



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso

**INFLUÊNCIA DO SUPORTE NA REDUÇÃO DO
ACETOACETATO DE ETILA MEDIADA POR
FERMENTO DE PÃO IMOBILIZADO**

**Graduanda: Maria Alice Witt
Orientadora: Dra. Maria da Graça Nascimento
Co-orientadora: Patrícia Melchionna Albuquerque**

Florianópolis, novembro de 2005.

MARIA ALICE WITT

**INFLUÊNCIA DO SUPORTE NA REDUÇÃO DO
ACETOACETATO DE ETILA MEDIADA POR
FERMENTO DE PÃO IMOBILIZADO**

Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Química, realizado no Laboratório de Biocatálise-UFSC, semestre 2005-2.

Disciplina QMC 5510 – Estágio Supervisionado.

Coordenadora de Estágio: Prof^a Iolanda da Cruz Vieira.

Orientadora de Estágio: Prof^a Maria da Graça Nascimento.

Co-orientadora: Patrícia Melchionna Albuquerque.

Florianópolis-SC, novembro de 2005.

Semestre 2005-2

“Conhecer alguém aqui e ali que pensa e sente como nós, e que embora distante, está perto em espírito, eis o que faz da Terra um jardim habitado.”

Goethe

“Uma mente que se abre a novas idéias jamais retorna ao seu tamanho original”

Albert Einsten

AGRADECIMENTOS

- ★ A Deus, por ter colocado pessoas muito especiais no meu caminho.
- ★ A minha família, Pai, Mãe, L. Mateus (&Ania) e Paulo E., por toda estrutura familiar construída; por estarem sempre por perto, dando amor, apoio, compreensão, enfim, por me fazerem acreditar que sou capaz. Amo muito vocês!
- ★ A Prof^a Maria da Graça Nascimento, pela amizade, grande dedicação na orientação desse trabalho, e também pelas oportunidades que me proporcionou ao longo desta caminhada acadêmica. Deixo aqui expresso, meu profundo respeito e gratidão!
- ★ Ao Prof. Boris A Stambuk do departamento de bioquímica, pelas valiosas contribuições (aulas e seminários)!!
- ★ Em especial, a Pati, que além de amiga e co-orientadora, se tornou um grande exemplo, sempre me incentivando e contribuindo para que eu pudesse compreender melhor sobre o microorganismo utilizado no trabalho. Sou muito grata pela “paciência” que teve!!
- ★ Aos amigos do laboratório de Biocatálise, Aline, Cris, Damiani, Fer, Marcelo, Thiago “Bergler”, Tiago Augustinho, Pati, Vanessa e Xande, que fizeram do dia-a-dia e das viagens muitos mais do que um local de trabalho e estudo. Tenho grande admiração por todos vocês!
- ★ Aos grandes amigos que conquistei ao longo do curso, Sú, Paulinha, Larissa, Roberta, Cleidy, Fabi, Xande, Heros, Paulo, Bruno, Jair, Luciano, Thiago C., Tiago F., Fernando, dentre outros. Desejo sucesso a todos!
- ★ Aos vários amigos que conheci também fora do curso, Car&Gabriel, Tati, Frantz, Gis, Juli’s, Ania, Tere, Lêle, Lê&Wilmar, Rê&João, Jacky&Regis, Murilo, Duda, Xittits e muitos outros. Vários momentos bons compartilhados!!!
- ★ Aos meus primos Carlo, Dudy e Junior! Vocês representam muito para mim!
- ★ A todos os professores do Departamento de Química que contribuíram para minha formação acadêmica, em especial Prof. Eduardo A. Pinheiro, Prof. José R. Bertolino, Prof. César Zucco, Prof. Antonio C. Joussef, Prof. Marcus C. Sá e Prof. Luiz A. Madureira, pelos quais tenho grande admiração!
- ★ Ao Prof. Hugo Gallardo por possibilitar as análises de polarimetria.
- ★ A Central de Análises.
- ★ A UFSC e CNPQ pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Enzimas: catalisadores específicos	01
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como biocatalisador em síntese orgânica	06
1.3. Imobilização	09
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. PARTE EXPERIMENTAL	16
3.1. Materiais	16
3.1.1. Reagentes utilizados na biotransformação com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (fermento de pão, FP)	16
3.1.2. Equipamentos e Caracterização dos Produtos	16
3.2. Procedimento geral de imobilização do FP nos diferentes suportes poliméricos	18
3.2.1. Imobilização do FP em filmes de caseinato de sódio (CS)	18
3.2.2. Imobilização do FP em filmes de poli (óxido de etileno) (PEO)	19
3.2.3. Imobilização do FP em filmes de poli (álcool vinílico) (PVA)	19
3.2.4. Imobilização do FP em montmorilonita K-10	20
3.2.5. Determinação do teor de água para os diferentes suportes poliméricos	20

3.2.6.	Procedimento utilizado para a redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila catalisada pelo sistema FP/CS	21
3.2.7.	Procedimento geral para a reação de redução do acetoacetato de etila mediada por FP imobilizado em filmes de PVA e PEO	22
3.2.8.	Procedimento utilizado para a reutilização do biocatalisador imobilizado	22
3.2.9.	Procedimento utilizado para a redução do acetoacetato de etila em maior escala mediada por FP/K10	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1.	Caracterização dos filmes	24
4.1.1.	Determinação do teor de água	24
4.1.2.	Estabilidade dos sistemas FP/CS, FP/PVA e FP/PEO frente a solventes orgânicos	24
4.2.	Redução do acetoacetato de etila com o sistema FP/CS	25
4.3.	Influência dos açúcares na proteção celular durante a redução do acetoacetato de etila com o sistema FP/CS	26
4.4.	Redução do acetoacetato de etila com os sistemas FP/PVA e FP/PEO	32
4.5.	Obtenção do álcool <i>S</i> -(+)-3-hidroxi-butanoato de etila em maior escala a partir do FP imobilizado em montmorilonita K10	37
5.	CONCLUSÕES	39
6.	PERSPECTIVAS	41
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8.	PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da seqüência primária de uma enzima.	01
Figura 2. Representação esquemática da estrutura tridimensional da piruvato quinase humana.	02
Figura 3. Barreira de ativação de uma reação não-catalisada (a) e catalisada (b).	02
Figura 4. Mecanismo proposto por Ogston, conhecido como “regra dos três pontos”.	03
Figura 5. Semelhança entre as estruturas do piruvato (1) e do anion acetoacetato (2).	04
Figura 6. Células da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	06
Figura 7. Estrutura monomérica da β -1,3 glucana (a) e da quitina (b).	07
Figura 8. Estrutura monomérica da mananaproteína.	08
Figura 9. Reação de redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila (3).	09
Figura 10. Relação mútua entre os diversos componentes envolvidos em uma reação biocatalisada em meio orgânico.	09
Figura 11. Diferentes métodos utilizados para imobilização de enzimas.	10
Figura 12. Estrutura cristalina da montmorilonita K-10.	11
Figura 13. Reação de redução enantiosseletiva da α -cloroacetofenona (5).	12
Figura 14. Estruturas propostas para as micelas de caseína.	13
Figura 15. Estruturas do poli (álcool vinílico) (a) e poli (óxido de etileno) (b), respectivamente.	13
Figura 16. Cromatograma obtido por CG do reagente e do produto racêmico.	17
Figura 17. Procedimento geral utilizado na imobilização do FP em suportes poliméricos.	18
Figura 18. Procedimento utilizado para imobilização do FP em K10.	20
Figura 19. Procedimento geral usado para reação de redução do acetoacetato de etila utilizando FP imobilizado nos diferentes suportes poliméricos.	21
Figura 20. Conversão ao álcool S-(+)-(4) em função das diferentes quantidades do substrato (3) e do tempo.	25
Figura 21. Conversão ao álcool S-(+)-(4) em função do tempo, com os diversos sistemas biocatalíticos. 1 g de FP, 1,57 mmol de (3).	26
Figura 22. Conversão ao álcool S-(+)-(4) em função do tempo, com os diversos sistemas biocatalíticos. 2 g de FP, 1,57 mmol (3).	27
Figura 23. Conversão ao álcool S-(+)-(4) em função do tempo, com os diversos sistemas biocatalíticos contendo 1 ou 2 g de FP imobilizado.	28
Figura 24. Conversão ao álcool S-(+)-(4) em função do tempo com o sistema FP/CS/S/T contendo 1 ou 2 g de fermento de pão imobilizado.	29
Figura 25. Conversão ao álcool S-(+)-(4) com os diferentes sistemas biocatalíticos reutilizados, em função do tempo. 2,0 g de FP e 1,57 mmol de (3).	30

- Figura 26.** Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo para o sistema FP/CS. 2 g e 1,57 mmol (3). 31
- Figura 27.** Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo para o sistema FP/CS/T. 2 g de FP e 1,57 mmol (3). 31
- Figura 28.** Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo para o sistema FP/CS/T. 2 g de FP e 1,57 mmol de (3). 32
- Figura 29.** Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo, com o FP imobilizado em filmes de PVA e PEO. 2 g FP, 1,57 mmol de (3). 33
- Figura 30.** Cromatogramas obtidos ao longo da reação de redução de (3), com o sistema FP/PEO/S/T. 34
- Figura 31.** Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo, com o FP imobilizado nos diferentes suportes poliméricos com adição simultânea de S e T. 1g FP, 1,57 mmol (3). 35
- Figura 32.** Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo para os diversos sistemas biocatalíticos. 1 ou 2g FP, 1,57 mmol (3). 35
- Figura 33.** Cromatograma de uma alíquota da reação utilizando o sistema FP/K10 evidenciando o pico do reagente e o cromatograma do produto obtido após sete dias de reação 37
- Figura 34.** Espectro de RMN-¹H do álcool (4), obtido via biorredução com o sistema FP/K10. (400 MHz, CDCl₃). 38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Condições de operação do cromatógrafo CG-14B para determinação do excesso enantiomérico e conversão na reação de redução do acetoacetato de etila..	17
Tabela 2. Valores de ee do álcool S(+)-4 obtidos com os diferentes sistemas biocatalíticos.	36

LISTA DE ABREVIATURAS

Siglas

IUBMB União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

Abreviaturas

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
CS	Caseinato de sódio
LPS	Lipase de <i>Pseudomonas</i> sp
PVA	Poli (álcool vinílico)
PEO	Poli (óxido de etileno)
LMJ	Lipase de <i>Mucor javanicus</i>
LRO	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
FP	Fermento de pão
K10	Montmorilonita K10
T	Trealose
S	Sacarose
FID	Detector de Ionização de Chama
G	Glicerol
CG	Cromatógrafo a Gás
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
%c	Porcentagem de conversão
ee	Excesso enantiomérico

RESUMO

A redução enantiosseletiva de cetonas mediada por leveduras é uma estratégia bastante eficaz na obtenção de álcoois quirais, importantes blocos de construção para a síntese de fármacos e substâncias químicas de alto valor comercial.

