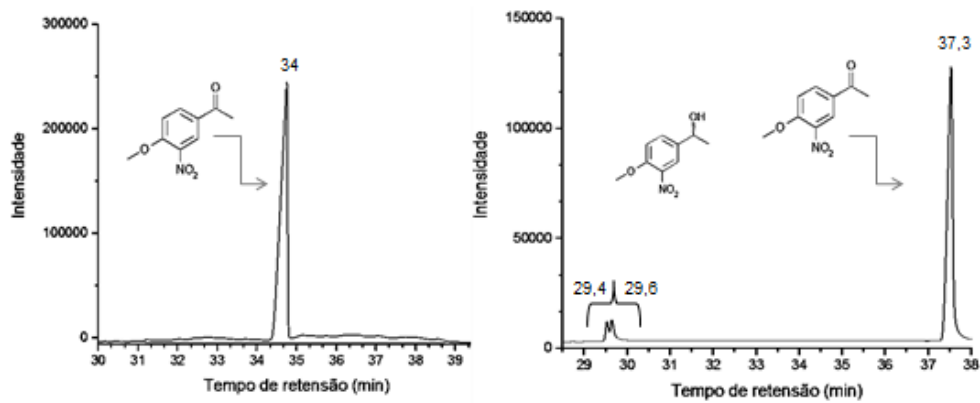


Figura 6 - Cromatograma da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona e dos álcoois quirais (padrão racêmico).



Nas reações promovidas pelo reagente  $\text{NaBH}_4$  foi possível identificar a produção dos padrões de álcoois racêmicos bem como os seus respectivos tempos de retenção. Desta maneira, este parâmetro serviu de comparação para os cromatogramas das reações biocatalíticas para que assim fossem determinados os valores de conversão e ee. Esta comparação foi feita de acordo com o aparecimento dos picos cromatográficos seguindo a ordem de produto 1, produto 2 e pico do reagente.

Alves e Morais (2002) estabeleceram que o uso de substâncias químicas como padrão conduzem a melhorias significativas nos resultados analíticos, sendo estas empregadas na calibração de instrumentos, validação de metodologias e comparação de resultados. Esta metodologia de redução promovida por  $\text{NaBH}_4$  tem sido utilizada com segurança em diversos trabalhos publicados como o de Zanotto (2003), Albuquerque et al. (2007), Frota et al. (2011), Parente (2012) e Tozetto et al. (2015) com o objetivo de confirmação e comparação dos resultados obtidos em reações enantiosseletivas.

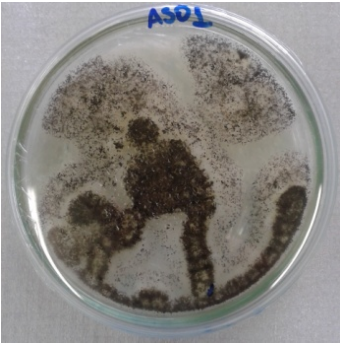


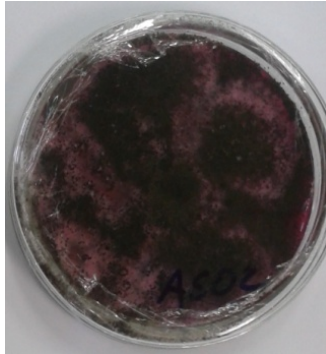

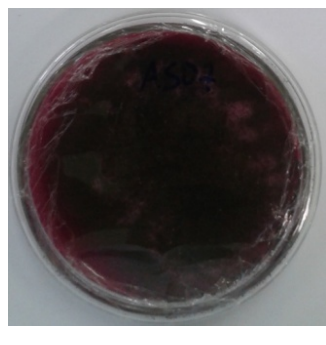
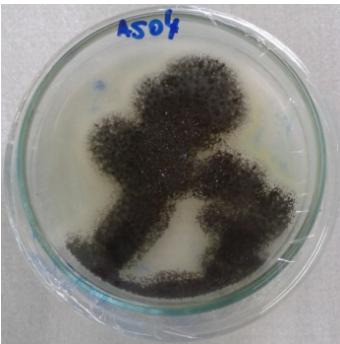

### 3.2 PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH)

A prospecção de microrganismos que expressam ADH tem sido alvo de vários estudos e com isso, novas metodologias para a triagem destes microrganismos utilizando diferentes fontes de carbono e reagentes colorimétricos vêm sendo desenvolvidas (RIBEIRO et al., 2013).

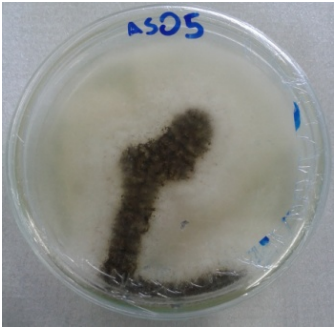

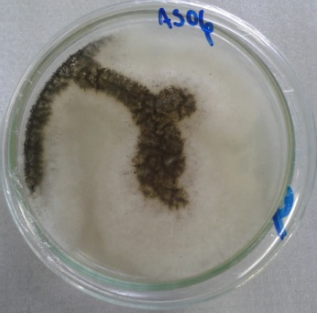
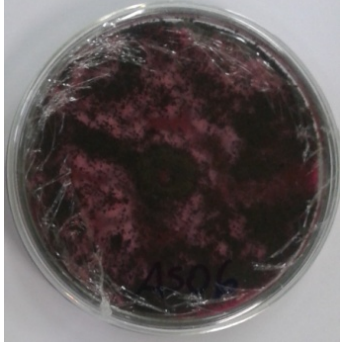

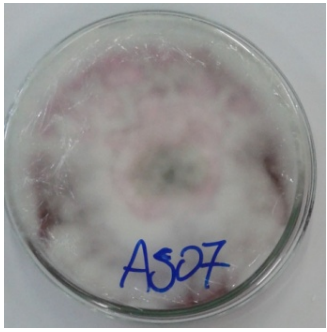


Neste estudo foi usado o método qualitativo utilizando-se a dextrose como fonte de carbono indutora da produção da ADH e a fucsina básica como reagente colorimétrico, para a detecção da expressão da ADH de fungos. De acordo com a intensidade da cor rósea que as colônias adquiriram, estas foram agrupadas em baixa (+) e alta (++) . Este parâmetro foi criado a fim de selecionar os melhores produtores dessas enzimas.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos ensaios realizados, com as fotos das colônias fúngicas antes e após a formação de cor indicativa da produção de álcool desidrogenase.

Tabela 3 - Resultados da prospecção da atividade de ADH em fungos do gênero *Aspergillus* em meio suplementado com fucsina básica.

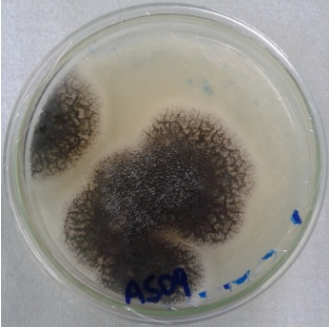
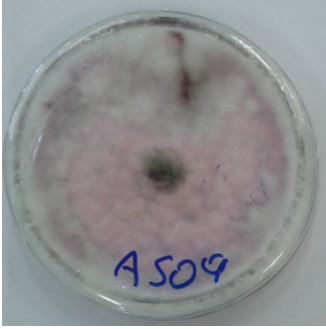
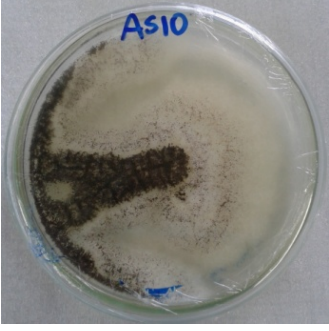
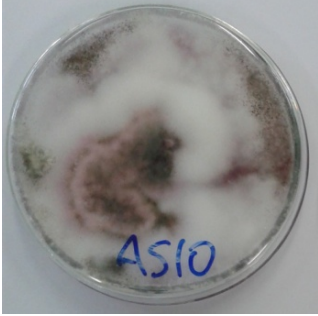
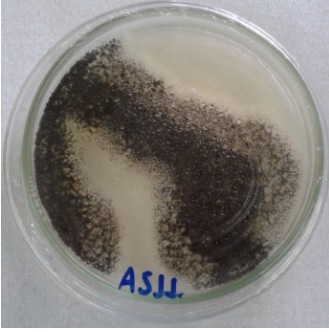
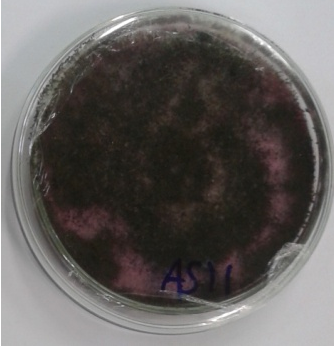
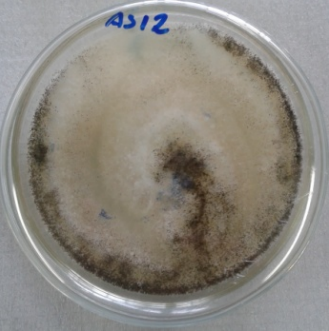
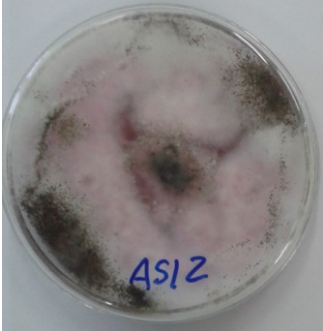
Código	Cultivo do fungo	Cultivo do fungo após o teste	Resultado
As01			++
As02			++
As03			++
As04			++

---

As05	 A petri dish labeled 'AS05' in blue ink at the top. The agar surface is mostly clear with a dark, vertical, irregular streak of growth in the center.	 A petri dish labeled 'AS05' in black ink at the top. The agar is covered with a dense, pinkish-red growth, with a dark spot in the center.	+
As06	 A petri dish labeled 'AS06' in blue ink at the top. The agar is mostly clear with a dark, vertical, irregular streak of growth in the center.	 A petri dish showing a very dense, dark, almost black growth covering most of the agar surface.	++
As07	 A petri dish labeled 'AS07' in blue ink at the bottom. The agar is mostly clear with a dark, irregular, dense growth in the center.	 A petri dish labeled 'AS07' in blue ink at the bottom. The agar is covered with a dense, pinkish-red growth, with a dark spot in the center.	+
As08	 A petri dish labeled 'AS08' in blue ink at the bottom. The agar is mostly clear with a dark, irregular, dense growth in the center.	 A petri dish labeled 'AS08' in blue ink at the bottom. The agar is covered with a dense, pinkish-red growth, with a dark spot in the center.	+

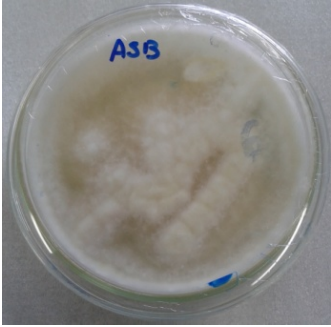
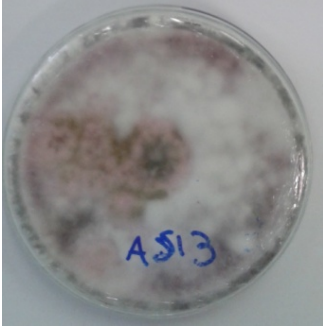
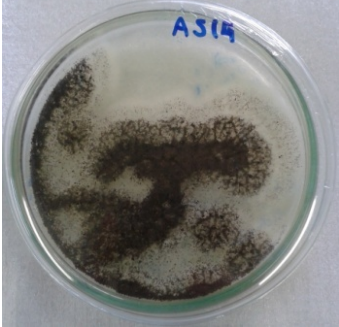
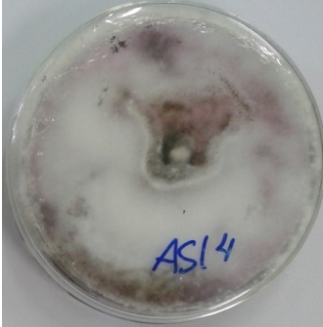

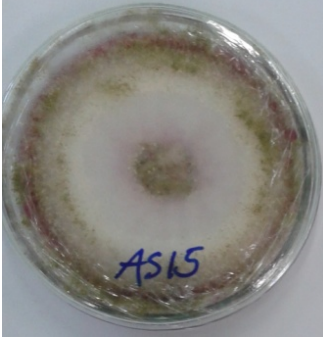
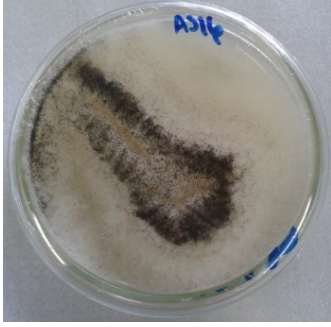
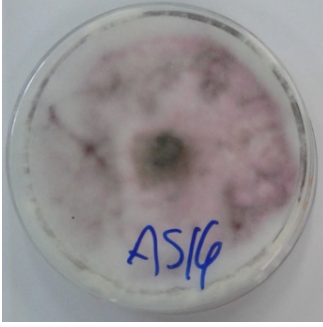
---

---

As09			+
As10			+
As11			++
As12			+

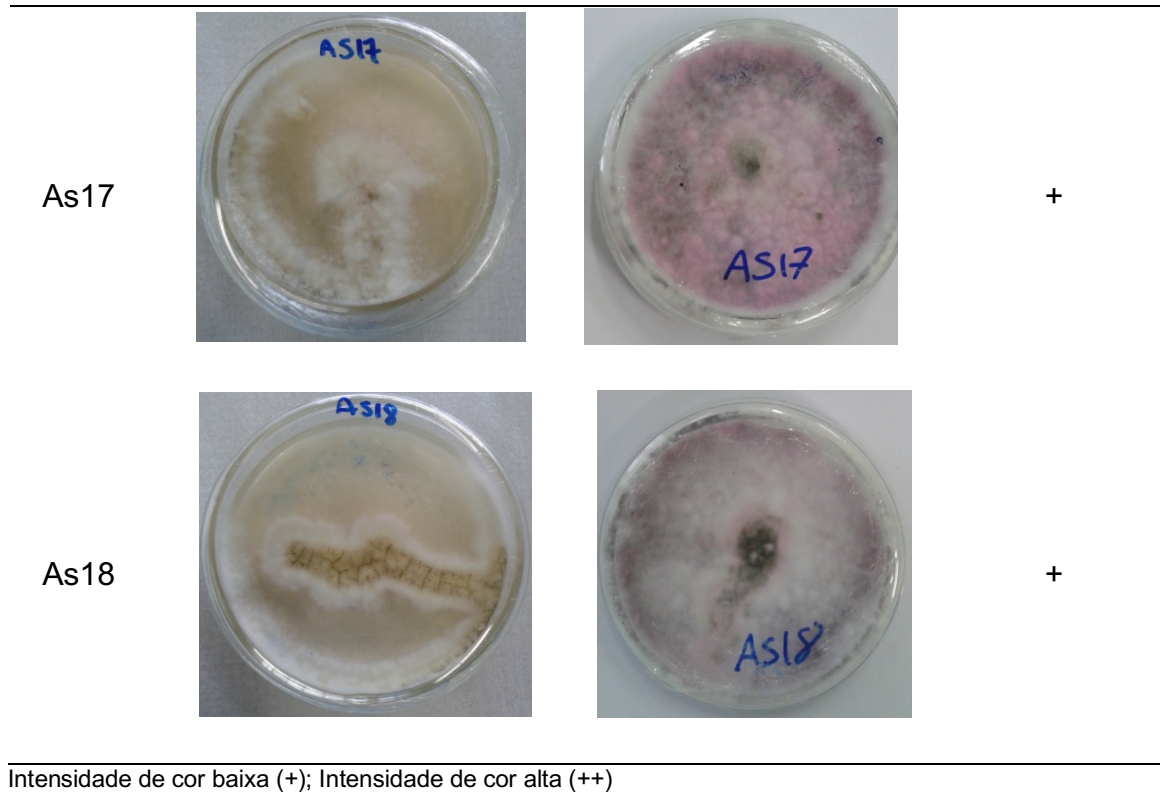
---

---

As13	 A petri dish labeled 'As13' showing a light-colored, slightly turbid agar surface.	 A petri dish labeled 'As13' showing a dark, irregularly shaped colony on a light agar background.	++
As14	 A petri dish labeled 'As14' showing a dark, dense, and somewhat circular colony on a light agar background.	 A petri dish labeled 'As14' showing a dark, irregularly shaped colony on a light agar background.	+
As15	 A petri dish labeled 'As15' showing a light-colored agar surface with a faint, circular, slightly darker area in the center.	 A petri dish labeled 'As15' showing a light-colored agar surface with a faint, circular, slightly darker area in the center.	+
As16	 A petri dish labeled 'As16' showing a dark, dense, and somewhat circular colony on a light agar background.	 A petri dish labeled 'As16' showing a dark, irregularly shaped colony on a light agar background.	+

---





Depois dos antibióticos, as enzimas são os bioprodutos mais explorados pela indústria biotecnológica. O gênero *Aspergillus* é o mais importante para a produção de enzimas comerciais incluindo as oxidorredutases. De acordo como Koopaei e Faramarzi (2015), as oxidorredutases produzidas por este fungo são utilizadas na biotransformação de diversos esteroides reduzindo assim o tempo e a rota sintética utilizada para se obter estas substâncias. Já Huang et al. (2014) afirmam que os fungos do gênero *Aspergillus* produzem enzimas que atuam nas reações de redução das ligações C=C na natureza.

No presente estudo todos os fungos avaliados apresentaram atividade de oxidorredutases, sendo 12 classificados com atividade baixa e 6 com atividade alta, de acordo com a intensidade da cor apresentada após a reação. A cepa de *A. brasiliensis* é conhecida como produtora de ADH (KOOPAEI e FARAMARZI, 2015) e por isso não foi submetida ao teste.

Com o resultado do teste da produção de ADH nos fungos do gênero *Aspergillus*, foram selecionadas cinco cepas que foram empregadas como biocatalisadores nas reações de redução de acetofenonas substituídas. Os critérios de escolha foram a intensidade da cor adquirida no ensaio de produção de ADH e a prévia identificação da espécie fúngica. As cepas selecionadas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Cepas de *Aspergillus* sp. selecionadas para serem utilizadas como biocatalisadores.

Código	Espécie
As02	<i>A. niger</i>
As06	<i>A. tubingensis</i>
As13	<i>A. niger</i>
As15	<i>A. tamarii</i>
As16	<i>A. niger</i>
ATCC 9642	<i>A. brasiliensis</i>

### 3.3 REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO

Os resultados obtidos nos experimentos de biorredução estão apresentados em função dos substratos carbonílicos utilizados.

#### 3.3.1 Redução da *p*-aminoacetofenona

Na Tabela 5 estão apresentados os valores de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) para as reações de biorredução *p*-aminoacetofenona mediadas por micélios de *Aspergillus* sp. onde foi possível detectar a formação dos produtos após 24 h.

Tabela 5 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas por *Aspergillus* sp. nos diversos sistemas biocatalíticos.

Biocatalisador	Conversão	Conversão	ee (%)	Sistema*
	P1 (%)	P2 (%)		
<b>As02</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
<b>As06</b>	<b>14,5</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Bifásico</b>
<b>As06</b>	<b>10,7</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
<b>As13</b>	<b>12,1</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Bifásico</b>
As13	11,7	3,4	54,1	Aquoso
<b>As15</b>	<b>39,3</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
As15	20,3	7,3	47	Bifásico
<b>As15</b>	<b>11,3</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
<b>ATCC 9642</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
ATCC 9642	11,5	3,4	54,4	Bifásico

\*Aquoso = 40 mL de tampão fosfato pH 7,0; Bifásico = 20 mL de hexano + 20 mL de tampão fosfato pH 7,0; Orgânico = 40 mL de hexano.

Como pode ser observado na Tabela 5, de maneira geral, as conversões ao produto foram baixas, no entanto é importante ressaltar que a maioriasdas reações foi enantiosseletiva, pois houve a produção de apenas um enantiômero. Isso mostra que o processo reacional é promissor, pois as enzimas encontradas nos fungos utilizados neste trabalho foram seletivas, uma vez que sete das nove reações testadas apresentaram um bom desempenho tendo como destaque a reação mediada pelo As15 em meio orgânico onde obteve-se uma conversão de 39,3% após 24 horas de reação com ee > 99%.

A conversão da reação pode estar associada ao substrato utilizado, pois o grupo amino ligado ao anel aromático é conhecido por ser do tipo doador de elétrons, e todos estes orientadores possuem pelo menos um par de elétrons não ligantes no átomo adjacente ao anel benzênico. Sendo assim, o efeito desses grupos é provocado principalmente pelo efeito de ressonância, facilitando assim a adição do hidreto à carbonila (SOLOMONS e FRYHLE, 2010). Outro fator que pode ter contribuído para o bom desempenho da reação foi o uso do sistema bifásico, composto por uma fase aquosa, onde as células ficam suspensas e realizam a manutenção do seu metabolismo normalmente, e por uma fase orgânica, que impede a formação de subprodutos (LEON et al., 1998; HE et al., 2006; CAPELLO, FISHER e HUNGERBUHLER, 2007) e auxilia na solubilidade do substrato.

Em estudo de biorredução da *p*-aminoacetofenona usando células de *Saccharomyces cerevisiae* realizado por Vieira (2006), obtiveram-se conversões ao produto entre 20% a 35% empregando a água como solvente por um período de 72 horas. Já Lehmkuhl (2006), para esta mesma reação, obteve um rendimento de 15% a 45% em sistema bifásico de heptano: água por um período de 72 horas. Estes resultados mostram que, em menos tempo, o processo biocatalítico utilizado neste estudo se mostrou mais eficiente para a obtenção do produto que pertence à classe dos amino-álcoois, substâncias bastante citadas na literatura como precursoras de diversos fármacos quirais (CHARTRAIN et al., 2001).

### 3.3.2 Redução da *p*-hidroxiacetofenona

Na Tabela 6 estão apresentados os valores de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) para as reações de biorredução da *p*-hidroxiacetofenona mediadas por micélios de *Aspergillus* sp. onde foi possível detectar a formação dos produtos após 24 h.

Tabela 6 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-hidroxiacetofenona mediadas por *Aspergillus sp.* nos diversos sistemas biocatalíticos.

Biocatalisador	Conversão P1 (%)	Conversão P2 (%)	Ee (%)	Sistema*
<b>As02</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
<b>As06</b>	<b>23</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
As06	26,3	35,5	14,7	Bifásico
As13	16,7	25,5	20,7	Orgânico
As13	11,7	3,4	54,1	Aquoso
<b>As15</b>	<b>0</b>	<b>17,5</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
As15	28,3	39,6	16,5	Aquoso
As16	14,3	23,8	24,8	Orgânico
As16	28,8	42,8	19,4	Bifásico
ATCC 9642	23,7	10,4	39	Orgânico
ATCC 9642	23,7	10,4	39	Bifásico

\*Aquoso = 40 mL de tampão fosfato pH=7,0; Bifásico = 20 mL de hexano + 20 mL de tampão fosfato pH=7,0; Orgânico = 40 mL de hexano.

Como pode ser observado na Tabela 6, as reações biocatalíticas de redução da *p*-hidroxiacetofenona apresentaram valores de conversão a produto satisfatórios.

Para as reações onde se utilizaram os fungos As02, As06 e As15, todas em meio orgânico, obtiveram-se valores de conversão de 11%, 23% e 17,5%, respectivamente, de apenas um dos enantiômeros. Isso indica que o processo reacional apresentou uma elevada seletividade. Para o mesmo substrato Albuquerque (2007) obteve conversão a produto com sete dias de reação, percentagem de conversão a produto de 4% sendo este um valor inferior ao obtido no presente estudo. Em seu experimento foi utilizada uma cepa de levedura *Sacharomyces cerevisiae* cultivada em laboratório (W303-1A) por um período de 15 dias. Sendo assim, verifica-se que as enzimas produzidas pelas células dos *Aspergillus* utilizadas no presente estudo apresentaram uma boa seletividade em relação ao substrato. No entanto, os valores de conversão foram baixos, provavelmente devido ao tempo reduzido da reação (24h). Portanto, para este substrato, as células de *Aspergillus* se mostraram promissoras para estudos posteriores.

### 3.3.3 Redução da *p*-nitroacetofenona

Na Tabela 7 estão apresentados os valores de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) para as reações de biorredução da *p*-nitroacetofenona mediadas por micélios de *Aspergillus sp.* onde foi possível detectar a formação dos produtos após 24 h.

Tabela 7 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da p-nitroacetofenona mediadas por *Aspergillus* sp. em diversos sistemas biocatalíticos.

Biocatalisador	Conversão		ee (%)	Sistema*
	P1 (%)	P2 (%)		
<b>As02</b>	<b>1,4</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
<b>As06</b>	<b>1,2</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
<b>As06</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
As13	0,8	2	40	Orgânico
<b>As13</b>	<b>0,7</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Bifásico</b>
<b>As13</b>	<b>0,9</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
As15	1	0,4	39	Orgânico
As15	0,6	1	24,9	Bifásico
<b>As15</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
<b>As16</b>	<b>1,1</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
<b>ATCC 9642</b>	<b>53,7</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Bifásico</b>

\*Aquoso = 40 mL de tampão fosfato pH=7,0; Bifásico = 20 mL de hexano + 20 mL de tampão fosfato pH=7,0; Orgânico = 40 mL de hexano.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 7 pode-se observar que não houve nenhum resultado expressivo se tratando de conversão a produto, no entanto foram obtidos resultados com elevados valores de excesso enantiomérico.

Para as reações onde se utilizou o fungo As02 observou-se 1,4% de conversão em meio aquoso; o fungo As06 promoveu 1,2% de conversão em meio orgânico e 2% de conversão e aquoso; com o fungo As13 observou-se 0,7 e 0,9% de conversão em sistema bifásico e aquoso, respectivamente. Com o fungo As15 observou-se conversão de 1% em meio aquoso e para o As16 houve 1,1% de conversão em meio orgânico. A cepa ATCC 9642 apresentou o melhor resultado promovendo 53,7% de conversão em meio orgânico, com ee > 99%.

Dos fatores que podem ser associados ao baixo desempenho desta reação, o primeiro é o substrato utilizado, pois o grupo nitro possui carga parcial positiva, logo é conhecido por ser desativante do anel aromático o que torna a reação mais lenta e difícil de ocorrer (SOLOMONS e FRYHLE, 2010). Outro fator é a elevada quantidade de substrato e a baixa quantidade de biocatalisador utilizadas. Comparando com o trabalho de Comasseto et al. (2006) onde foi utilizada uma quantidade de biocatalisador de 2 g por reação, a quantidade é consideravelmente maior que a usada neste estudo (50 mg). Além disso, a quantidade de substrato usada por Comasseto et al. (2006) foi de 0,05 mmol, sugerindo que a alta concentração de substrato utilizada neste estudo (1,0 mmol) pode ter influenciado na ação das enzimas. Por último, a ineficiência do processo reacional pode estar associada a baixa

afinidade das enzimas encontradas nos fungos utilizados neste trabalho pelo substrato *p*-nitroacetofenona.