O uso das células de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão comercial, FP) como biocatalisador nestas reações, surge como uma alternativa simples e de baixo custo na introdução da quiralidade em moléculas de interesse, graças à alta especificidade de suas redutases e por atuarem em condições reacionais brandas. O uso de meio orgânico facilita a solubilização do substrato e a recuperação do produto, porém, torna-se necessário proteger o biocatalisador através de técnicas de imobilização ou através da adição de açúcares ao meio reacional.

Neste trabalho, avaliou-se a influência do suporte (filmes de caseinato de sódio, CS, poli (óxido de etileno), PEO e poli (álcool vinílico), PVA) na imobilização das células de FP comercial na biorredução do acetoacetato de etila. Efeitos da adição de açúcares (trealose, T e/ou sacarose, S) sobre o excesso enantiomérico (ee) do produto e na percentagem de conversão (%c) também foram discutidos. Adicionalmente, foi testada a montmorilonita K10 como suporte para a imobilização de FP. Este sistema foi utilizado na obtenção do álcool *S*-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila em maior escala, que posteriormente será utilizado na síntese de feromônios.

Os valores de ee obtidos foram maiores que 99% para a maioria dos sistemas biocatalíticos utilizados, porém as conversões foram relativamente baixas, não ultrapassando 30%.

Com o sistema FP/CS/S/T contendo 2,0 g do biocatalisador, obteve-se os maiores valores de conversão (65%, após 96 h), contudo o ee foi de apenas 17%.

Foi também testado o K10 como suporte para a imobilização do FP utilizado com o objetivo de se obter o álcool *S*-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**4**) em maior escala. Análises de CG-quiral e RMN-¹H, indicaram que o álcool quiral foi obtido, com um rendimento de 98% e ee > 99%.

Os resultados obtidos mostram a viabilidade do método de biocatálise na obtenção de compostos com alta pureza enantiomérica.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas: catalisadores específicos

Enzimas são macromoléculas quirais de natureza protéica, formadas por uma longa cadeia de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas. Sendo assim, apresentam enantiosseletividade e alto grau de especificidade para diferentes substratos. A seqüência exata desses aminoácidos de cadeia protéica é denominada de estrutura primária; a conformação tridimensional é chamada de estrutura secundária e sua disposição espacial é denominada de estrutura terciária.^{1,2,3} Na Figura 1, pode-se observar a representação esquemática da seqüência primária de uma enzima salientando suas ligações peptídicas.⁴

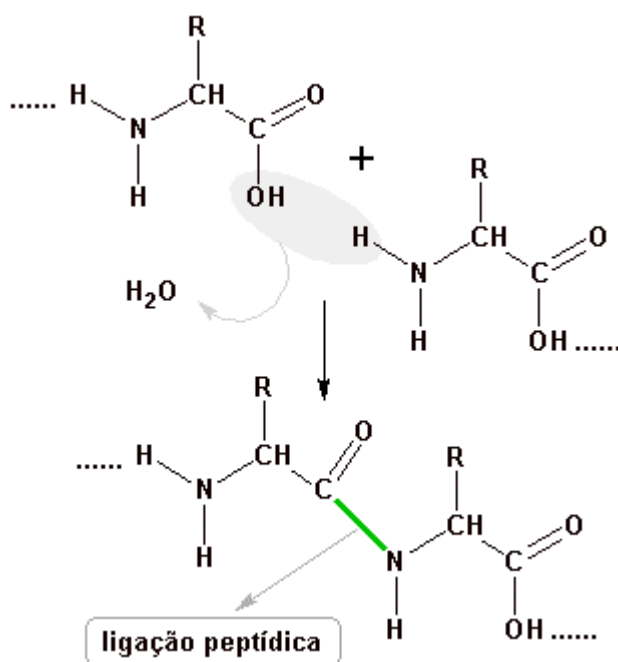


Figura 1. Representação esquemática da seqüência primária de uma enzima.

A Figura 2 representa esquematicamente a estrutura tridimensional da enzima piruvato quinase humana.⁵

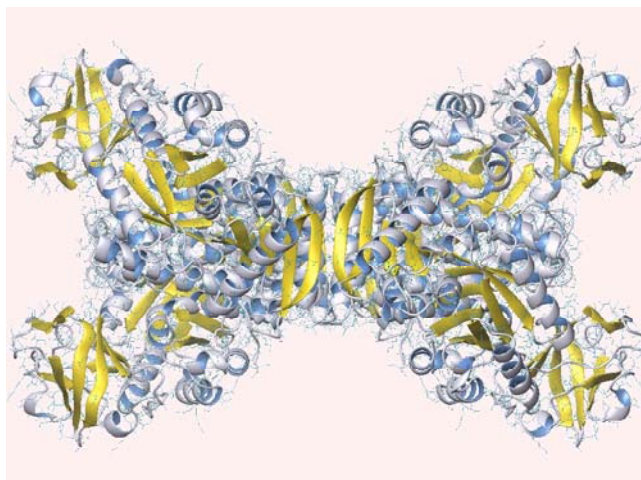


Figura 2. Representação esquemática da estrutura tridimensional da piruvato quinase humana.⁵

As enzimas são catalisadores biológicos que, sem sofrer alteração nem alterar o equilíbrio químico característico da reação, diminuem a barreira de ativação entre os reagentes (substratos) e o produto, aumentando a velocidade das reações que ocorrem nas células e organismos vivos, em 10^6 - 10^{12} vezes. São conhecidas também por serem altamente específicas, isto é, atuam sobre um determinado substrato convertendo-o num determinado produto.^{2,6}

A Figura 3 mostra um gráfico que diferencia a energia de ativação de uma reação na ausência (a) ou presença (b) de um catalisador.⁷

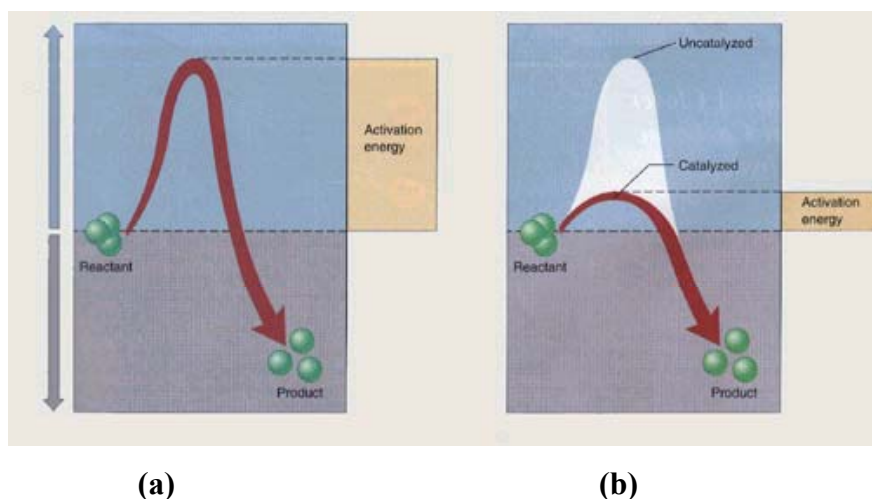


Figura 3. Barreira de ativação de uma reação não-catalisada (a) e catalisada (b).

Dentre os mecanismos propostos, o mais utilizado para explicar a seletividade das enzimas é a “regra dos três pontos”, criado por Ogston em 1948, o qual sugere que para a enzima ser altamente seletiva, o substrato deve se manter fixo tridimensionalmente no espaço, necessitando de três pontos de ligação distintos com o sítio catalítico.³ De forma geral, as cadeias laterais de aminoácidos, contendo grupos funcionais tais como ácido carboxílico, imidazol e amina estão associadas ao mecanismo da reação, desencadeando ou estabilizando espécies de transição.²

A Figura 4 ilustra o mecanismo proposto por Ogston.⁸

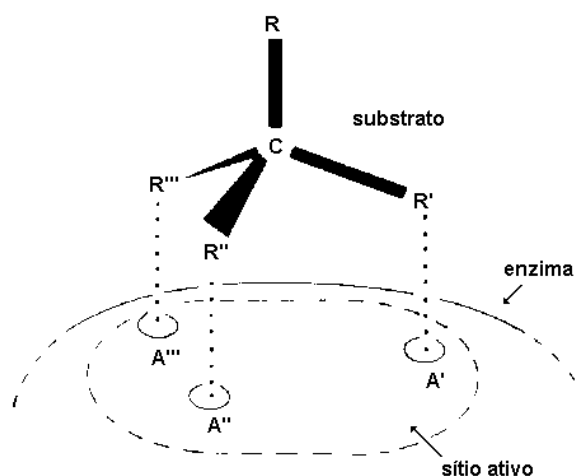


Figura 4. Mecanismo proposto por Ogston, conhecido como “regra dos três pontos”.