Em estudo realizado por Albuquerque (2007), onde foram utilizadas células de *Saccharomyces cerevisiae* na reação de redução da *p*-nitroacetofenona (1,5 mmol) em meio aquoso não foi possível verificar a formação de produto após quinze dias de reação, porém quando foi utilizado o meio reacional orgânico o produto foi formado com conversões entre 4 e 10% e ee variando de 66 a 99%, sendo esses valores superiores aos obtidos nas reações com os fungos As02, As06, As13, As15 e As16 e inferiores quando comparados com a cepa ATCC 9642 que promoveu uma conversão de 53,7% após 24 horas de reação.

Situação similar ocorreu no trabalho de Zanotto (2003) onde foi usado o fermento de pão na reação de redução do mesmo substrato (1,3 mmol) em meio orgânico, sendo possível observar a formação de produto somente após trinta dias de reação. Comparando este estudo com o presente trabalho é possível afirmar que em um menor tempo de reação foi possível obter valores de excesso enantiomérico elevados.

### 3.3.4 Redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona

Na Tabela 8 estão apresentados os valores de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) para as reações de biorredução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas por micélios de *Aspergillus* sp. onde foi possível detectar a formação dos produtos após 24 h.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 8 pode-se observar que não houve nenhum resultado expressivo, em se tratando de conversão a produto, no entanto foram obtidos resultados com elevados valores de excesso enantiomérico em cinco reações. Merecem destaque as reações onde foi possível detectar a formação preferencial de apenas um produto, sendo elas realizadas com o As06 em meio orgânico com conversão de 10,5%; As02 em meio aquoso, apresentando conversão de 11,7%, As13 em meio orgânico e aquoso com valor de conversão de 17% e 8,4%, respectivamente e com a cepa ATCC 9642 com conversão de 32,2% em sistema bifásico.

Importante ressaltar que o substrato *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona possui um grupo doador de elétrons que através do seu efeito mesomérico facilita a adição do hidreto à carbonila justificando assim percentuais de conversão melhores dos obtidos com as reações onde utilizou-se o substrato *p*-nitroacetofenona.

Este substrato se mostrou promissor para estudos futuros, porém não foram encontrados estudos comparativos descritos na literatura, sendo assim nosso trabalho irá contribuir de maneira importante para o desenvolvimento dos estudos em biocatálise com este substrato.

Tabela 8 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas por *Aspergillus* sp. nos diversos sistemas biocatalíticos.

Biocatalisador	Conversão		ee (%)	Sistema*
	P1 (%)	P2 (%)		
As02	17,4	7,6	39,0	Bifásico
As02	9,8	6,3	21,8	Orgânico
<b>As02</b>	<b>11,7</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
As06	14,4	12,4	7,2	Bifásico
<b>As06</b>	<b>10,5</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
As06	15,5	10,7	18,0	Aquoso
As13	11,9	9,5	11,1	Bifásico
<b>As13</b>	<b>17,0</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
<b>As13</b>	<b>8,4</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
As15	11,5	8,7	13,7	Bifásico
As15	14,4	8,8	24,1	Orgânico
As15	15,6	11,3	15,8	Aquoso
<b>ATCC 9642</b>	<b>32,2</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Bifásico</b>

\*Aquoso = 40 mL de tampão fosfato pH=7,0; Bifásico = 20 mL de hexano + 20 mL de tampão fosfato pH=7,0; Orgânico = 40 mL de hexano.

### 3.4 ESTUDO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS BIOCATALÍTICAS UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A cepa *A. brasiliensis* ATCC 9642 apresentou um bom desempenho como biocatalisador nas reações de redução, quando comparada com os demais fungos, pois foi capaz de reduzir a *p*-nitroacetofenona, *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona e *p*-aminoacetofenona em meio orgânico com elevada seletividade. Sendo assim, esta cepa foi selecionada para o estudo da influência das condições reacionais (concentração de substrato, tempo de reação e pH) sobre a conversão a produto, por meio de um planejamento experimental. Estudos de Hongzhi et al. (2009), Sakata et al. (2011) e Alarcón (2013) relatam elevada atividade biocatalítica deste microrganismo em reações de biotransformação. Desde 2007 a espécie *A. niger* foi reclassificada como *A. brasiliensis* devido à sua similaridade morfológica e aplicação na indústria farmacêutica (VARGA, 2004).

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados obtidos para o planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>, realizado para a reação de redução da *p*-aminoacetofenona em meio orgânico, mediada pelo fungo *A. brasiliensis*.

Tabela 9 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas por *Aspergillus brasiliensis* em meio orgânico.

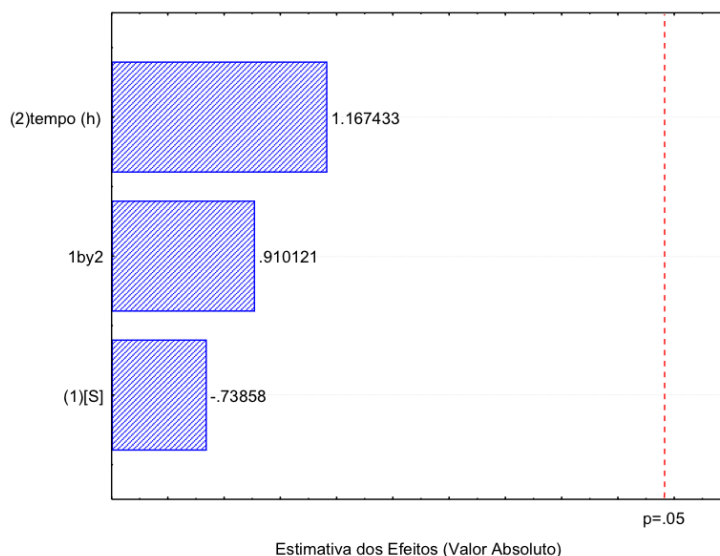
Ensaio	S (mg/mL)	t (h)	c (%)*	ee (%)*
1	30	24	10,3	>99
2	50	24	11,7	>99
3	30	360	9,7	>99
4	50	360	8,9	>99

S = substrato; t = tempo de reação. \*valores correspondem à média das triplicatas.

Como pode ser observado na Tabela 9 a enantiosseletividade da reação se manteve constante durante as 360 horas em que foi acompanhada, já os valores de conversão apresentaram valores muito próximos ao longo de todo o experimento.

Na Figura 7 está apresentado o Diagrama de Pareto para as reações de redução da *p*-aminoacetofenona em meio orgânico, mediada pelo fungo *A. brasiliensis*.

Figura 7 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas por *Aspergillus brasiliensis* em meio orgânico.



Como pode ser observado na Figura 7, nenhuma das variáveis estudadas apresentou significância estatística. Isso pode ter ocorrido pois o longo tempo de reação pode ter reduzido a atividade catalítica da enzima, reduzindo assim a conversão ao álcool quiral. Sendo assim, para estes resultados obtidos não serão apresentadas as tabelas das estimativas dos efeitos e nem das superfícies de resposta.

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados obtidos para o planejamento fatorial completo  $2^3$ , realizado para a reação de redução da *p*-nitroacetofenona em meio bifásico, mediada pelo fungo *A. brasiliensis*.



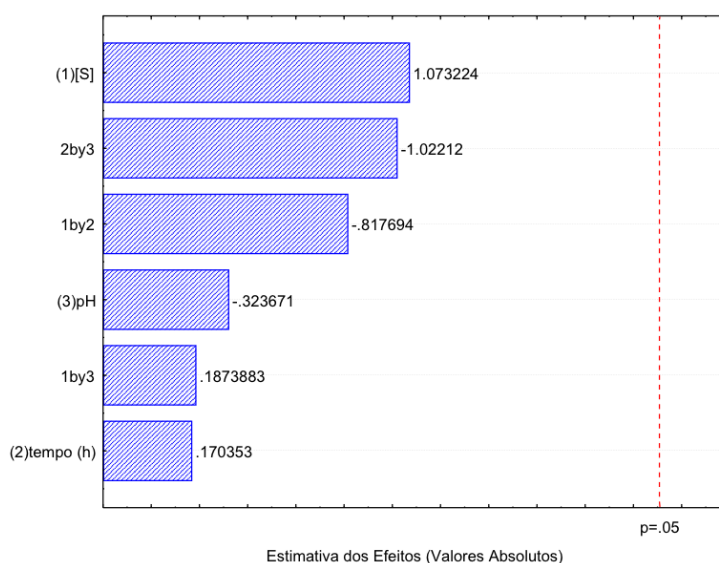
Tabela 10 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-nitroacetofenona mediadas por *Aspergillus brasiliensis* em meio bifásico.

Ensaio	S (mg/mL)	t(h)	pH*	c (%)**	ee (%)**
1	30	24	4,5	67,2	>99
2	50	24	4,5	40,4	>99
3	30	360	4,5	40,4	>99
4	50	360	4,5	48,5	>99
5	30	24	7,0	50,4	>99
6	50	24	7,0	41,2	>99
7	30	360	7,0	47,1	>99
8	50	360	7,0	49,1	>99

S = substrato; t = tempo de reação. \*pH 4,5 = tampão citrato/fosfato; pH 7,0 = tampão fosfato.  
 \*\*valores correspondem à média das triplicatas.

Como pode ser visto na Tabela 10, todas as reações mediadas pelo *A. brasiliensis* apresentaram ee >99% e valores de conversão muito próximos. Porém, pode-se destacar o ensaio 1 em que o fungo conseguiu converter 67,2% do substrato a produto em meio bifásico em que se utilizou tampão de pH 4,5, que mantém o meio ácido. Sendo assim, pode-se inferir que a reação apresentou um melhor desempenho devido a melhor estabilidade proporcionada pelo meio, graças à solvatação do substrato no sistema bifásico, facilitando assim a adição do hidreto à carbonila. Na Figura 8 está apresentado o Diagrama de Pareto para as reações de redução da *p*-nitroacetofenona em meio bifásico, mediadas pelo *A. brasiliensis*.

Figura 8 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da *p*-nitroacetofenona mediadas por *Aspergillus brasiliensis* em meio bifásico.



Como pode ser observado na Figura 8, nenhuma das variáveis estudadas apresentou significância estatística, pois de acordo com os valores de conversão obtidos a atividade enzimática se manteve constante ao longo de todo o experimento mostrando assim que as enzimas produzidas por este organismo possuem um bom desempenho da faixa de pH estudada. Sendo assim, para estes resultados obtidos não serão apresentadas as tabelas das estimativas dos efeitos e nem das superfícies de resposta.

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados obtidos para o planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, realizado para a reação de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona em meio bifásico, mediada pelo fungo *A. brasiliensis*.

Tabela 11 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas por *Aspergillus brasiliensis* em meio bifásico.

Ensaio	S (mg/mL)	t (h)	pH*	c (%)**	ee (%)**
1	30	24	4,5	14,9	>99
2	50	24	4,5	9,3	>99
3	30	360	4,5	0	-
4	50	360	4,5	0	-
5	30	24	7,0	23,2	>99
6	50	24	7,0	15,8	>99
7	30	360	7,0	24,0	>99
8	50	360	7,0	14,6	>99

S = concentração de substrato; t = tempo de reação. \*pH 4,5= tampão citrato/fosfato; pH 7,0 = tampão fosfato \*\*valores correspondem à média das triplicatas.

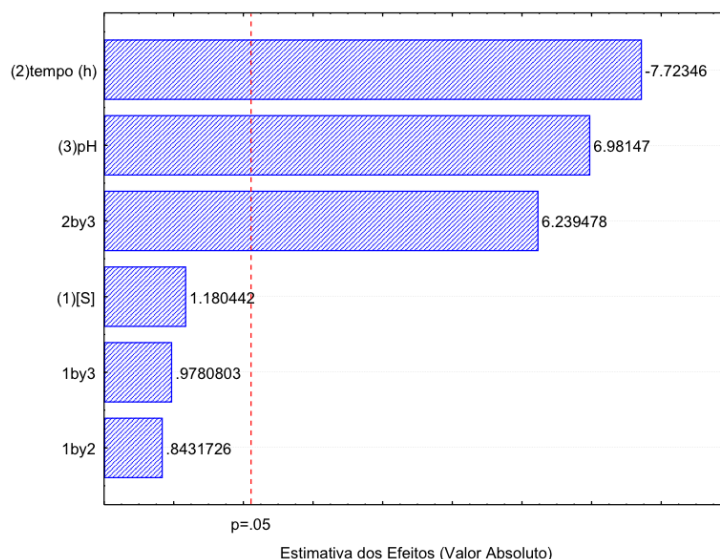
Pode-se observar na Tabela 11 que ao fim das 360 horas de experimento as reações realizadas em sistema bifásico utilizando o pH 4,5 não apresentaram conversão a produto, sendo assim pode-se inferir que o tempo tenha influência direta na atividade da enzima. Os demais experimentos apresentaram valores de conversão inicial e final baixos.

Na Figura 9 está apresentado o Diagrama de Pareto para as reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona em meio bifásico, mediada pelo fungo *A. brasiliensis*.

Como pode ser observado na Figura 9, o tempo e o pH apresentaram significância estatística para o nível de confiança de 95%. Desses dois fatores, aquele que mais influenciou no desempenho da reação de redução foi o pH, pois conforme ocorre uma variação em seu valor, a conformação da enzima e as relações existentes entre as cadeias laterais dos aminoácidos mudam, alterando sua atividade (NELSON e COX, 2002). No caso do

experimento realizado neste estudo, nota-se que ao logo do tempo no ensaio realizado em meio contendo tampão de pH 4,5 a enzima não mais conseguiu realizar a reação de redução.