Sabe-se que ao longo do tempo a velocidade da reação catalisada por enzimas sofre uma diminuição originada por diversos fatores, tais como a inibição da enzima pelo substrato e/ou produto, diminuição do grau de saturação da enzima pelo substrato em consequência de seu consumo e desativação provocada pela variação do pH e temperatura, entre outros fatores.^{2,3,6}

Para facilitar a identificação das enzimas, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) estabeleceu uma classificação e nomenclatura, dividindo-as em seis classes de acordo com a reação que catalisam: *oxidoredutases*, *transferases*, *hidrolases*, *liases*, *isomerases* e *ligases*.⁶

O termo *biotransformação* se refere às reações de compostos orgânicos mediadas por enzimas isoladas ou células inteiras de microorganismos, e que tem sido empregada na indústria química, farmacêutica, agroquímica, de fragrância e aromas, nutricional e processos de biorremediação.¹⁴

Quando se utilizam células inteiras, as etapas de separação e purificação das enzimas assim como a adição de co-fatores pode ser descartada uma vez que a própria estrutura celular produz as enzimas e recicla os co-fatores necessários durante o seu metabolismo.¹⁵ No entanto, as células inteiras podem apresentar baixa seletividade, já que possuem não somente a enzima de interesse mas uma variedade de outras, fazendo com que elas possam atuar simultaneamente.¹⁶

A realização dessas reações em meios não convencionais (meio orgânico) facilita a solubilização do substrato, recuperação do produto e também impede as reações laterais pela água.^{16,17} Além disto, tem sido reportado que a enantiosseletividade e o rendimento obtido nessas condições é maior do que aqueles em meio aquoso.^{18,19}

Porém, o meio hidrofóbico pode acarretar danos na membrana celular do microorganismo utilizado, influenciando diretamente na retenção da sua atividade.^{15,16} Sugere-se que o mecanismo de toxicidade do solvente orgânico (apesar de pouco compreendido) está relacionado à incorporação deste na membrana fosfolipídica, causando inativação ou até mesmo bloqueando os mecanismos que regulam suas funções.²⁰ A fim de minimizar esses efeitos, algumas alterações simples no meio reacional como adição de açúcares ou técnicas de imobilização podem ser utilizadas.^{16,21}

A trealose, dissacarídeo não-redutor formado por duas moléculas de glicose unidas por ligações α,α -1,1-glicosídicas⁶, desempenha o importante papel de estabilizar a membrana celular das leveduras em condições de estresse, e tem sido bastante utilizada na proteção de biomateriais.²²

A imobilização além de proteger, favorece a reutilização do biocatalisador e a separação dos produtos possibilitando o seu uso em escala industrial. Os materiais utilizados como suporte na imobilização podem ser de natureza orgânica (ex. dextrana²³) ou inorgânica (ex. aluminossilicatos¹⁶), apresentando diferentes propriedades, o que permite viabilizar sua atuação em meio orgânico.^{16,24}

1.2. *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalisador em síntese orgânica

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecida como fermento de pão (FP) é um microorganismo muito utilizado na produção de vários produtos de interesse comercial dentre eles fármacos, vacinas, alimentos, entre outros. Tem sido um dos biocatalisadores mais empregados na área de síntese orgânica em reações de redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos devido à sua versatilidade, baixo custo e facilidade de manuseio.^{16,25,26}

A Figura 6 mostra as células desse microorganismo.²⁷

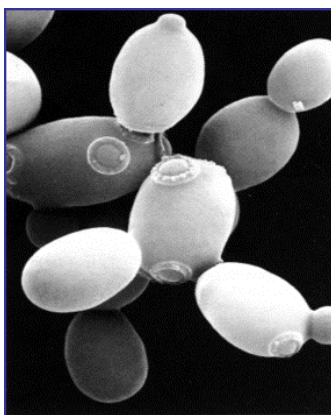
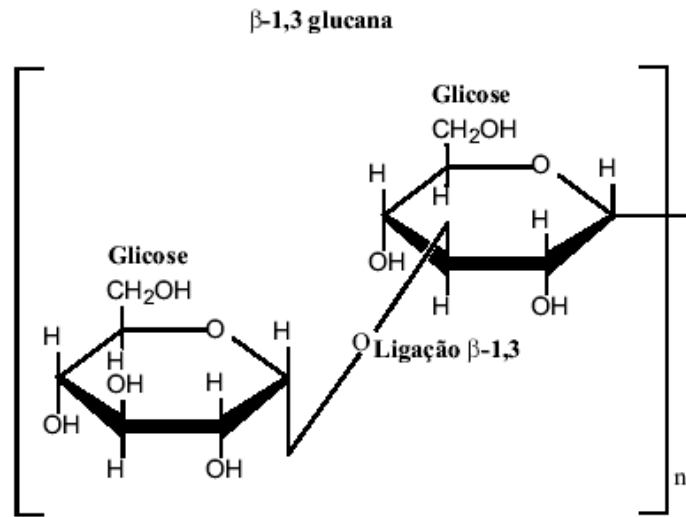
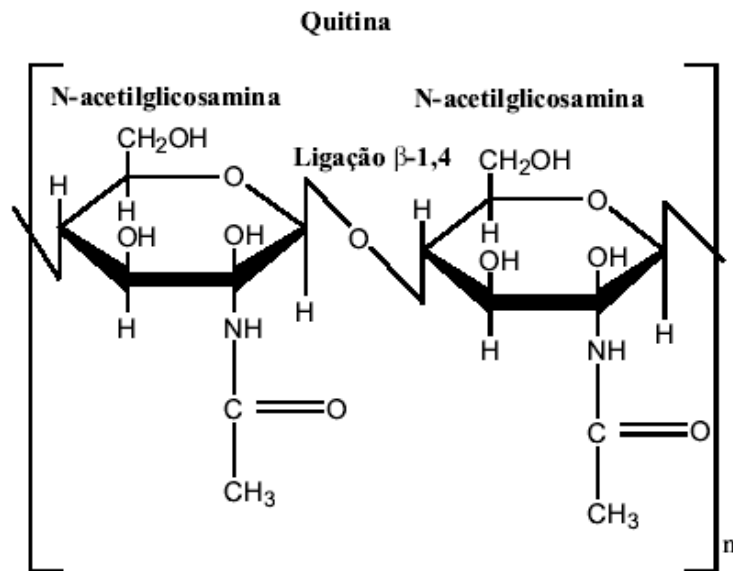


Figura 6. Células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Este microorganismo tem sua parede celular composta principalmente de 48-60% de glucana (um polímero de β -1,3 e β -1,6 glicose), 20-23% de mananaproteínas (um polímero de manose com ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,6) e 0,6-2,7% de quitina (um polímero de β -1,4 N-acetilglicosamina). Esta parede celular tem como funções; proteção física, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, barreira de permeabilidade seletiva, entre outras. Sendo uma estrutura dinâmica que responde às condições ambientais (nutrientes, temperatura, pH), perturbações na parede da levedura desencadeiam mecanismos de reparo que reorganizam toda a estrutura molecular, uma vez que é essa membrana que promove a rigidez e transporte de nutrientes para o citoplasma, proporcionando a integridade, metabolismo e o crescimento celular.²⁸ As Figuras 7a e b mostram as estruturas monoméricas da β -1,3 glucana e quitina, respectivamente.



(a)



(b)

Figura 7. Estrutura monomérica da β -1,3 glucana (a) e da quitina (b).²⁸

A Figura 8 mostra a estrutura monomérica da mananaproteína.

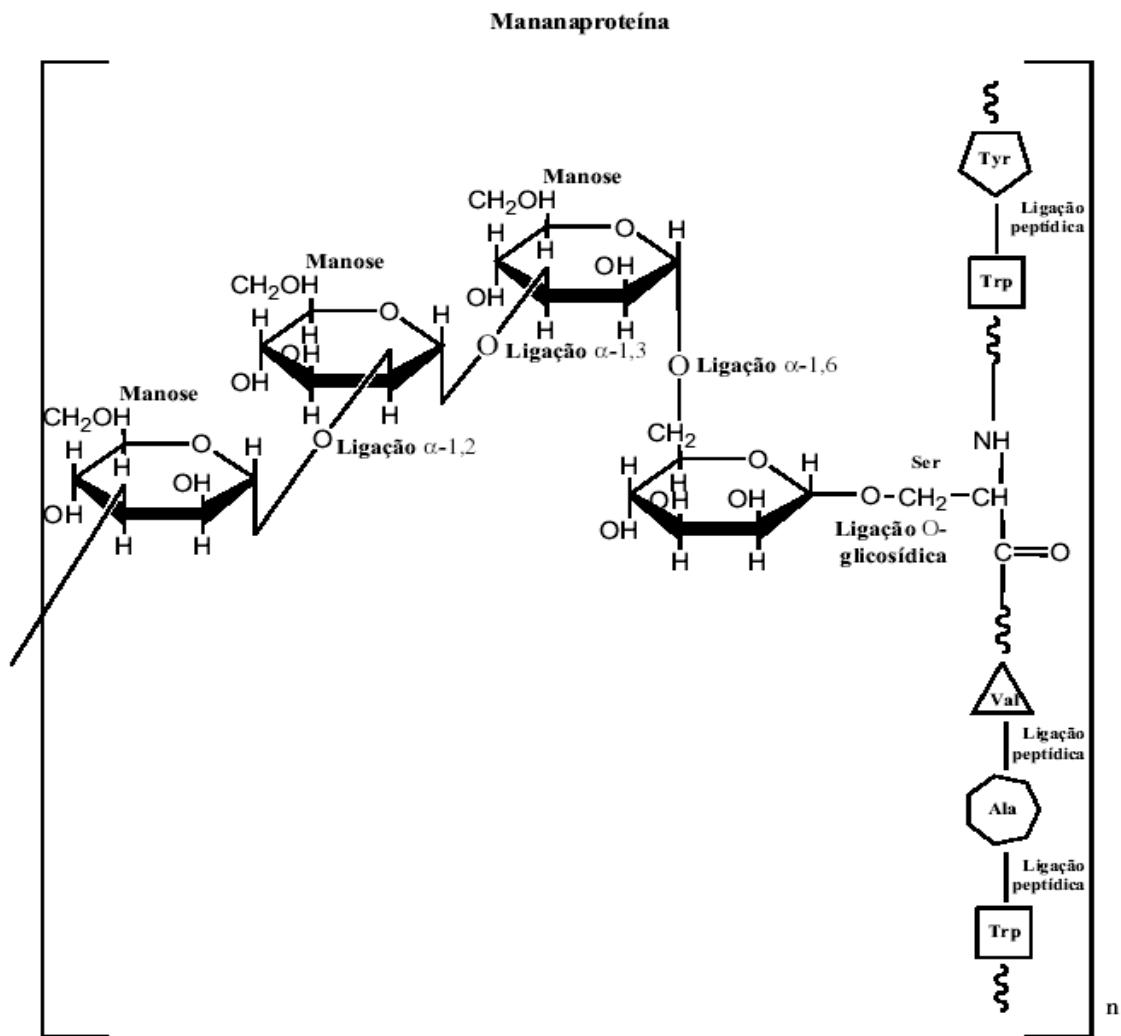


Figura 8. Estrutura monomérica da mananaproteína.²⁸

A reação de redução do β -cetoéster pró-quiral acetoacetato de etila (**3**) por *S. cerevisiae* tem sido objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa²⁹, embora outros microorganismos também sejam bastante estudados.³⁰

O álcool *S*-(+)-3-hidroxibutanoato de etila (**4**), produto desta reação (Figura 9), é um bloco de construção quiral importante para a síntese de inúmeros produtos com importância biológica e de interesse comercial, tais como *S*-(+)-sulcatol, *R*-lavandulol, *R*-(+)-recifeiolídeo e *R,R*-pirenoforina.^{31,32}



Figura 9. Rea\c{c}o\c{e} de redu\c{c}o\c{e} enantiosseletiva do acetoacetato de etila (3).

1.3. Imobiliza\c{c}o\c{e}

A imobiliza\c{c}o\c{e} \c{e} uma das estrat\c{e}gias que v\c{e}m sendo exploradas como forma de prote\c{c}o\c{e} e reutiliza\c{c}o\c{e} do biocatalisador, bem como na manuten\c{c}o\c{e} da atividade enzim\c{a}tica com o intuito de assegurar sua reciclagem e uso em reatores cont\c{i}nuos (escala industrial). Por\c{e}m, ap\c{o}s a imobiliza\c{c}o\c{e}, n\c{a}o existe uma regra que prediga a manuten\c{c}o\c{e} da atividade catal\c{i}tica ou mesmo sua estabilidade. A heterogeneidade do meio reacional implica em uma rela\c{c}o\c{e} m\c{u}tua entre os diferentes componentes do sistema.²⁴

A Figura 10 representa esquematicamente a rela\c{c}o\c{e} m\c{u}tua entre os v\c{a}rios componentes que est\c{a}o envolvidos em uma rea\c{c}o\c{e} biocatalisada em solvente org\c{a}nico.²⁴

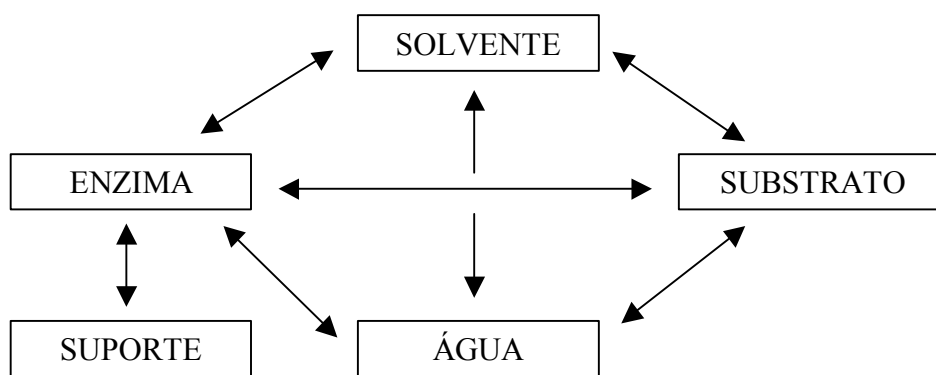


Figura 10. Rela\c{c}o\c{e} m\c{u}tua entre os diversos componentes envolvidos em uma rea\c{c}o\c{e} biocatalisada em meio org\c{a}nico.

Pode-se imobilizar o biocatalisador através de adsorção ou ligação da enzima/microorganismo em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos, ou ainda, encapsulação através de uma membrana polimérica.²⁴

A Figura 11 mostra as diferentes técnicas de imobilização.

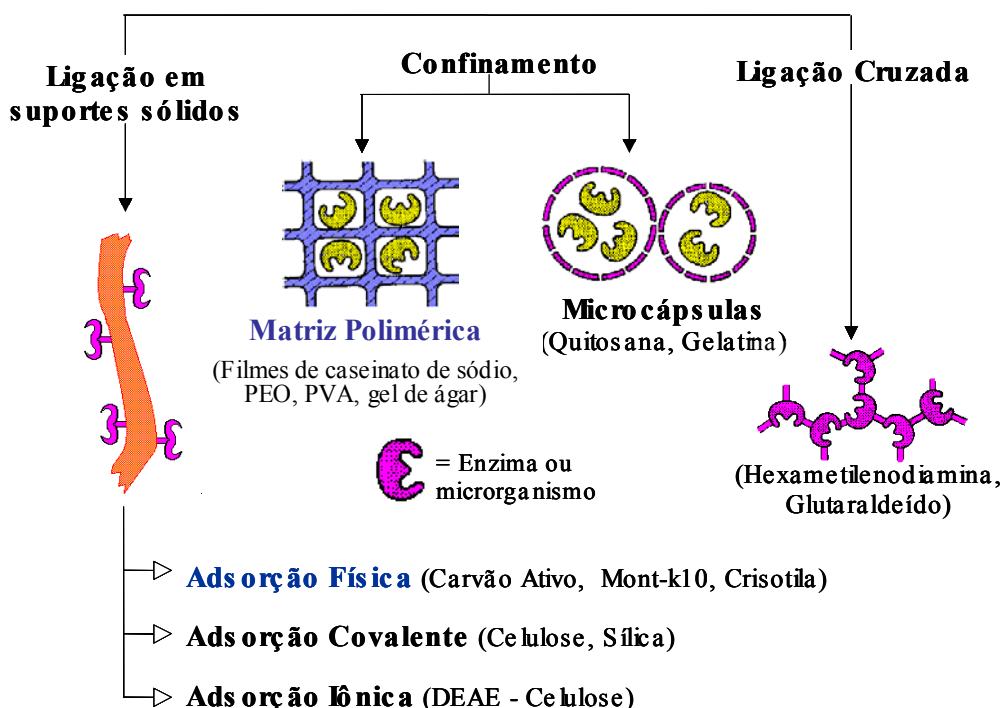


Figura 11. Diferentes métodos utilizados para imobilização de enzimas.²⁴

A adsorção de células inteiras em um suporte macroscópico insolúvel é um método simples de imobilização. As diferentes forças envolvidas (van der Waals, interações iônicas e/ou ligações de hidrogênio) são relativamente fracas, não interferindo na atividade enzimática. Alguns dos suportes usados para este tipo de imobilização são o carvão ativado, silicatos, óxidos de alumínio, géis poliméricos e celulose, entre outros.^{3,16,24}

A montmorilonita ($M_x[Al_{2-x}Mg_x](Si_4)O_{10}(OH)_2$), vendida comercialmente como montmorilonita-K10, é uma argila e principal componente das cinzas vulcânicas. É composta por camadas de aluminosilicatos, e entre essas camadas existem cátions

intercambiáveis (normalmente com água de hidratação), o que faz desse suporte um polieletrólito.³³

Mesmo sendo insolúvel em água, quando hidratada aumenta seu tamanho em até doze vezes, abrindo-se como uma esponja porosa.³³ Industrialmente é utilizada em farmacologia, armazenamento nuclear e catálise.³⁴

A Figura 12 mostra a estrutura cristalina da montmorilonita K-10.³³

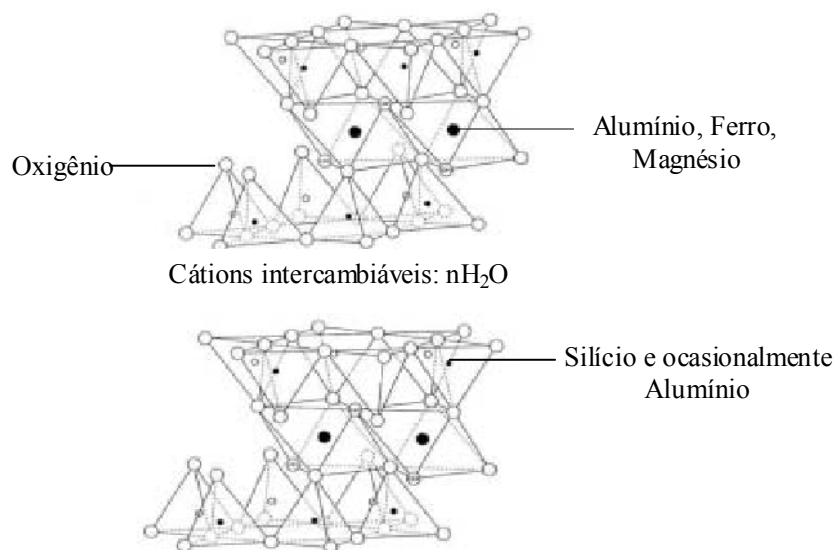


Figura 12. Estrutura cristalina da montmorilonita K-10.