Figura 9 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas por *Aspergillus brasiliensis* em meio bifásico.



Os valores dos efeitos das variáveis estudadas sobre a conversão das reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona, obtidos com o planejamento experimental  $2^3$  utilizando o fungo *A. brasiliensis* em meio bifásico estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Estimativa dos efeitos ( $p \leq 0,05$ ) para conversão das reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona obtidos com o planejamento experimental fatorial  $2^3$  utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* em meio bifásico.

	Efeito	$p$
<b>Média</b>	<b>77,6250</b>	<b>0,000000</b>
( $X_1$ ) [Substrato]	8,7500	0,254078
<b>(<math>X_2</math>) tempo</b>	<b>-57,2500</b>	<b>0,000001</b>
<b>(<math>X_3</math>) pH</b>	<b>51,7500</b>	<b>0,000002</b>
1 x 2	6,2500	0,410839
1 x 3	7,2500	0,341749
<b>2 x 3</b>	<b>46,2500</b>	<b>0,000009</b>

Em negrito: significância estatística ( $p \leq 0,05$ ).

Para se obter a influência individual de cada um dos fatores e também a influência de dois ou mais tomados conjuntamente, levando em conta as interações existentes entre eles,

utiliza-se a análise de variância (ANOVA), a qual fornece parâmetros que permitem determinar a significância estatística de determinado fator. A partir da análise de variância são determinados os coeficientes do modelo matemático que melhor descreve a resposta (conversão a produto) do sistema à variação dos parâmetros no intervalo dos níveis analisados (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A Tabela 13 apresenta a ANOVA do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para avaliar a conversão, obtida com o planejamento fatorial completo  $2^3$ . O parâmetro F desta tabela permite determinar se a relação entre a conversão e determinada variável é estatisticamente significativa. Sendo o valor de F maior que 1,0 existirá relação significativa entre as variáveis dependente e independente, e para que o modelo matemático seja útil para fins preditivos o parâmetro F deverá ser superior a 4,0 (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995).

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para a conversão a produto das reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona obtida com o planejamento fatorial  $2^3$  utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* em meio bifásico.

Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>
(X <sub>1</sub> ) [S]	459,37	1	459,37	1,39344	0,254078
<b>(X<sub>2</sub>) Tempo</b>	<b>19665,38</b>	<b>1</b>	<b>19665,38</b>	<b>59,65186</b>	<b>0,000001</b>
<b>(X<sub>3</sub>) pH</b>	<b>16068,37</b>	<b>1</b>	<b>16068,37</b>	<b>48,74092</b>	<b>0,000002</b>
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	234,38	1	234,38	0,71094	0,410839
X <sub>1</sub> .X <sub>3</sub>	315,38	1	315,38	0,95664	0,341749
<b>X<sub>2</sub>.X<sub>3</sub></b>	<b>12834,38</b>	<b>1</b>	<b>12834,38</b>	<b>38,93108</b>	<b>0,000009</b>
Erro	5604,37	17	329,67	-	-
Total SQ	55181,62	23	-	-	-

S = Substrato. SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = F<sub>calculado</sub>; *p* < 0,05. Em negrito: significância estatística.

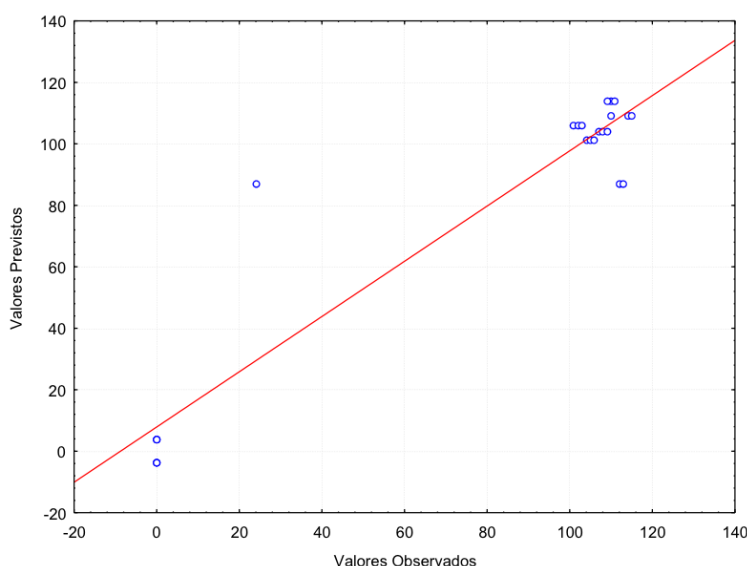
Os valores dos efeitos dos parâmetros estudados sobre a conversão (Tabela 12) representam os coeficientes da equação do modelo matemático, o qual contempla as interações entre as variáveis significativas, combinadas duas a duas, sendo classificado, portanto, como não linear. A equação do modelo matemático que proporciona a melhor descrição da conversão das reações de biorredução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona utilizando o fungo *A. brasiliensis* em meio bifásico em função da variação dos parâmetros nos intervalos dos níveis analisados, é apresentada a seguir.

$$Y = 77,6250 - 57,2500 \cdot X_2 + 51,7500 \cdot X_3 + 46,2500 \cdot X_2X_3 \quad (1)$$

Devido aos valores do parâmetro F ( $> 4,0$ ) associado a cada fator, o modelo é capaz não só de descrever, mas também de prever a resposta do sistema dentro das faixas de valores das condições analisadas (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995).

A correlação entre os valores previstos e os valores observados efetivamente para as conversões das reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas pelo fungo *A. brasiliensis* em meio bifásico, está apresentada na Figura 10. Observa-se que as respostas experimentais obtidas para a conversão apresentam valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

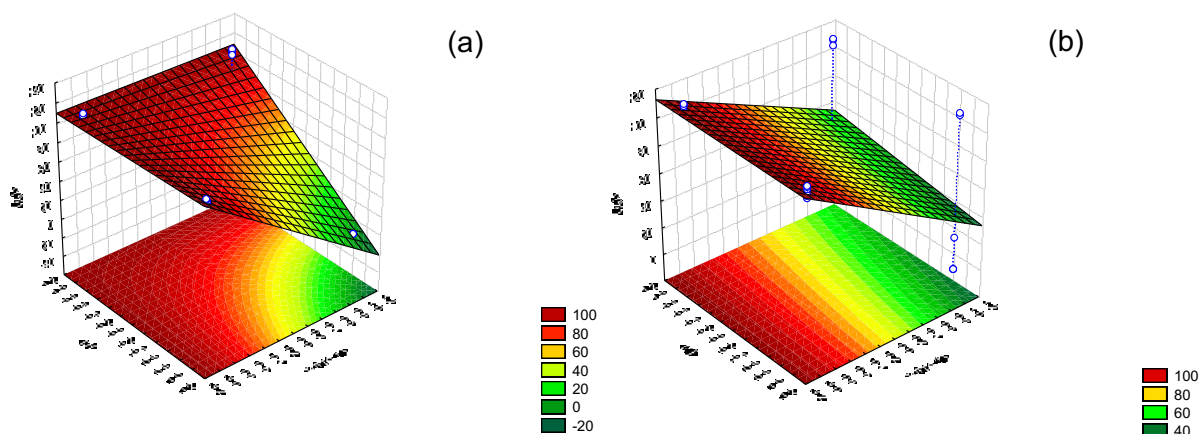
Figura 10 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para as conversões das reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* em meio bifásico.



O coeficiente de correlação  $R^2$  associado à equação (1) vale 0,89844 e o valor ajustado deste coeficiente é de 0,86259. Isto significa que o modelo deduzido é capaz de explicar 89,84% do comportamento da variável de resposta (conversão) dentro do intervalo de variação dos fatores adotados.

Com a realização do planejamento experimental foi possível avaliar graficamente o efeito das variáveis sobre a conversão através da análise das superfícies de resposta. Na Figura 11 pode ser observado o gráfico de superfície de resposta para as variáveis significativas para as reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas pelo fungo *A. brasiliensis*. Em (a) fica evidente que em tempos menores e valores de pH elevados pode-se obter um aumento da conversão ao álcool quiral. Na Figura 11b observa-se que em tempos menores e maiores concentrações de substrato é possível obter valores maiores de conversão ao álcool quiral.

Figura 11 - Superfícies de resposta para as conversões das reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* em meio bifásico como uma função do pH e do tempo de reação (a); e como uma função da concentração de substrato e do tempo de reação (b).



#### 4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram obtidos resultados que demonstram o potencial dos fungos do gênero *Aspergillus* isolados de uma espécie amazônica e do *A. brasiliensis* ATCC 9642 como biocatalisadores de reações de redução de acetofenonas substituídas, reagentes de grande interesse para a química sintética.

Todos os isolados avaliados apresentaram produção de álcool desidrogenase e a maioria dos fungos foi capaz de converter com sucesso o substrato carbonílico a alcoóis quirais enantiomericamente puros, em meio orgânico e em sistema bifásico.

O fungo *A. brasiliensis* mostrou-se como o mais promissor para mediar reações de biorredução de acetofenonas substituídas, dentre as linhagens estudadas. Na redução da *p*-aminoacetofenona em meio orgânico, o tempo de reação e a concentração de substrato não influenciaram significativamente a conversão a produto, embora a menor concentração do substrato e os maiores tempos tenham favorecido o aumento das conversões. Na redução da *p*-nitroacetofenona em meio bifásico, os fatores estudados não influenciaram significativamente a conversão a produto, contudo, a maior concentração de substrato, o maior tempo e pH mais baixo favorecem o aumento das conversões. Na redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona em meio bifásico, o tempo e o pH influenciaram significativamente a conversão ao álcool quiral, sendo que o menor tempo e o maior pH levaram às maiores percentagens de conversão.

Espera-se com estes resultados que mais pesquisas sejam realizadas afim de se explorar o potencial biotecnológico de fungos do gênero *Aspergillus* com ênfase na biocatálise.

## 5 REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. A.; KILÉNYI, S. N. **Asymmetric Synthesis**. London: Blackie Academic & Professional, p. 1-63, 1992.
- ALBUQUERQUE, P. M. **Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na redução de substratos carbonílicos**, 2007, 161p. Tese de doutorado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- ALVES, N. P.; MORAIS, D. N. de **Metrologia Química e a Utilização de Materiais de Referência em Medições Químicas**, QUIMLAB – Universidade do Vale do Paraíba, 2002.
- BANHOS, E. F. **Atividade antimicrobiana de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae) e de seus fungos endofíticos**. 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) – Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Manaus, 2011.
- CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927-934, 2007.
- CHARTRAIN, M.; GREASHAM, R.; MOORE, R.; RAIDER, J.; ROBSON, D.; BUCKLAND, B.; Asymaetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceutical. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 503-512, 2001.
- COMASSETO, J. V.; ASSIS, L. F.; ANDRADE, L. H.; SCHOENLEINCRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M. Biotransformations of ortho-, meta- and para-aromatic nitrocompounds by strains of *Aspergillus terreus*: Reduction of ketones and deracemization of alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 24-30, 2006.
- FROTA, E. B.; MAGALHÃES, F. E. A.; ALVES, M. D. S.; GADELHA, V. L. de O. **Utilização de feniletanol como padrão racêmico para biotransformação**. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira par o Progresso da Ciência, Goiânia, 2011.
- HE, J. Y.; SUN, Z. H.; RUAN, W. Q.; XU, Y. Biocatalytic synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxy-butanoate in an aqueous-organic solvent biphasic system using *Aureobasidium pullulans* CGMCC 1244. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 244-249, 2006.
- HOMOLA, P.; KURÁK, T.; IIIIOVÁ, V.; POLAKOVIC, M. Kinetics of acetophenone reduction to (R)-1- phenylethanol by a whole-cell *Pichia capsulata* biocatalyst. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, p. 323-332, 2016.
- HUANG, M.; HU, H.; MA, L.; ZHOU, A.; YU, L.; ZENG, S. Carbon-carbon double-bond reductases in nature, **Drug Metabolism Reviews**, v. 46, n. 3, p. 362-378, 2014.
- KEPPLER, A. F. **Biotransformação de cetonas aromáticas e cíclicas promovidas por fungos**. 2005. 76 p. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- KOOPAEI, N. N.; FARAMARZI, M. A. Recent developments in fungal transformation of steroids. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, p. 1-28, 2015.
- LEON, R.; FERNANDES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. Whole-cell biocatalysis in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 483-500, 1998.

MAHMOUDIAN, M. Biocatalytic production of chiral pharmaceutical intermediates. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 18, n. 2, p. 105-118, 2009.

OMORI, A. T.; PORTAS, V. B.; de OLIVEIRA, C. de S.; Redução enzimática do 4-(dimetilamino) benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): um experimento simples na compreensão da biocatálise. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 435-437, 2012.

PARENTE, L. L. **Reações de redução, hidrólise e resolução de racematos usando como biocatalisador células íntegras de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**, 2012. 157p. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RIBEIRO, A. R. C.; MOURA, L. F. W.; OLIVEIRA, M. V.; LIMA, D. R.; MOTA, J. G. S. M.; MAGALHÃES, F. E. A.; Bioprospecção de atividade de álcool desidrogenase (ADH) de fungos anemófilos isolados do Centro Vocacional Tecnológico do município de Tauá-CE. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2013.