Em nosso grupo de pesquisa, Zanotto¹⁶ imobilizou o fermento de pão comercial nesse suporte e o utilizou em reações de redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila **(3)** (Figura 9) e α -cloroacetofenona **(5)** (Figura 13). A gelatina foi utilizada como recobrimento celular e também foi analisado o efeito da adição de sacarose. As células imobilizadas, recobertas e com a adição de solução do açúcar mostraram-se mais estáveis em meio orgânico, formando menos subprodutos. O álcool *S*-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila **(4)** foi obtido com ee >99% até a quarta reutilização do sistema com 20% de conversão. Na redução da α -cloroacetofenona, o álcool *R*-(-)-2-cloro-1-feniletanol **(6)** foi obtido com ee de 79% após 72 h de reação.



Figura 13. Reação de redução enantiosseletiva da α -cloroacetofenona (5).

Outro método de imobilização consiste em “confinar” o microorganismo em um polímero insolúvel, no qual não há interação química do biocatalisador com o suporte. Cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa, através da qual apenas moléculas pequenas, como os substratos e produtos, podem se difundir. No entanto, a transferência de massa através dessa membrana pode ser comprometida.²⁴

O caseinato de sódio (CS) é um biopolímero, usado para a imobilização de enzimas em matriz polimérica, que forma filmes insolúveis em vários solventes orgânicos. O caseinato é um sal derivado da caseína, principal constituinte do leite de vaca. Supõe-se que cerca de 80-90% da caseína do leite se apresente na forma de micelas (com formas mais ou menos esféricas), compostas por um grande número de sub-unidades (10-20 nm de diâmetro) contendo de 25-30 moléculas de caseína α , β e κ . Uma primeira teoria sugere que as sub-unidades de caseína α_{s1} e β formariam núcleos termodinamicamente estáveis em forma de rosetas, cobertos por camadas periféricas de caseína κ (Figura 14a). Uma outra teoria sugere uma estrutura aberta composta por sub-unidades uniformes contendo as caseínas α_{s1} , e β no centro e a κ na periferia (Figura 14b).³⁵

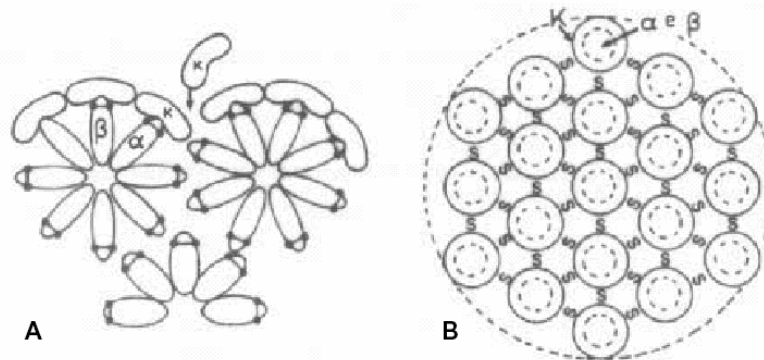


Figura 14. Estruturas propostas para as micelas de caseína.

Em paralelo aos experimentos realizados por nosso grupo com o FP, Sebrão³⁶ utilizou filmes de CS para imobilizar a lipase de *Pseudomonas* sp (LPS) e catalisar reações de esterificação em meio orgânico. Vários parâmetros foram avaliados, tais como, influência do número de carbonos da cadeia alquílica do ácido e do álcool, o efeito da quantidade do biocatalisador imobilizado, tempo reacional, presença de insaturação nos reagentes e reutilização dos sistemas. Com o sistema LPS/CS, o oleato de n-propila foi obtido com 97% de conversão.

Outros polímeros utilizados para imobilização de enzimas através de confinamento em matriz polimérica são o poli (álcool vinílico) (PVA) que é formado por unidades monoméricas do álcool vinílico (CH₂CH₂OH), e o poli (óxido de etileno) (PEO, MW~100.000 Daltons), que é formado por unidade monoméricas de óxido de etileno (CH₂CH₂O).

A Figura 15 mostra as estruturas dos polímeros de álcool vinílico e de óxido de etileno.

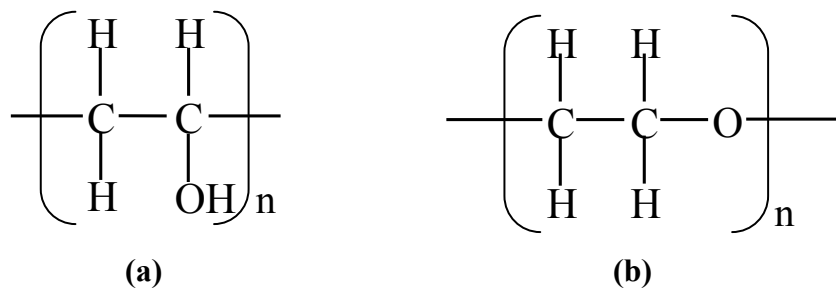


Figura 15. Estruturas do poli (álcool vinílico) (a) e poli (óxido de etileno) (b), respectivamente.

Mais recentemente em nosso grupo de pesquisa, Dalla-Vecchia³⁷ utilizou filmes de PVA para imobilizar lipases de dez fontes diferentes e catalisar reações de esterificação de ácidos carboxílicos com n-pentanol em meio orgânico. Quando as lipases *Pseudomonas* sp (LPS), *Mucor javanicus* (LMJ) ou *Rhizopus oryzae* (LRO) foram imobilizadas nesse polímero e utilizadas na esterificação do ácido láurico com n-pentanol, foi obtido o correspondente éster com conversão de 99%.

Os filmes de PEO foram também usados para imobilizar a LRO e catalisar as reações de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, obtendo-se o respectivo éster com 98% de conversão.³⁸

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência do suporte e de diferentes açúcares na imobilização do fermento de pão comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) na reação de redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila (**3**) em meio orgânico.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a quantidade de H₂O nos materiais poliméricos pelo método de titulação de Karl-Fischer e a estabilidade macroscópica em diversos solventes orgânicos.
- ✓ Avaliar a influencia da quantidade de substrato e do biocatalisador imobilizado para serem empregados na reação de redução do acetoacetato de etila;
- ✓ Utilizar como suporte os polímeros caseinato de sódio (CS), poli (álcool vinílico) (PVA) e poli (óxido de etileno) (PEO) na imobilização das células de fermento de pão comercial e posterior redução de (**3**) em hexano;
- ✓ Avaliar a influencia dos açúcares trealose (T) e sacarose (S) na proteção das células do biocatalisador do meio orgânico (hexano);
- ✓ Utilizar o K10 como suporte para imobilizar o FP, e realizar a reação de redução do acetoacetato de etila (**3**) para a obtenção do álcool quiral S(+)**4** em maior escala, visando a utilização na síntese de feromonios.
- ✓ Comparar os diferentes suportes com outros reportados na literatura.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes utilizados na biotransformação com *Saccharomyces cerevisiae* (FP)

Foi utilizado como biocatalisador, o fermento de pão (FP) biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) instantâneo e seco (EMULZINT – LTDA, Bélgica). Os suportes utilizados para imobilização das células foram caseinato de sódio (CS) (Anchor Products Ltd), poli (óxido de etileno) (PEO) (Aldrich, MW~100.000 Daltons), poli (álcool vinílico) (PVA, MM~7200 Daltons) (Vetec Química Fina Ltda) e a montmorilonita-K10 (K10) (Fluka). Como solvente foi utilizado *n*-hexano (F. MAIA Ind. e Com. Ltda). Para imobilização em caseinato de sódio, foi usado como plastificante o glicerol (Reagen). Foram utilizadas trealose (T) (Sigma) e/ou sacarose (S) (Sigma), que foram adicionadas durante a preparação dos filmes poliméricos contendo o biocatalisador (FP).