SAKATA, K.; UTSUNOMIYA, H.; TOKUDA, A.; ICHINOSE, M.; MIYAZAWA, M. Production of a new terpenoid from biotransformation of (-)-isolongifolanol by *Aspergillus niger* and suppression of SOS-inducing activity. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, n. 5, p. 212-216, 2011.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, 10a ed. Rio de Janeiro: LTC, 189 p. 2010.

TOZETTO, L. M.; FERNANDES, L.; CHAVES, E. S.; KNOB, A.; PILEGGI, S. A. V.; de SOUZA, L. de B. P.; SCHAMNE, T.; LOPES, R. V. **Redução enantiosseletiva da acetofenona e p-nitroacetofenona utilizando micro-organismos como biocatalisadores** In: Jornada Acadêmica e Mostra Científica de Farmácia, Ponta Grossa, 2015.

USAMI, A.; MOTOOKA, R.; MIYAZAWA, M. Highly selective biotransformation of (+)-(1-S)- and (-)-(1-R)-camphorquinone by *Aspergillus wentii*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, p. 285-289, 2014.

VIEIRA, M. R. **Estudo da biorredução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp.** 2006. 95p. Dissertação de Mestrado em Química. Centro de Ciências, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.

VOGEL, A. I. **A Text-Book of Practical Organic Chemistry**. 3.ed. London: Longman, p. 1188, 1974.

XU, J. H.; ZHOU, R.; BORNSCHEUER, U. T.; Comparison of differently modified *Pseudomonas cepacia* lipases in enantioselective preparation of a chiral alcohol for agrochemical use. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 6, p. 415-422, 2005.

ZANOTTO, S. P. **Utilização de enzimas e microrganismos para a obtenção de compostos opticamente ativos**, 2003, 123p. Tese de doutorado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ZANOTTO, S. P.; ROMANO, I. P.; LISBOA, L. U. S.; DUVOISIN JR, S.; MARTINS, M. K.; LIMA, F. A.; SILVA, S. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi, **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 20, n 6, p. 1046-1059, 2009.



## CAPÍTULO II

**Estudo da redução de acetofenonas utilizando vegetais como biocatalisadores para a obtenção de substâncias com elevada pureza enantiomérica de interesse farmacológico**

Estudo da redução de acetofenonas utilizando vegetais como biocatalisadores para a obtenção de substâncias com elevada pureza enantiomérica de interesse farmacológico.

Santiago, P. A. L.; Duvoisin Junior, S.; Albuquerque, P. M.

*Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil.*

## RESUMO

A busca por novos biocatalisadores é de grande interesse das indústrias química e farmacêutica, uma vez que estes favorecem a formação de produtos enantiomericamente puros com alta especificidade e eficiência. A redução assimétrica de acetofenonas mediada por vegetais configura-se como uma ferramenta interessante na preparação de álcoois quirais, importantes intermediários para a síntese de compostos bioativos. A região Amazônica possui uma vasta diversidade de plantas que ainda não foram avaliadas quanto às suas propriedades biocatalíticas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo investigar o uso de gengibre, batata doce, berinjela, mandioca e cenoura, bem como vegetais encontrados na região amazônica (taioba roxa, cipó kupá e cubiu) para mediar reações de redução de diferentes acetofenonas substituídas. As reações de redução foram avaliadas em três sistemas: orgânico (hexano), bifásico (hexano e tampão fosfato) e aquoso (tampão fosfato). As diferentes partes das plantas foram adicionadas ao meio reacional contendo o substrato carbonílico previamente solubilizado em DMSO. Após 24 h a reação foi analisada por cromatografia em fase gasosa equipada com coluna quiral. Para batata doce e berinjela foi realizado ainda o estudo da influência da concentração de substrato, tempo de reação e pH do meio bifásico sobre os valores de conversão, por meio de um planejamento experimental. A atividade enzimática de oxidorredutases pôde ser observada para todas as reações mediadas por vegetais, obtendo-se excesso enantiomérico > 99% na maioria das reações. Na redução da *p*-aminoacetofenona, o tubérculo da taioba roxa promoveu a maior conversão ao produto enantiomericamente puro (93,6%) em meio orgânico. Na redução da *p*-hidroxiacetofenona, a cenoura foi o melhor biocatalisador, formando apenas um enantiômero, com 45,5% de conversão em meio bifásico. Para a *p*-nitroacetofenona, o cipó kupá promoveu a formação de apenas um produto com 13,9% de conversão em meio bifásico. Para a *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona, a mandioca e o tubérculo da taioba roxa forneceram 34,6% de conversão ao álcool quiral em meio aquoso. Quando alteradas as variáveis concentração do substrato, tempo de reação e pH, somente o pH influenciou de maneira significativa na redução da *p*-aminoacetofenona utilizando a batata doce como biocatalisador ( $p \leq 0,05$ ). Com este estudo foi possível verificar o potencial biocatalítico de vegetais da região amazônica na redução enantiosseletiva de acetonas substituídas.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas como fonte de biocatalisadores naturais é uma metodologia que vem sendo aplicada em síntese orgânica, visando a obtenção de moléculas de interesse biológico, tais como os álcoois quirais. Estas substâncias são obtidas para uma série de finalidades e a principal delas é a síntese de drogas ou fármacos, pois grande parte destes possui pelo menos um centro quiral (BENAMANE, ZEROR e ZOUIOUCHE, 2014). É importante salientar que

os enantiômeros de uma substância bioativa podem apresentar efeitos farmacológicos e toxicológicos diferentes. Sendo assim, os enantiômeros de um par podem ser ambos benéficos ou um deles benéfico e o outro indesejado, podendo ser tóxico, inibidor ou inativo (BON et al., 2008; BORMAN, 1997). Para que esses compostos sejam sintetizados, os biocatalisadores possuem um papel fundamental, pois geralmente possuem elevado grau de seletividade por um dos enantiômeros (MATSUDA, YAMANAKA e NAKAMURA, 2009).

A obtenção destes álcoois quirais pode ser realizada por meio da reação de redução de substâncias carbonílicas catalisada por enzimas, responsáveis pela redução enantiosseletivas destas substâncias. Esta capacidade seletiva permite que os biocatalisadores sejam usados por químicos em diferentes abordagens de síntese de substâncias opticamente puras, sejam usando enzimas puras, células íntegras, vegetais ou microrganismos (ZHENG e XU, 2011). Os biocatalisadores podem atuar em condições reacionais brandas, possuem alta especificidade pelo substrato ou reação devido à presença de um sítio ativo em sua estrutura. Tais propriedades melhoram a eficiência da reação e favorecem a formação de compostos opticamente puros, sendo assim, diferentes enzimas têm sido utilizadas em abordagens experimentais diferentes (DURÁN, CONTI e RODRIGUES, 2000; ISHIGE e SHIMIZU, 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007).

As reações de oxidação e redução promovidas pelas oxidorreduções são importantes para a obtenção de álcoois quirais a partir de cetonas pró-quirais, e por isso esta classe de enzimas é frequentemente usada nos produtos de química fina e da indústria farmacêutica (DIEDERICHS et al., 2015). Substratos pró-quirais como acetofenonas são de grande importância para a indústria farmacêutica, pois seus derivados tais como a xantoxilina, taxol e brefeldina possuem importantes atividades biológicas. Seus demais derivados podem ser utilizados como veículo para o princípio ativo de medicamentos, aditivos de gomas de mascar e como fragrâncias em perfumes, detergentes e cremes (SOARES, 2000).

A região amazônica brasileira é rica em diversidade biológica, e acredita-se que aqui estejam abrigados por volta de 20% de toda a biodiversidade existente no planeta. Somente na Região Amazônia existem cerca de 60.000 espécies de plantas, deste modo a biodiversidade de ecossistemas amazônicos são consideradas como o maior potencial natural para estudos científicos, pois pouco foi estudado sobre suas propriedades biológicas e químicas (PLETSCH, 1998; ALBAGLI, 2001; FIORAVANTI, 2016) e muito menos sobre seu potencial biocatalítico.

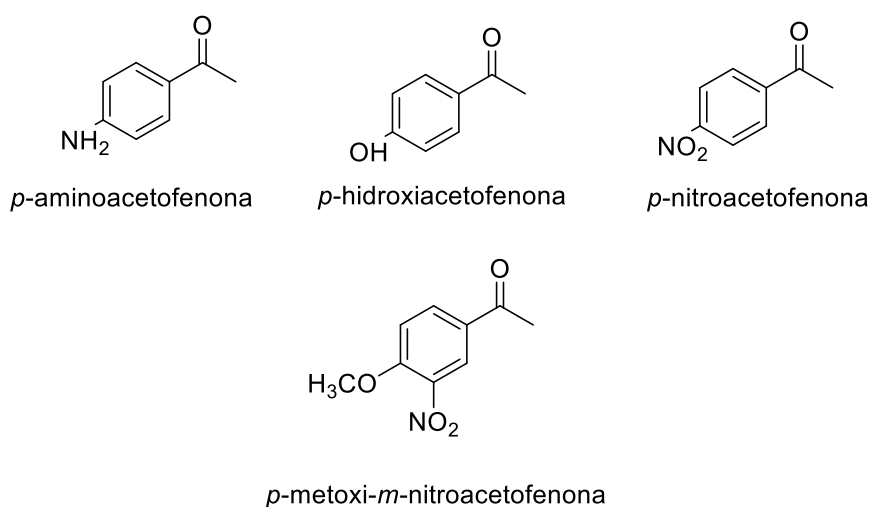
Neste contexto, o presente estudo pretende avaliar a conversão e a enantiosseletividade das reações de redução da *p*-aminoacetofenona, *p*-hidroxiacetofenona, *p*-nitroacetofenona e *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona, utilizando o hexano, sistema bifásico e solução tampão como meios reacionais e diferentes vegetais como biocatalisadores, a fim de verificar seu potencial para a obtenção de substâncias com elevada pureza enantiomérica.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 REAGENTES

Metanol (Panreac) e  $\text{NaBH}_4$  (Neon) foram utilizados na síntese dos padrões de álcoois racêmicos. Hexano (J.T Baker, grau HPLC) foi utilizado como meio orgânico nas reações de biorredução.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Synth) e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Synth) foram utilizados no preparo da solução tampão de pH 7,0.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Synth) e ácido cítrico (Synth) foram utilizados no preparo da solução tampão 4,5. Os substratos carbonílicos (Figura 1) *p*-aminoacetofenona (Sigma), *p*-nitroacetofenona (Sigma), *p*-hidroxiacetofenona (Sigma) e *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona (Sigma) foram utilizados nas reações de redução. A análise preliminar dos produtos foi realizada em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) com base de alumínio (Merck).

Figura 1 - Estrutura dos substratos carbonílicos utilizados nas reações de biorredução.



### 2.2 EQUIPAMENTOS

As reações de biorredução foram realizadas em agitador do tipo *shaker* (Tecnal) com controle de temperatura e agitação. Os padrões racêmicos foram concentrados em rotaevaporador (Fisatom). As reações de redução foram analisadas e seus respectivos produtos foram quantificados em Cromatógrafo em Fase Gasosa com Detector de Ionização de Chama e Detector de Condutividade Térmica (Shimadzu) equipado com coluna de fase quiral (SUPELCO – Beta DEX 325 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ).

### 2.3 VEGETAIS

Foram utilizados como biocatalisadores diversas partes (tubérculo, galhos e folhas) dos vegetais *Daucus carota* (cenoura), *Zingiber officinale* (gengibre), *Manihot esculenta* (mandioca), *Ipomoea batatas* (batata doce) e *Solanum melongena* (beringela), os quais foram adquiridos em feiras e mercados da cidade de Manaus, tendo o cuidado de se manter os mesmos fornecedores para cada vegetal.

Foram utilizados ainda vegetais encontrados na região Amazônica: cipó kupa (*Cissus gongylodes*), cubiu (*Solanum sessiliflorum*) e taioba roxa (*Xanthosoma violaceum*). Estes vegetais foram gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Valdely Ferreira Kinupp, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM). Os mesmos possuem exsiccatas armazenadas no Herbário do IFAM.

### 2.4 SÍNTESE DOS PADRÕES RACÊMICOS

A redução dos substratos carbonílicos por via química foi realizada com o agente redutor  $\text{NaBH}_4$  segundo metodologia descrita por Vogel (1974) com modificações. Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 1,0 mmol do substrato carbonílico dissolvido previamente em 20 mL de metanol e 3,0 mmol do agente redutor. A reação ocorreu à temperatura controlada, entre 20 e 25°C. A formação do produto foi acompanhada por CCD sendo usado como eluente hexano:acetato de etila na proporção de 9:1 ou 8:2. Em seguida foram reveladas com luz U.V. nos comprimentos de onda 254 nm e 265 nm. Por fim, a mistura reacional foi tratada com 15 mL de solução saturada de NaCl e logo em seguida extraída com 60 mL de éter dietílico. A fase orgânica foi em seguida rotaevaporada. Os álcoois racêmicos obtidos foram submetidos à análise em cromatógrafo gasoso com coluna de fase quiral (CGQ).

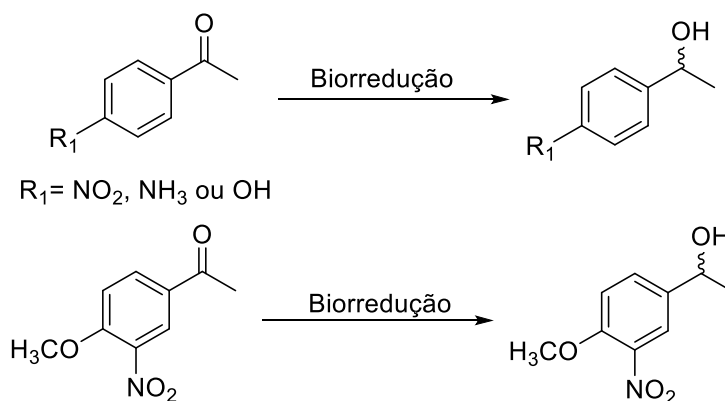
### 2.5 REAÇÕES BIOCATALÍTICAS DOS SUBSTRATOS CARBONÍLICOS

As reações de biorredução mediadas por vegetais ocorreram segundo o esquema apresentado na Figura 2. O material vegetal foi lavado com água, e em seguida foi realizada a assepsia do material, de acordo com a metodologia descrita por Souza (2013). Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar. Logo após a assepsia, os vegetais foram cortados em pequenas fatias.

Em um frasco Erlenmeyer de 125 mL foram adicionadas 10 g de biocatalisador fatiado, 40 mL de hexano (meio orgânico), ou 20 mL de hexano e 20 mL de tampão citrato/fosfato pH 7,0 (meio bifásico), ou 40 mL de tampão citrato/fosfato pH 7,0 (meio aquoso) e 100 mg de

substrato solubilizado previamente em DMSO. A mistura reacional foi conduzida ao agitador tipo *shaker* a 160 rpm e 30°C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 2 - Biorredução da acetofenonas substituídas mediada por vegetais.



Os experimentos foram acompanhados durante 24 horas. Os produtos das reações foram analisados por CGQ. As alíquotas retiradas dos experimentos realizados em meio aquoso foram extraídas com acetato de etila antes de serem analisadas por CGQ (OMORI, PORTAS e OLIVEIRA, 2012).

## 2.6 ANÁLISE EM CROMATÓGRAFO GASOSO DE FASE QUIRAL (CGQ)

A análise da formação do produto foi realizada em cromatógrafo gasoso equipado com coluna de fase quiral sob as seguintes condições de análise: split na razão de 1:20, temperatura inicial e final da coluna de 100°C e 210°C, respectivamente e rampa de aquecimento de 4°C por minuto. A pressão do gás carreador H<sub>2</sub> foi de 75 kPa, a temperatura do injetor de 250°C e do detector 275°C. Os tempos de retenção dos álcoois quirais formados foram confirmados com a injeção dos padrões racêmicos.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO E DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO

Para a determinação da porcentagem de conversão (%c) e do excesso enantiomérico (ee), as alíquotas retiradas dos experimentos foram analisadas por CGQ. As áreas dos picos dos substratos e dos produtos foram comparadas e sua soma considerada 100% (AITKEN e KILÉNYI, 1992). O grau de seletividade foi determinado segundo a equação abaixo.

$$ee (\%) = \frac{(R - S)}{(R + S)} \times 100$$

Onde *R* e *S* são as quantidades relativas dos enantiômeros (*R*) e (*S*).

## 2.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Após a triagem dos vegetais nos diferentes sistemas biocatalíticos, foi realizado um planejamento experimental fatorial, a fim de verificar a influência da concentração de substrato, do tempo de reação e do pH do meio sobre a conversão a produto das reações de redução. O Software Statistica 7.0 foi utilizado para a análise dos dados, com nível de significância de 95%.

Para as reações em meio orgânico foi realizado um planejamento experimental fatorial completo  $2^2$ , utilizando como variáveis de estudo o tempo de reação (t) e a concentração do substrato carbonílico (S). A matriz do planejamento experimental está apresentada na Tabela 1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  para as reações biocatalíticas mediadas por vegetais realizadas em meio orgânico.

Ensaio	S (mg/mL)	t (h)
1	30	24
2	50	24
3	30	360
4	50	360

S = substrato; t = tempo de reação.

Para as reações realizadas em sistema bifásico foi realizado um planejamento experimental fatorial completo  $2^3$ , utilizando como variáveis de estudo o tempo de reação (t), a concentração do substrato carbonílico (S) e o pH do meio aquoso. A matriz do planejamento está apresentada na Tabela 2. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo  $2^3$  para as reações biocatalíticas mediadas por vegetais realizadas em meio bifásico.

Ensaio	S (mg/mL)	t (h)	pH*
1	30	24	4,5
2	50	24	4,5
3	30	360	4,5
4	50	360	4,5
5	30	24	7,0
6	50	24	7,0
7	30	360	7,0
8	50	360	7,0

S = substrato; t = tempo de reação. \*pH 4,5= tampão citrato/fosfato; pH 7,0 = tampão fosfato

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO

Os resultados obtidos nos experimentos de biorredução estão apresentados em função dos substratos carbonílicos utilizados.

##### 3.1.1 Redução da *p*-aminoacetofenona

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) para as reações de biorredução da *p*-aminoacetofenona mediadas por vegetais onde foi possível detectar a formação dos produtos após 24 h.

Tabela 3 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas por vegetais nos diversos sistemas biocatalíticos.

Biocatalisador	Conversão P1 (%)	Conversão P2 (%)	ee (%)	Sistema*
Cubiu	20,7	0	>99	Orgânico
Cipó kupá	33,7	0	>99	Orgânico
<b>Batata Doce</b>	<b>80,3</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
Batata Doce	4,0	0	>99	Bifásico
<b>Berinjela</b>	<b>71,8</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
Berinjela	36,1	0	>99	Bifásico
Gengibre	3,7	0	>99	Bifásico
Taioba (Caule)	28,4	0	>99	Orgânico
Taioba (Caule)	54,5	0	>99	Bifásico
Taioba (Folha)	46,5	0	>99	Orgânico
Taioba (Tubérculo)	51,6	0	>99	Bifásico
<b>Taioba (Tubérculo)</b>	<b>93,6</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>

\*Aquoso = 40 mL de tampão fosfato pH 7,0; Bifásico = 20 mL de hexano + 20 mL de tampão fosfato pH 7,0; Orgânico = 40 mL de hexano.

Como pode ser observado na Tabela 3, de maneira geral, as conversões a produto foram expressivas, com valores acima de 50% em cinco reações biocatalíticas, tendo como destaque a reação utilizando a batata doce, a berinjela e a taioba roxa como biocatalisadores em meio reacional orgânico, com valores de conversão de 80,3%, 71,8% e 93,6%, respectivamente. Outro resultado de destaque foi o obtido nas reações utilizando o caule da taioba roxa em sistema bifásico, que apresentou 54,5% de conversão e com o tubérculo da



taioxa roxa em sistema bifásico e meio orgânico, com valores de conversão de 51,6% e 93,6%, respectivamente. É importante ressaltar que todas as essas reações foram enantiosseletivas, pois houve a produção de apenas um enantiômero durante a reação de biorredução.

A explicação para este bom desempenho da reação pode estar associada ao substrato utilizado, pois o grupo amino ligado ao anel aromático é conhecido como doador de elétrons, aumentando a densidade eletrônica da carbonila, tornando o carbono mais eletrofílico, facilitando assim a adição do hidreto. O efeito desses grupos é provocado principalmente pelo efeito de ressonância, facilitando assim a adição do hidreto ao carbono carbonílico (SOLOMONS e FRYHLE, 2010). Outro fator que pode ter contribuído para o bom desempenho da reação foi o uso do sistema bifásico que é composto por uma fase aquosa, onde as células ficam suspensas e assim podem realizar a manutenção do seu metabolismo normalmente, e por uma fase orgânica, que impede a formação de subprodutos devido a ocorrência de uma melhor solvatação do substrato e das células (LEON et al., 1998; HE et al., 2006; CAPELLO, FISHER e HUNGERBUHLER, 2007) e auxilia na solubilidade do substrato.

O meio contendo solvente orgânico apresentou o melhor resultado para a reação de biorredução tendo conversão a produto de 93,6%. O meio reacional orgânico pode fornecer rendimentos mais elevados quando comparados a sistemas onde se empregam somente água, além de diminuir a possibilidade de formação de subprodutos (LAANE et al. 1987; ATHANASIOU, SMALLRIDGE e TREWHELLA, 2001).

Em estudo realizado por Ferreira (2012) da biorredução da *p*-aminoacetofenona usando sementes de lentilha em meio aquoso não foi possível detectar a conversão ao produto após 72 horas de reação. Já Souza (2012), para esta mesma reação, utilizou a berinjela como biocatalisador em meio aquoso e da mesma maneira não obteve formação de produto. Estes resultados mostram que em menos tempo o processo biocatalítico utilizado neste estudo se mostrou mais eficiente para a obtenção do produto que pertence à classe dos amino-álcoois bastante citado na literatura como precursores de diversos fármacos quirais (CHARTRAIN et al., 2001).

### 3.1.2 Redução da *p*-hidroxiacetofenona

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) para as reações de biorredução da *p*-hidroxiacetofenona mediadas por vegetais onde foi possível detectar a formação dos produtos após 24 h.

Tabela 4 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-hidroxiacetofenona mediadas por vegetais nos diversos sistemas biocatalíticos.

Biocatalisador	Conversão P1 (%)	Conversão P2 (%)	ee (%)	Sistema*
Berinjela	11,2	27,3	41,82	Orgânico
Berinjela	12,7	29,8	40,2	Bifásico
Batata doce	23,6	32,3	15,5	Bifásico
Batata doce	13,4	29,4	37,3	Aquoso
<b>Batata doce</b>	<b>0</b>	<b>30,4</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
Cenoura	50,7	19,3	44,7	Orgânico
<b>Cenoura</b>	<b>0</b>	<b>45,5</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Bifásico</b>
Cenoura	32,4	15,6	34,9	Aquoso
Cipó kupá	35,1	16,6	35,6	Orgânico
Cipó kupá	24,5	19,6	11,1	Bifásico
Cipó kupá	62,7	22,4	47,3	Aquoso
Cubiu	55,7	18,9	49,2	Aquoso
Mandioca	28,6	19,4	18,9	Aquoso
Taioba (tubérculo)	28,6	19,2	19,7	Orgânico
Taioba (tubérculo)	29	31,5	4	Bifásico
Taioba (tubérculo)	20,3	17,1	8,4	Aquoso
Taioba (caule)	38,3	16	41	Orgânico
Taioba (caule)	36,7	15,4	40	Bifásico
Taioba (folha)	25,2	17,5	18	Orgânico
Taioba (folha)	36,4	37,3	1	Aquoso

\*Aquoso = 40 mL de tampão fosfato pH 7,0; Bifásico = 20 mL de hexano + 20 mL de tampão fosfato pH 7,0; Orgânico = 40 mL de hexano.

Como pode ser observado na Tabela 4, as reações biocatalíticas para as reações de redução da *p*-hidroxiacetofenona apresentaram valores de conversão a produto satisfatórios. Entretanto, os excessos enantioméricos foram baixos. Somente nas reações onde se utilizou a batata doce em meio orgânico e a cenoura em sistema bifásico obteve-se a formação de um dos produtos, com valores de conversão de 30,4% e 45,5%, respectivamente.

Outros resultados que merecem destaque são os da obtenção do (S) ou (R)-*p*-hidroxifeniletanol com converões de 62,7% e 22,4%, respectivamente, utilizando-se o cipó-kupá em tampão pH 7 (meio aquoso); e a reação em que o cubiu foi utilizado como biocatalisador em tampão pH 7, onde foi possível observar a formação dos álcoois com *c* = 55,7% e 18,9%, respectivamente.

Em estudo realizado por Yadav et al. (2002) da redução da *p*-hidroxiacetofenona utilizando a cenoura como biocatalisador em meio aquoso foi possível detectar a formação de produto após 47 horas de reação com conversão de 73% e enantiosseletividade de 91%. No presente estudo foi possível obter em um menor tempo 30,4% de um produto com elevada enantiosseletividade quando se utilizou a batata doce em meio orgânico.

### 3.1.3 Redução da *p*-nitroacetofenona

Na Tabela 5 estão apresentados os valores de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) para as reações de biorredução da *p*-nitroacetofenona mediadas por vegetais onde foi possível detectar a formação dos produtos após 24 h.

Tabela 5 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-nitroacetofenona mediadas por vegetais nos diversos sistemas biocatalíticos.

Biocatalisador	Conversão		ee (%)	Sistema*
	P1 (%)	P2 (%)		
Berinjela	1,9	2,1	5,8	Bifásico
Berinjela	3,6	6,3	27,1	Aquoso
Batata doce	7,9	11,5	18,2	Aquoso
Taioba (caule)	1	1,7	24,3	Aquoso
<b>Cubiu</b>	<b>0</b>	<b>3,9</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
Cubiu	0,02	0,3	86,4	Bifásico
Cubiu	4,2	6,4	20,4	Aquoso
Cipó kupá	9,8	13,9	17,3	Bifásico
<b>Cipó kupá</b>	<b>0</b>	<b>16,5</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
<b>Gengibre</b>	<b>0</b>	<b>1,3</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Bifásico</b>

\*Aquoso = 40 mL de tampão fosfato pH 7,0; Bifásico = 20 mL de hexano + 20 mL de tampão fosfato pH 7,0; Orgânico = 40 mL de hexano.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 5, pode-se observar que não houve nenhum resultado expressivo em se tratando de conversão a produto. No entanto, foram obtidos resultados com elevados valores de excesso enantiomérico em quatro reações: a reação utilizando o cubiu, que forneceu 3,9% de conversão; o gengibre, com 1,3% de conversão; e o cipó-kupá, com c = 16,5%.