Como substrato utilizou-se o acetoacetato de etila (Vetec Quím. Fina Ltda). O álcool racêmico (\pm)-3-hidroxi-butanoato de etila (**4**) usado como padrão para o CG quiral foi obtido através da reação de redução com NaBH₄ (Aldrich Chemical Co).³⁹

3.1.2. Equipamentos e Caracterização dos Produtos

A imobilização do FP nos diferentes suportes (CS, PVA, PEO e K10) foi realizada com auxílio de agitadores magnéticos (DIST Ind. Com. E Serv. Ltda) e as reações foram realizadas em banho termostático Dubnoff (MARCON, HW2000). Foram retiradas alíquotas das reações periodicamente, as quais foram analisadas por cromatografia gasosa. As medidas de conversão e de excessos enantioméricos foram feitas em um cromatógrafo gasoso da Shimadzu – CG-14B, com uma coluna capilar de fase estacionária quiral RESTEK ou CHROMPACK (chirasil - DEX CB 25m x 0,25mmID x 0,25 μ m). As condições de análise estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições de operação do cromatógrafo CG-14B para determinação do excesso enantiomérico e conversão na reação de redução do acetoacetato de etila. ^(a)

Parâmetros	
Temperatura Inicial	70 ⁰ C
Temperatura final	150 ⁰ C
Taxa de aquecimento	2 ⁰ C/ min.
Injetor: split, 200:1	250 ⁰ C
Detector: FID	275 ⁰ C
Pressão do gás carreador (H ₂)	75kPa
Volume da amostra	1 µL

^(a) Solvente: hexano

Para se obter o valor do excesso enantiomérico, faz-se uso da Equação 1:

$$ee (\%) = \frac{\text{área do produto (A}_1\text{)}}{\text{soma das áreas dos produtos (A}_1\text{ + A}_2\text{)}} \times 100 \quad (1)$$

A Figura 16 mostra o cromatograma obtido por CG com coluna quiral utilizado no cálculo da conversão ao produto e do excesso enantiomérico.

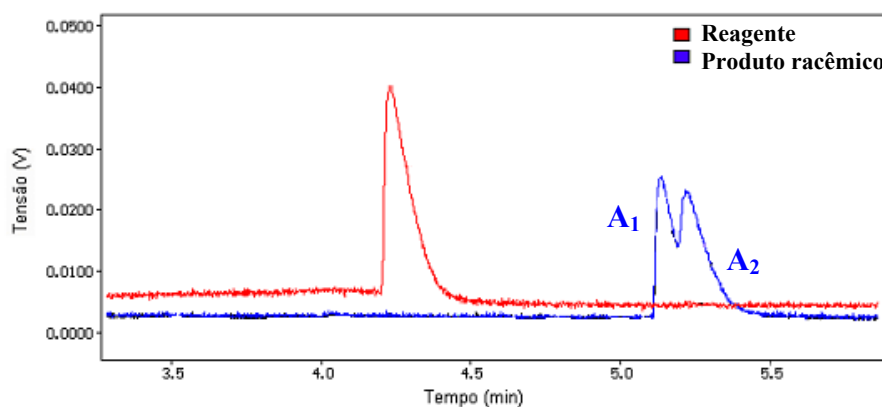


Figura 16. Cromatograma obtido por CG do reagente (■) e do produto racêmico (■).

A pureza enantiomérica do álcool *S*-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila obtido com o sistema FP/K10 em maior escala, foi medida com o uso de um polarímetro (Perkin Elmer, polarimeter 343). Determinou-se assim o ângulo de rotação ótica experimental da amostra pura e este foi convertido para a rotação ótica específica $[\alpha]_D^T$, grandeza característica de cada substância óticamente ativa (Equação 2).⁴⁰

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad (2)$$

Onde:

$[\alpha]_D^T$ = rotação ótica específica

α = rotação ótica observada

l = comprimento da cela polarimétrica, (0,1 dm)

c = concentração da solução, em g de soluto por cm³ de solvente

T = temperatura (graus Celsius) (20°C)

D = comprimento de onda de emissão da linha D do sódio (589 nm)

3.2. Procedimento geral de imobilização do FP nos diferentes suportes poliméricos

A Figura 17 mostra o procedimento utilizado na preparação dos filmes de caseinato de sódio (CS), poli (álcool vinílico) (PVA) e poli (óxido de etileno) (PEO).

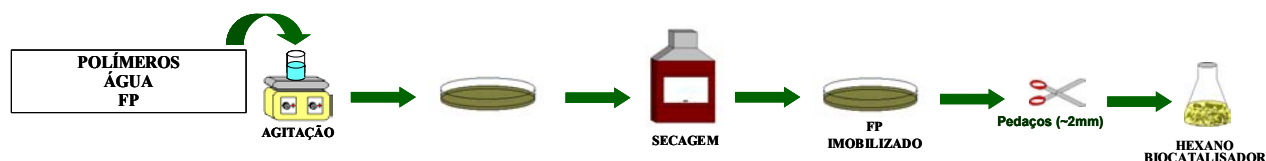


Figura 17. Procedimento geral utilizado na imobilização do FP em suportes poliméricos.

3.2.1. Imobilização do FP em filme de caseinato de sódio (CS)

Em um béquer de 50mL foram adicionados 1,5 g de CS, 0,5 g de glicerol (G) e 15,0 mL de água destilada. Este sistema foi submetido à agitação magnética por aproximadamente duas horas, até completa solubilização do CS. Em seguida, 1,0 g de

fermento de pão foi adicionado à solução e agitado até que o sistema ficasse homogêneo (\pm 10 minutos). Esta solução foi então despejada em placa de Petri (~9 cm de diâmetro) e colocada na capela para evaporação do solvente e formação do filme. Para imobilização de 2,0 g de FP, as quantidades acima foram dobradas.

Nas condições em que a influência de açúcares foi testada, 80 mg de sacarose (S) ou de trealose (T) foram adicionados à solução do filme. Alternativamente, a influência dos dois açúcares também foi analisada, adicionando-se 40 mg de S juntamente com 40 mg de T na solução de caseinato de sódio contendo o fermento de pão.

3.2.2 Imobilização do FP em filme de poli (óxido de etileno) (PEO)

Em um béquer de 40 mL foram adicionados 500 mg de PEO e 25 mL de água destilada. Este sistema foi submetido à agitação magnética por aproximadamente 24 horas, até solubilização do suporte. Em seguida 1,0 ou 2,0 g de fermento de pão foram adicionados à solução do filme até a homogeneização do sistema, sendo depois despejado em placa de Petri (~9 cm de diâmetro) e levado à capela para evaporação do solvente. Com este suporte, foram também testadas a influência dos açúcares sacarose e trealose, adicionando-se 80 mg de um ou de outro à solução de PEO; ou ainda a influência dos dois açúcares adicionando-se simultaneamente 40 mg de cada um deles.

Com este sistema, testou-se a adição de uma solução 10% de sacarose/trealose ao meio reacional, para fins de comparação com o sistema desenvolvido com K10 por Zanotto.¹⁶

3.2.3. Imobilização do FP em filme de poli (álcool vinílico) (PVA)

Em um béquer de 40 mL, foram adicionados 500 mg de PVA e 25 mL de água destilada. Este sistema foi submetido à agitação magnética e leve aquecimento ($\sim 40^{\circ}\text{C}$)³⁸ até completa dissolução do suporte. Depois da solução ter atingido a temperatura ambiente, foram adicionados 1,0 ou 2,0 g do biocatalisador (FP) e novamente o sistema foi submetido à agitação magnética até sua homogeneização, sendo em seguida despejado em placa de Petri (~9 cm de diâmetro) e levado à capela para a evaporação do solvente. Com este

suporte, também foram testadas a influência dos açúcares sacarose e trealose, segundo o procedimento descrito anteriormente nos itens 3.2.1 e 3.2.2 .

3.2.4. Imobilização do FP em montmorilonita-K10

Com o intuito de se obter o álcool *S*-(+)-hidroxibutanoato de etila (**4**) em maior escala, utilizou-se a metodologia desenvolvida por Zanotto¹⁶ para imobilização do FP em K10.

A imobilização do FP em K10 foi realizada em 4 béquers de 500mL. Em cada um destes foram primeiramente dissolvidos 10,0 g do biocatalisador (FP) em 250 mL de água destilada (\pm 10 minutos). Em seguida, adicionaram-se mais 30,0 g de K10 e deixou-se o sistema sob agitação magnética vigorosa por 4 horas. As misturas FP/K10 foram então filtradas em funil de Buchner, colocadas em vidro relógio, seca sob corrente de ar e depois, trituradas até a obtenção de partículas finas.

Este procedimento de imobilização do FP em K10 está esquematizado na Figura 18.



Figura 18. Procedimento utilizado para imobilização do FP em K10.

3.2.5. Determinação do teor de água para o filme de CS

A quantidade de água presente no filme de CS foi determinada por titulação pelo método Karl-Fischer (titulador 633 Automatic Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau). Os filmes contendo o FP foram previamente cortados em pedaços pequenos e regulares, e amostras de aproximadamente 100 mg foram usadas para as análises. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado está expresso como média aritmética dos valores.

3.2.6. Procedimento utilizado para a redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila catalisada pelo sistema FP/CS

Este estudo foi feito utilizando-se quatro filmes de CS preparados segundo o procedimento descrito anteriormente (item 3.2.1.), nos quais foram adicionados 2,0 g de FP na ausência de açúcar. Os filmes foram cortados em pequenas seções regulares e transferidos para erlenmeyers contendo 40 mL de *n*-hexano. Foram utilizadas diversas quantidades de acetoacetato de etila (0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 mL).

Estes sistemas foram submetidos à agitação em banho termostatizado tipo Dubnoff a 25°C, e alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de 24 horas e em seguida analisadas por CG com coluna quiral, para obter os respectivos valores de conversão (%) e excesso enantiomérico do produto (%).

O procedimento geral usado para reação de redução do acetoacetato de etila mediada pelo fermento de pão imobilizado nos diversos suportes está esquematizado na Figura 19.