Um fator que pode ser associado ao baixo desempenho desta reação é a elevada quantidade de substrato e a baixa quantidade de biocatalisador utilizados, quando comparado a outros estudos. Yadav et al. (2002) utilizaram 10 g de biocatalisador por reação, quantidade

consideravelmente maior que a usada neste estudo (50 mg). Além disso, a quantidade de substrato usada pelos autores foi de 100 mg, sugerindo que a alta concentração de substrato utilizada neste estudo (135 mg) pode ter inibido parcialmente a ação das enzimas. A reação realizada por Yadav et al. (2002) se procedeu por um tempo de 40 horas e foi possível obter uma conversão ao produto de 82% com excesso enantiomérico de 96%. Por último, a ineficiência do processo reacional pode estar associada à baixa afinidade das enzimas encontradas nos vegetais utilizados neste trabalho pelo substrato *p*-nitroacetofenona.

Nos trabalhos realizados por Pinheiro (2010) e Menezes et al. (2011), onde ambos utilizaram 1,0 mmol de substrato, com a casca e a polpa de tucumã como biocatalisadores, foi possível detectar a formação de produto após um tempo reacional de 48 horas, com valores de conversão maiores que 72% e excesso enantiomérico variando de 23% a 47%. Comparando estes estudos com o presente trabalho, é possível afirmar que em um menor tempo de reação foi possível obter valores de excesso enantiomérico superiores.

### 3.1.4 Redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona

Na Tabela 6 estão apresentados os valores de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) para as reações de biorredução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas por vegetais onde foi possível detectar a formação dos produtos após 24 h.

Observa-se na Tabela 6 que as reações onde foi possível detectar a formação preferencial de apenas um produto foram as mediadas pelo tubérculo da taioba roxa e pela mandioca, ambas realizadas em meio aquoso, apresentando conversão de 34,6%, sendo este o melhor valor de conversão obtido para este substrato. Os demais vegetais que apresentaram um bom resultado (ee > 99%) foram a cenoura e o cipó kupá, ambos em meio orgânico, apresentando valores de conversão de 19% e 16%, respectivamente. O caule da taioba roxa apresentou atividade biocatalítica quando a reação foi feita em meio aquoso, tendo valor de conversão de 18,2% para apenas um produto.

É importante ressaltar que o substrato *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona se mostrou promissor para estudos futuros, uma vez que não foram encontrados estudos na literatura sobre a biorredução deste substrato. Sendo assim, este trabalho contribuirá de forma significativa para os estudos de reações biocatalíticas além das clássicas reações onde se usam outros tipos de catalisadores como os metais, ácidos ou bases.

Tabela 6 - Percentagem de conversão e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-metoxi-*m*-nitroacetofenona mediadas por vegetais nos diversos sistemas biocatalíticos.

Biocatalisador	Conversão P1 (%)	Conversão P2 (%)	ee (%)	Sistema*
Taioba (folha)	14,3	10,6	14,7	Aquoso
Taioba (folha)	43,1	17,6	42,1	Bifásico
<b>Taioba (caule)</b>	<b>18,2</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
Taioba (caule)	10,9	6,3	26,5	Orgânico
<b>Taioba (tubérculo)</b>	<b>12,4</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
Taioba (tubérculo)	22,7	17,4	13,3	Bifásico
Taioba (tubérculo)	34,6	0	>99	Aquoso
<b>Mandioca</b>	<b>34,6</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Aquoso</b>
Mandioca	11,3	7,1	22,6	Orgânico
Mandioca	12,3	9,3	13,9	Bifásico
Gengibre	21,6	10,2	36	Aquoso
Gengibre	11,4	27,3	41	Orgânico
Gengibre	11,3	20,2	28,1	Bifásico
<b>Cipó kupá</b>	<b>16,5</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
Cenoura	17,3	26,9	21,6	Aquoso
<b>Cenoura</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>&gt;99</b>	<b>Orgânico</b>
Batata doce	17,7	28,5	23,4	Tampão*
Batata doce	24,1	14,5	25,1	Hexano

\*Aquoso = 40 mL de tampão fosfato pH 7,0; Bifásico = 20 mL de hexano + 20 mL de tampão fosfato pH 7,0; Orgânico = 40 mL de hexano.

### 3.2 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO BIOCATALÍTICAS UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os vegetais batata doce e beringela apresentaram bom desempenho como biocatalisadores nas reduções de redução da *p*-aminoacetofenona. Sendo assim, estes

vegetais foram selecionados para o estudo da influência das condições reacionais (concentração de substrato, tempo de reação e pH) sobre a conversão a produto, por meio de um planejamento experimental.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos para o planejamento fatorial completo  $2^2$ , realizado para a reação de redução da *p*-aminoacetofenona em meio orgânico, mediada pela beringela.

Tabela 7 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas pela beringela em meio orgânico.

Ensaio	S (mg/mL)	t (h)	c (%)*	ee (%)*
1	30	24	42,8	22,8
2	50	24	44,4	4,33
3	30	360	40,4	6,03
4	50	360	32,2	28,9

S = substrato; t = tempo de reação. \*valores correspondem à média das triplicatas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, as reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas pela berinjela apresentaram valores de excesso enantiomérico e conversão baixos. Isso pode ter ocorrido devido ao fato do biocatalisador ter sido armazenado por um longo período em freezer, o que pode ter levado à diminuição da atividade das oxidorrredutases, porém estas conseguiram ainda converter o substrato de maneira eficiente.

Na Figura 3 está apresentado o Diagrama de Pareto para as reações de redução da *p*-aminoacetofenona em meio orgânico, mediadas pela beringela.

Observa-se na Figura 3 que nenhuma das variáveis estudadas nas reações mediadas pela berinjela apresentaram significância estatística sobre a conversão. Sendo assim, para estes resultados não serão apresentadas as tabelas das estimativas dos efeitos e nem das superfícies de resposta.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos para o planejamento fatorial completo  $2^2$ , realizado para a reação de redução da *p*-aminoacetofenona em meio orgânico, mediada pela batata doce.

Figura 3 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas pela beringela em meio orgânico.

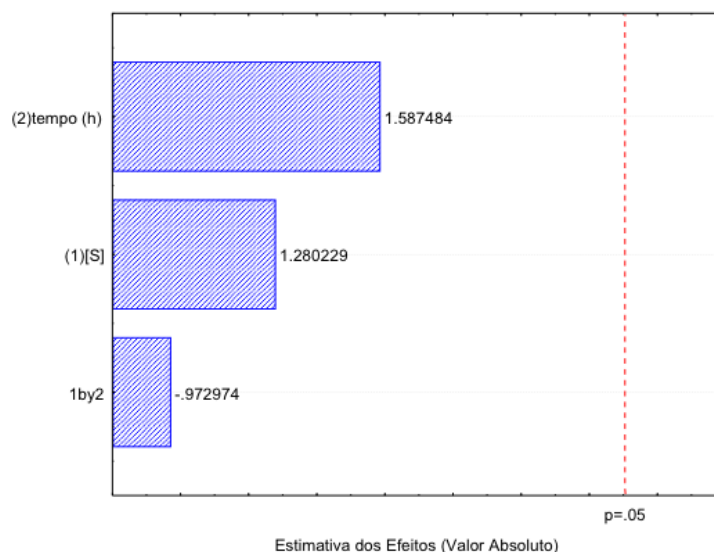


Tabela 8 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio orgânico.

Ensaio	S (mg/mL)	t (h)	c (%)*	ee (%)*
1	30	24	43,3	21,6
2	50	24	31,5	19,1
3	30	360	49,0	16,4
4	50	360	44,5	23,5

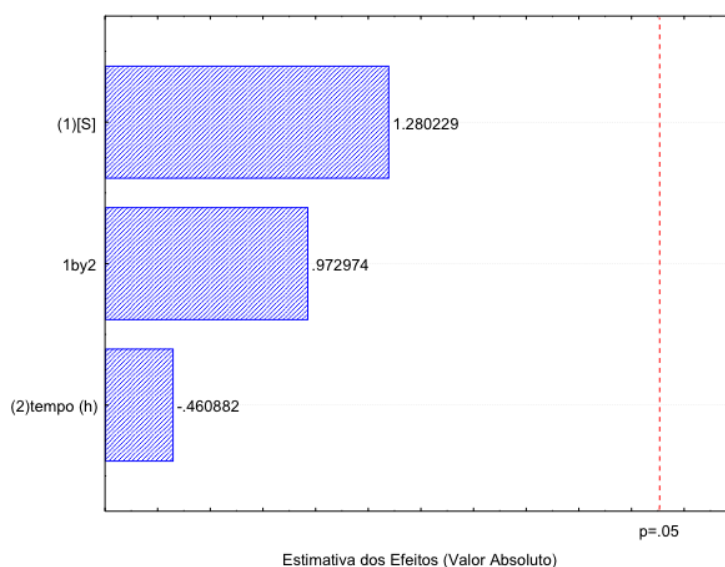
S = substrato; t = tempo de reação. \*valores correspondem à média das triplicatas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, as reações de redução da *p*-aminoacetofenona medidas pela batata doce apresentaram valores de excesso enantiomérico que variam de 19 a 23,6% ao longo de todo o experimento. As conversões a produto variaram entre 43,3 e 49%. Estes resultados mostram que o tempo e a concentração do substrato não influenciaram na atividade da enzima. Novamente isso pode ter ocorrido devido à batata doce ter ficado armazenada por um longo período em freezer, o que pode ter levado à enzima perder sua atividade catalítica.

Na Figura 4 está apresentado o Diagrama de Pareto para as reações de redução da *p*-aminoacetofenona em meio orgânico, mediada pela batata doce. Como pode ser observado na Figura 4, nenhuma das variáveis estudadas apresentou significância estatística sobre a conversão a produto, porém, o aumento da concentração de substrato tem uma importância que pode ser explorada em estudos futuros, uma vez que o efeito mostrou-se positivo, ou seja, aumentando a concentração de substrato poderá levar a um aumento de produto. Deve-se lembrar que reações enzimáticas são reversíveis e devido a essa natureza dinâmica a

formação do produto pode não ter sido beneficiada. Sendo assim, para estes resultados obtidos não serão apresentadas as tabelas das estimativas dos efeitos e nem das superfícies de resposta.

Figura 4 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio orgânico.



Na Tabela 9 estão apresentados os resultados obtidos para o planejamento fatorial completo  $2^3$ , realizado para a reação de redução da *p*-aminoacetofenona em meio bifásico, mediada pela batata doce.

Tabela 9 - Percentagem de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio bifásico.

Ensaio	S (mg/mL)	t (h)	pH*	c (%)**	ee (%)**
1	30	24	4,5	60,0	20,2
2	50	24	4,5	51,0	7,8
3	30	360	4,5	42,0	9,4
4	50	360	4,5	42,0	8,2
5	30	24	7,0	37,6	12,5
6	50	24	7,0	46,4	11,9
7	30	360	7,0	36,4	14,2
8	50	360	7,0	46,1	23,4

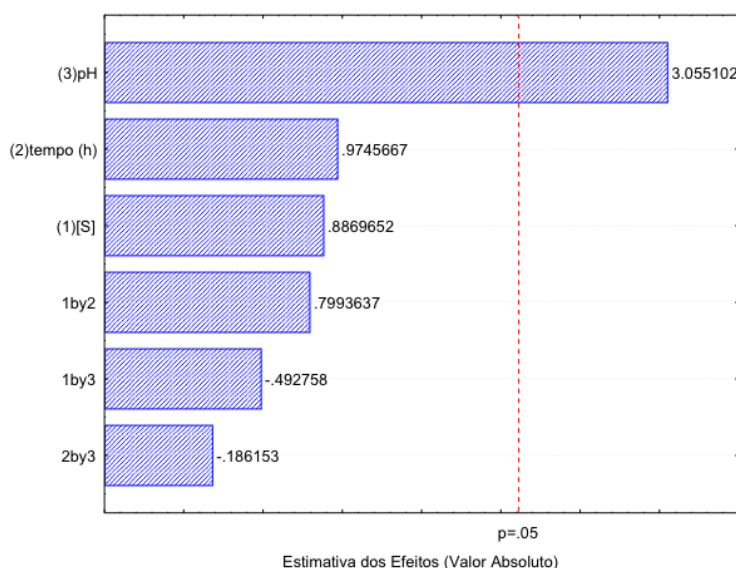
S = substrato; t = tempo de reação. \*pH 4,5= tampão citrato/fosfato; pH 7,0 = tampão fosfato. \*\*valores correspondem à média das triplicatas.



De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9 para as reações de redução da *p*-aminoacetofenona medidas pela batata doce apresentaram valores de excesso enantiomérico que variam de 8,2 a 23,4% ao longo de todo o experimento. No entanto, os valores de conversão obtidos para as reações realizadas em sistema bifásico com tampão pH 4,5 foram elevados nas primeiras 24 horas nos ensaios 1 e 2. Estes resultados mostram que o pH apresenta certa influencia na atividade da enzima, pois este pode alterar a sua estrutura tridimensional, alterando sua atividade catalítica (NELSON e COX, 2002). De acordo com os resultados obtidos, o aumento do pH reduziu a atividade catalítica da enzima.

Na Figura 5 está apresentado o Diagrama de Pareto para as reações de redução da *p*-aminoacetofenona em meio bifásico, mediada pela batata doce.

Figura 5 - Diagrama de Pareto para as conversões (c) das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio bifásico.



Como pode ser observado na Figura 5, o pH apresentou significância estatística para o nível de confiança de 95%. Uma vez que o efeito foi positivo, o aumento do valor do pH levou ao aumento da conversão a produto. Sendo assim, para estes resultados obtidos serão apresentadas as tabelas das estimativas dos efeitos e das superfícies de resposta.

Os valores dos efeitos das variáveis estudadas sobre a conversão das reações de redução da *p*-aminoacetofenona, obtidos com o planejamento experimental  $2^3$  utilizando a batata doce em meio bifásico estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Estimativa dos efeitos ( $p \leq 0,05$ ) para conversão das reações de redução da *p*-aminoacetofenona obtidos com o planejamento experimental  $2^3$  utilizando a batata doce em meio bifásico.

	Efeito	<i>p</i>
<b>Média</b>	<b>102,8750</b>	<b>0,000000</b>
(X <sub>1</sub> ) [S]	6,7500	0,387474
(X <sub>2</sub> ) tempo	7,4167	0,343440
<b>(X<sub>3</sub>) pH</b>	<b>23,2500</b>	<b>0,007161</b>
1 x 2	6,0833	0,435107
1 x 3	-3,7500	0,628487
2 x 3	-1,4167	0,854528

Em negrito: significância estatística ( $p \leq 0,05$ ).

Para se obter a influência individual de cada um dos fatores e também a influência de dois ou mais tomados conjuntamente, levando em conta as interações existentes entre eles, utiliza-se a análise de variância (ANOVA), a qual fornece parâmetros que permitem determinar a significância estatística de determinado fator. A partir da análise de variância são determinados os coeficientes do modelo matemático que melhor descreve a resposta (conversão a produto) do sistema à variação dos parâmetros no intervalo dos níveis analisados (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A Tabela 11 apresenta a ANOVA do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para avaliar a conversão, obtida com o planejamento fatorial completo  $2^3$ . O parâmetro F desta tabela permite determinar se a relação entre a conversão e determinada variável é estatisticamente significativa. Sendo o valor de F maior que 1,0 existirá relação significativa entre as variáveis dependente e independente, e para que o modelo matemático seja útil para fins preditivos o parâmetro F deverá ser superior a 4,0 (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995).

Os valores dos efeitos dos parâmetros estudados sobre a conversão (Tabela 10) representam os coeficientes da equação do modelo matemático, o qual contempla as interações entre as variáveis significativas, combinadas duas a duas, sendo classificado, portanto, como não linear. A equação do modelo matemático que proporciona a melhor descrição da conversão das reações de biorredução da *p*-aminoacetofenona utilizando a batata doce em meio bifásico em função da variação dos parâmetros nos intervalos dos níveis analisados, é apresentada a seguir.

$$Y = 102,8750 + 23,2500 \cdot X_3 \quad (1)$$

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas para a conversão a produto das reações de redução da *p*-aminoacetofenona obtida com o planejamento fatorial completo  $2^3$  utilizando a batata doce em meio bifásico.

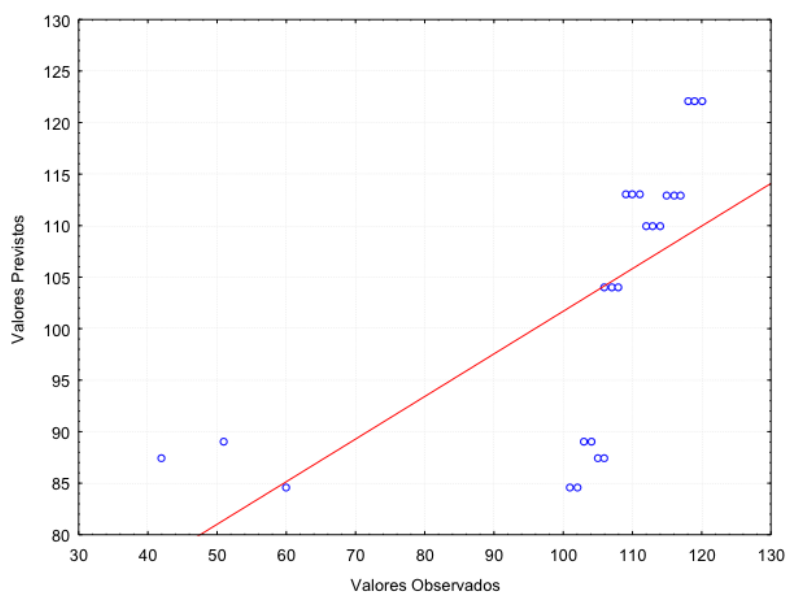
Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>
(X <sub>1</sub> ) [S]	273,38	1	273,38	0,786707	0,387474
(X <sub>2</sub> ) Tempo	330,04	1	330,04	0,949780	0,343440
<b>(X<sub>3</sub>) pH</b>	<b>3243,38</b>	<b>1</b>	<b>3243,38</b>	<b>9,333651</b>	<b>0,007161</b>
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	222,04	1	222,04	0,638982	0,435107
X <sub>1</sub> .X <sub>3</sub>	84,38	1	84,38	0,242811	0,628487
X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub>	12,04	1	12,04	0,034653	0,854528
Erro	5907,37	17	347,49	-	-
Total SQ	10072,63	23	-	-	-

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = F<sub>calculado</sub>; *p* ≤ 0,05. Em negrito: significância estatística.

Devido aos valores do parâmetro F (>4,0) associado a cada fator, o modelo é capaz não só de descrever, mas também de prever a resposta do sistema dentro das faixas de valores das condições analisadas (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995).

A correlação entre os valores previstos e os valores observados efetivamente para as conversões das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio bifásico, está apresentada na Figura 6. Observa-se que as respostas experimentais obtidas para a conversão apresentam valores próximos aos da equação empírica.

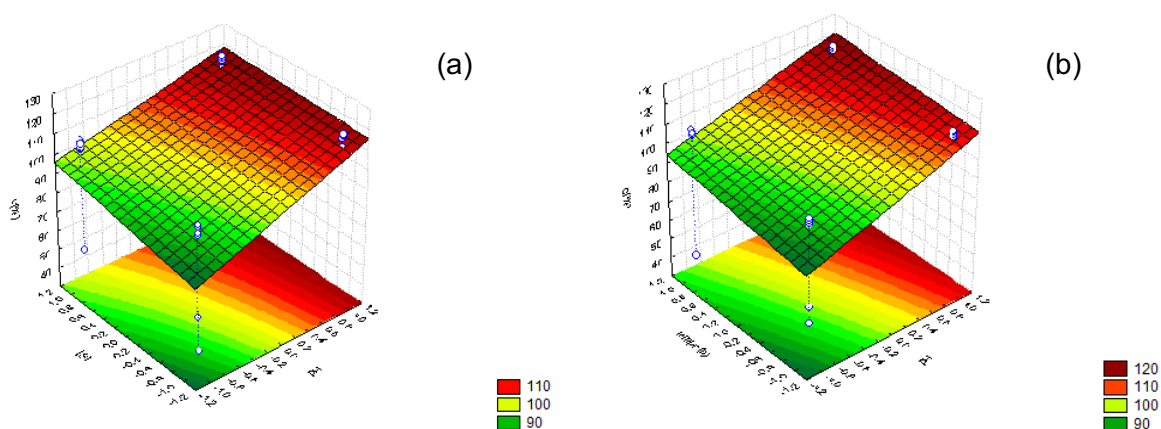
Figura 6 - Correlação entre os valores previstos e os valores observados para as conversões das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio bifásico.



O coeficiente de correlação  $R^2$  associado à equação (1) vale 0,41352 e o valor ajustado deste coeficiente é de 0,20653. Isto significa que o modelo deduzido é capaz de explicar apenas 41,35% do comportamento da variável de resposta (conversão) dentro do intervalo de variação dos fatores adotados.

Com a realização do planejamento experimental foi possível avaliar graficamente o efeito das variáveis sobre a conversão através da análise das superfícies de resposta (Figura 7). Em (a) fica evidente que em elevados valores de pH e tempo pode-se obter um aumento da conversão ao álcool quiral, em (b) observa-se que em um sistema como maior quantidade de substrato e de elevado pH é possível obter valores maiores de conversão ao álcool quiral.

Figura 7 - Superfícies de resposta para as conversões das reações de redução da *p*-aminoacetofenona mediadas pela batata doce em meio bifásico como uma função do pH e do tempo de reação (a); e como uma função da concentração de substrato e do tempo de reação (b).



#### 4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram obtidos resultados que demonstram o potencial biotecnológico das enzimas produzidas por diversas plantas e vegetais encontrados na região Amazônica como biocatalisadores para reações de redução. Diferentes partes dessas plantas e vegetais conseguiram converter com sucesso o substrato carbonílico a alcoóis quirais enantiomericamente puros, com destaque para o tubérculo da taioba roxa.

Na redução da *p*-aminoacetofenona em meio orgânico em que foi utilizada a beringela como biocatalisador, o tempo de reação e a concentração de substrato não influenciaram significativamente a conversão a produto, embora a menor concentração do substrato, e os menores tempos tenham favorecido o aumento das conversões. Quando se utilizou a batata doce para reação de redução do mesmo substrato, os fatores estudados não apresentaram influência significativa.

Na redução da *p*-aminoacetofenona em sistema bifásico, o fator estudado que influenciou significativamente a conversão a produto foi o pH, que em valores mais altos favorece um aumento das conversões a produto.

Espera-se que com estes resultados mais pesquisas sejam realizadas com o objetivo de se explorar o potencial biotecnológico de outras plantas cultivadas em solo Amazônico com ênfase na biocatálise.

## 5 REFERÊNCIAS

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

ALBAGLI, S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. ***Parcerias Estratégicas CGEE***, Brasília-DF, v. 11, n. 12, 2001.

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. 141-144, 2007.

ATHANASIOU, N.; SMALLRIDGE, A. J.; TREWHELLA, M. A. Baker's yeast reduction of  $\beta$ -keto esters and  $\beta$ -keto amides in an organic solvent system. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 11, p. 893-896, 2001.

BENAMANE, M.; ZEROR, S.; ZOUIOUCHE, A. Asymmetric reduction of ketones by biocatalysis using medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit grown in Algeria. ***Biocatalysis and Biotransformation***, v. 32, p. 327-332, 2014.

BON, E. P. S.; ANTONIETA, M. F.; LUÍSA, M. C.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; BICCA., R. A.; COELHO, R. R. R. ***Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado***. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BORMAN, S. Beta-peptides: natureimproved. ***Chemical & Engineering News***, v.16, p. 32-35, 1997.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. ***Green Chemistry***, v. 9, n. 9, p. 927-934, 2007.

CHARTRAIN, M.; GREASHAM, R.; MOORE, R.; RAIDER, J.; ROBSON, D.; BUCKLAND, B.; Asymaetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceutical. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 11, p. 503-512, 2001.

DIEDERICHS, S.; LINN, K.; LUCKGEN, J.; KLEMENT, T.; GROSCH, J. H.; HONDA, K.; OHTAKE, H.; BUCHS, J.; High-level production of (5S)-hydroxyhexane-2-one by two thermostable oxidoreductases in a whole-cell catalytic approach. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 121, p. 37-44, 2015.

DURÁN, N.; CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R. Biotransformations by microorganisms, organisms and enzymes: state of art. ***Boletín de la Sociedad Chilena de Química***, v. 45, p.109-121, 2000.

FERREIRA, D. A. Reações biocatalíticas usando células íntegras de *Lens culinaris* (lentilha), 145p, 2012. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

FIORAVANTI, C. A maior diversidade de plantas do mundo, **Revista Pesquisa FAPESP**, v. 241, p. 42-47, 2016.

HE, J. Y.; SUN, Z. H.; RUAN, W. Q.; XU, Y. Biocatalytic synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxy-butanoate in an aqueous-organic solvent biphasic system using *Aureobasidium pullulans* CGMCC 1244. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 244-249, 2006.

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

MATSUDA, R.; YAMANAKA R.; NAKAMURA K.; Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 5, p. 513-557, 2009.

MENEZES, F. F.; PINHEIRO, D. S.; FERNANDES, L. T. B.; da SILVA, W. S.; SOUZA, L. B. P. de; FERNANDES, L.; ZANOTTO, S. P.; FONSECA, M. D. P. **Biotransformação da p-nitroacetofenona utilizando biocatalisadores amazônicos: microrganismos e tucumã**. In: 34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis, 2011.

OMORI, A. T.; PORTAS, V. B.; de OLIVEIRA, C. de S.; Redução enzimática do 4-(dimetilamino) benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): um experimento simples na compreensão da biocatálise. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 435-437, 2012.

PINHEIRO, D. S. **Redução enantiosseletiva de cetonas utilizando fungos endofíticos da Amazônia**. 2010. 111 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 1, p. 12-15, 1998.

SOARES, M. F. **Aplicação da relação entre estrutura e retenção cromatográfica (qsrr) empregando diferentes descritores para cumarinas, acetofenonas e triterpenos. estudo de um novo índice para alcanos e alcenos**. 2000. 189 p. Tese de Doutorado em Química Analítica. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, 10ªed. Rio de Janeiro: LTC, 189 p. 2010.

SOUZA, J. M. O.; BERTINI, L. M.; SOARES, A. A.; SILVA, F. F. M.; MATTOS, M. C.; LEMOS, T. L. G.; **Biorredução da acetofenona e derivados utilizando células íntegras de *Solanum melongena* (Berinjela)**. In: Workshop de Biotálise e Biotransformação, Fortaleza, 2012.

SOUZA, D. de M. **Biotransformações utilizando biocatalisadores de células íntegras de vegetais cultivados no Cerrado em Reações de Redução de Cetonas Aromáticas**. 2013. 102 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais, Instituto de Ciências Ambientais e Desenvolvimento Sustentável. Universidade Federal da Bahia, Barreiras. 2013.

VOGEL, A. I. **A Text-Book of Practical Organic Chemistry**. 3.ed. London: Longman, p. 1188, 1974.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; THIRUPATHI-REDDY, P.; BHASKAR-RAO, A. J. Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 3900-3903, 2002.

ZHENG, G. W.; XU, J. H.; New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 784-792, 2011.