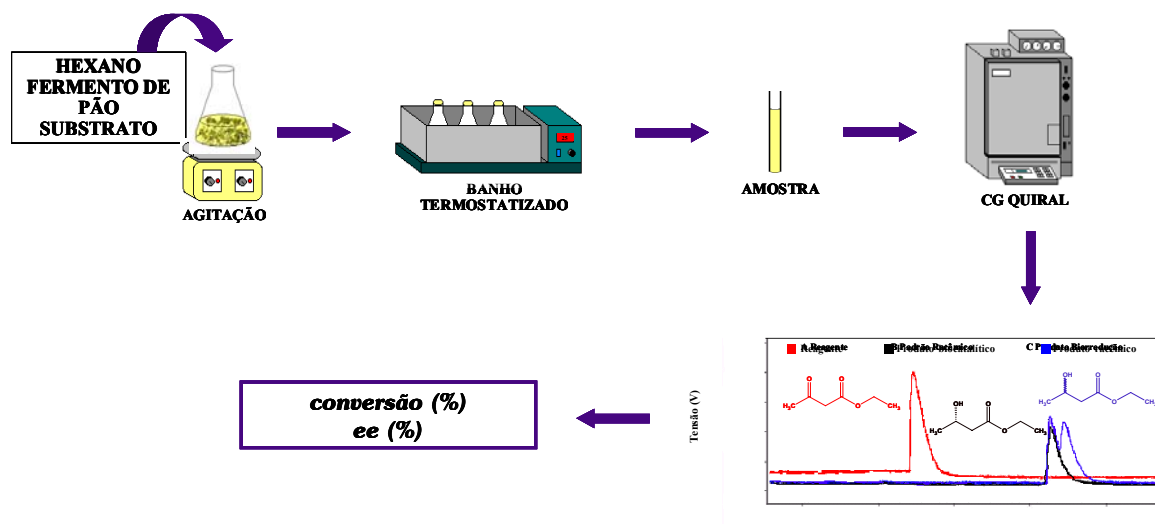


Figura 19. Procedimento geral usado para reação de redução do acetoacetato de etila utilizando FP imobilizado nos diferentes suportes poliméricos.

3.2.7. Procedimento geral para a reação de redução do acetoacetato de etila mediada por FP imobilizado em filmes de PVA e PEO.

Cada filme foi cortado em pequenos pedaços regulares e transferido para um erlenmeyer contendo 40 mL de *n*-hexano. Em seguida, 0,2 mL (1,57 mmol) de acetoacetato de etila foi adicionado e o sistema submetido à agitação em banho termostatizado tipo Dubnoff a 25°C. Alíquotas foram retiradas regularmente (a cada 24 horas) de cada reação e analisadas em CG com coluna quiral para o cálculo de conversão e excesso enantiomérico (Figura 17).

Para fins comparativos, foram feitos filmes de CS, PEO e PVA sem adição de fermento de pão, e estes utilizados na reação de redução do substrato (**3**). As análises das alíquotas das reações foram feitas nas mesmas condições das que contem o biocatalisador (FP).

3.2.8. Procedimento utilizado para a reutilização do biocatalisador imobilizado

O biocatalisador imobilizado nos suportes poliméricos foi avaliado em sucessiva reutilização. Os filmes foram filtrados por gravidade em funil de vidro e lavados com *n*-hexano (3 x 30,0 mL), sendo em seguida transferidos para erlenmeyers contendo 40 mL deste solvente. A seguir, foi adicionado novamente ao meio 0,2 mL (1,57 mmol) de acetoacetato de etila (**3**), e então este sistema foi submetido às mesmas condições experimentais citadas no item 3.2.6.

3.2.9. Procedimento utilizado para a redução do acetoacetato de etila em maior escala mediado por FP/K10

Depois de seco e triturado, o sistema FP/K10 foi adicionado em dois erlenmeyers de 1 L contendo aproximadamente 400 mL de hexano. Em cada erlenmeyer foram adicionados 2 mL (15,7 mmol) do substrato ao meio reacional e 16,0 mL de uma solução 10% de trealose (1,6 g em 16,0 mL de água destilada) foi gotejada lentamente e posteriormente submetido a um agitador tipo shaker, a 30°C. Foram retiradas alíquotas em intervalos

regulares de 24 horas, e analisadas em CG com coluna quiral, com intuito de acompanhar o curso da reação. Neste experimento a solução de açúcar é adicionada ao meio reacional .¹⁶

Ao final da reação, realizada por um período de sete dias, o conteúdo de cada frasco foi filtrado por gravidade e transferido para um balão de fundo redondo, sendo posteriormente levado ao rota-evaporador para eliminação do solvente. Obtiveram-se aproximadamente 4 mL de um óleo amarelo-claro, que foi submetido a análises de RMN-1H , CG quiral e medida de rotação óptica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos próximos itens, serão discutidos os resultados de caracterização dos diferentes filmes obtidos, bem como os da reação de redução do acetoacetato de etila (3) mediada por fermento de pão comercial imobilizado nos diferentes suportes poliméricos.

4.1. Caracterização dos filmes

4.1.1. Determinação do teor de água

Mesmo sabendo que muitos microorganismos apresentam certa tolerância ao meio orgânico²⁰, é indispensável a presença de certa quantidade de água ao redor da membrana celular; uma vez que esta é composta em parte por proteínas e que podem assim sofrer desnaturação.³

A quantidade de água nos filmes de caseinato de sódio (CS), poli (álcool vinílico) (PVA) e poli (óxido de etileno) (PEO) foi determinada pelo método de titulação Karl-Fischer.

A quantidade de água nos filmes de CS foi feita em triplicata, e obteve-se um valor médio de 13 %.

4.1.2. Estabilidade dos sistemas FP/CS, FP/PVA e FP/PEO frente a solventes orgânicos

Os filmes de CS, PVA e PEO com o fermento de pão, foram cortados em pequenos pedaços e adicionados em acetona, tetrahydrofurano, clorofórmio, xileno, hexano e heptano a temperatura ambiente.

Após um período superior a 96 horas verificou-se que todos os filmes não apresentaram modificações macroscópicas após contacto com os diferentes solventes orgânicos.

Este resultado mostra que os mesmos podem ser utilizados nestes solventes. Foi selecionado o *n*-hexano por apresentar melhores resultados na biorredução de (3) com fermento de pão imobilizado em montmorilonita K-10.¹⁶

4.2. Redução do acetoacetato de etila com o sistema FP/CS

Primeiramente, foi feito o estudo da quantidade de substrato a ser utilizada na biorredução do acetoacetato de etila. Como este substrato não está naturalmente presente no meio celular, sua concentração pode influenciar a atividade celular já que o mesmo pode se tornar tóxico e causar inibição das células de FP a partir de uma determinada concentração.

A Figura 20 apresenta o gráfico da conversão ao álcool *S*-(+)-(4) com o sistema FP/CS, quando foram utilizadas diferentes quantidades do acetoacetato de etila.

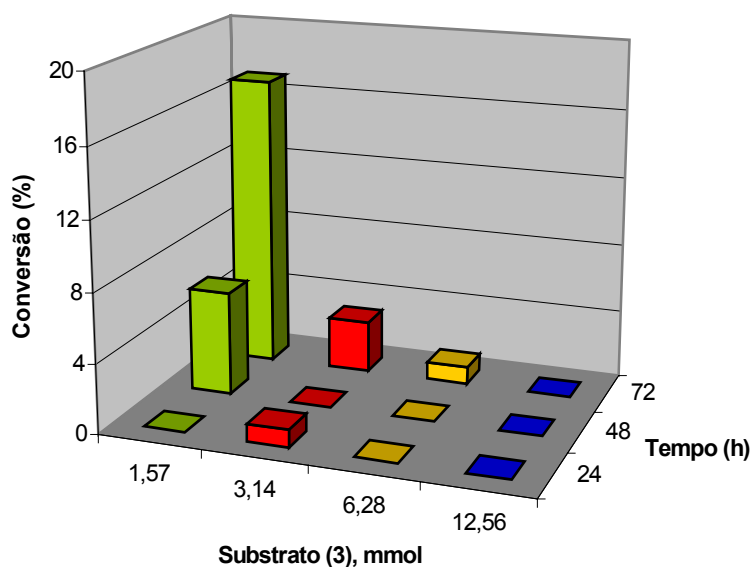


Figura 20. Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função das diferentes quantidades do substrato (3) e do tempo. 2 g de FP.

O álcool *S*-(+)-(4) foi obtido em maior conversão utilizando-se 1,57 mmol do substrato após 72 horas de reação (17%), com excesso enantiomérico >99%. Aumentando-se a quantidade de substrato, as conversões foram menores que 5%, porém o ee se manteve >99%. A partir desses resultados, sugere-se que o microorganismo se encontra em situação

de stress, quando quantidades acima de 1,57 mmols são usadas como substrato. Portanto, nos experimentos seguintes, esta foi a quantidade de substrato utilizada.

4.3. Influência dos açúcares na proteção celular durante a redução do acetoacetato de etila com o sistema FP/CS

Inicialmente, foram preparados os filmes de CS contendo 1 g de FP, com e sem a adição dos açúcares sacarose (S) e trealose (T), e estes utilizados na biorredução do acetoacetato de etila (1,57 mmol) com o objetivo de avaliar a influência desses dissacarídeos na manutenção da atividade enzimática, através da proteção celular. Avaliou-se também o efeito dos dois açúcares adicionados simultaneamente.

A Figura 21 mostra os resultados obtidos com os diferentes sistemas

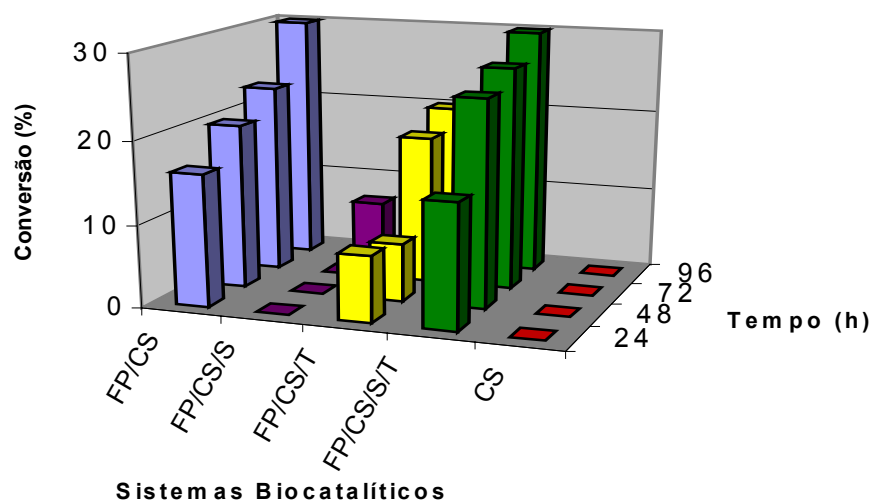


Figura 21. Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo, com os diversos sistemas biocatalíticos. 1 g de FP, 1,57 mmol de (3).

Na ausência de FP, não ocorreu a reação de redução do substrato (3). Este resultado é esperado considerando que a reação somente ocorre na presença de um agente redutor (químico ou enzimático).

Na presença de sacarose (sistema FP/CS/S), o álcool **(4)** foi obtido com apenas 7 % conversão e ee >99%, após 96 h de reação. Os baixos valores de conversão obtidos podem ser devido ao fato de que a sacarose atua intracelularmente no auxílio da regeneração dos cofatores NADH e NADPH envolvidos na biorredução (doando elétrons), metabolizando o dissacarídeo,⁴¹ e não auxilia na proteção da membrana celular como a trealose

O álcool *S*-(+)-**(4)** foi obtido em maior conversão utilizando-se os sistemas FP/CS e FP/CS/S/T, com valores na faixa de 16-30 % e 15-30% respectivamente, após 96 h de reação. O ee obtido com estes dois sistemas foi >99 %.

Na presença de trealose (sistema FP/CS/T) o álcool foi obtido com 20 % de conversão e ee >99 % após 96 h de reação. Estes resultados sugerem que este açúcar exerceu algum efeito protetor sobre a membrana celular do microorganismo, uma vez que a trealose, devido às suas interações com as moléculas de água, é capaz de formar estruturas (complexos) mais rígidas que se adaptam de forma mais eficiente na superfície das bioestruturas, formando uma camada mais resistente aos danos causados pelo meio.⁴²

A seguir, foram preparados filmes de CS contendo 2 g de FP e o mesmo submetido às condições reacionais descritas acima.

A Figura 22 mostra os resultados obtidos para os diferentes sistemas.

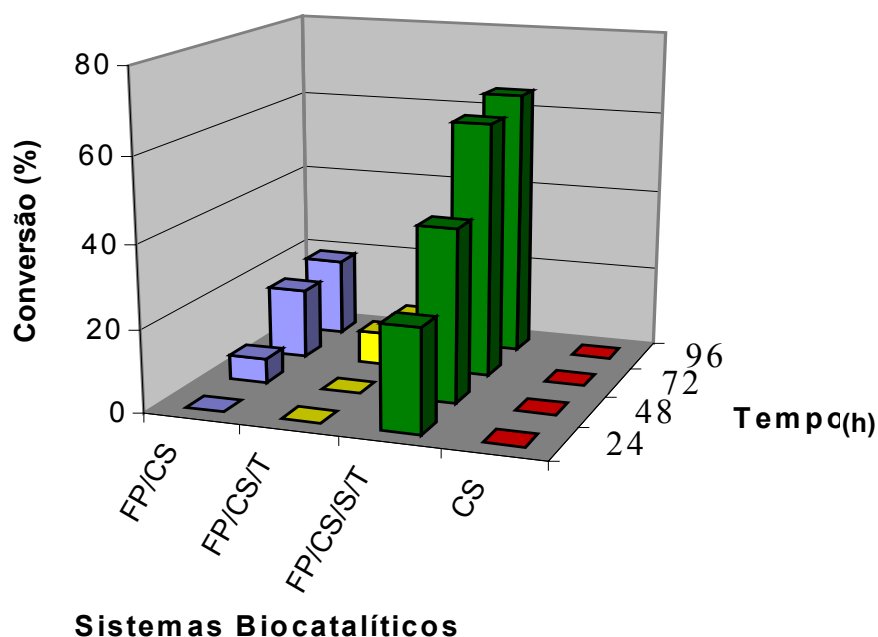


Figura 22. Conversão ao álcool *S*-(+)-**(4)** em função do tempo, com os diversos sistemas biocatalíticos. 2 g de FP, 1,57 mmol **(3)**.

A maior conversão ao álcool *S*(+)-(4) foi de 65%, obtida com o sistema FP/CS/S/T. Porém, o ee foi de 17% após 96 h de reação. Como proposto anteriormente, sugere-se que a ação da sacarose no auxílio da regeneração dos cofatores aliada ao efeito de proteção celular da trealose, consegue aumentar a eficiência do FP como biocatalisador.

Assim, o sistema mais eficiente é com a presença dos dois açúcares no suporte, que contribuem na manutenção da atividade catalítica do microorganismo. Utilizando os demais sistemas as conversões não ultrapassaram 20%, apesar do ee obtido ser >99%.

A partir dos resultados obtidos com 1,0 ou 2,0 g de FP imobilizado, comparou-se a influência da quantidade de biocatalisador presente no meio reacional. A Figura 23 mostra os resultados obtidos utilizando os diversos sistemas, contendo diferentes quantidades do biocatalisador.

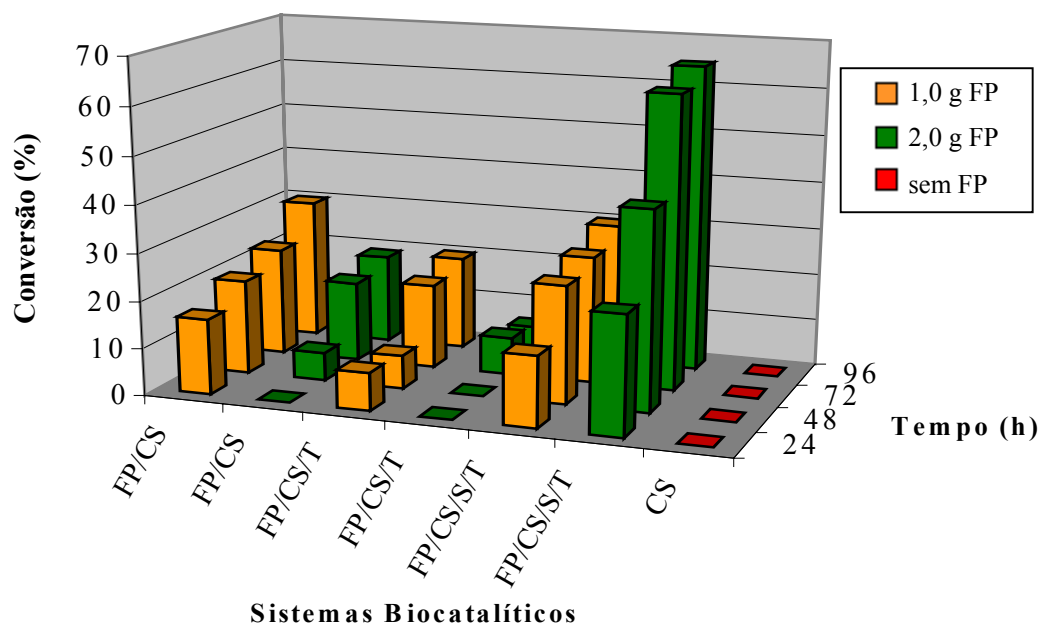


Figura 23. Conversão ao álcool *S*(+)-(4) em função do tempo, com os diversos sistemas biocatalíticos contendo 1 ou 2 g de FP imobilizado.

Utilizando o sistema FP/CS contendo 1 g do biocatalisador, obteve-se o álcool *S*(+)-(4) com 30 % de conversão e ee >99 %, após 96 h de reação. Com o mesmo sistema contendo 2 g de FP e tempo reacional, o álcool foi obtido com 19 % de conversão (ee >99%). Estes resultados sugerem que a diminuição na formação do produto quando uma maior quantidade de biocatalisador foi utilizada, pode ter ocorrido devido à possível

dificuldade de difusão do substrato até as células do FP, uma vez que a quantidade de suporte presente no meio foi dobrada (item 3.2.1.).

Como já mencionado, com o sistema FP/CS/T o álcool *S*-(+)-(4) foi obtido com 20% de conversão e ee >99% após 96 h de reação, utilizando 1 g de FP imobilizado. Com este sistema contendo 2 g do biocatalisador, obteve-se o álcool com 8% de conversão (ee >99%), após 72 h de reação. Uma vez que a quantidade de água nos filmes de CS se mantém constante, a proporção “solução de T/biocatalisador” é menor no suporte com 2 g FP, e portanto o efeito protetor deste açúcar deverá ser menor. Além disto, a difusão do substrato no meio pode ter sido dificultada devido à maior quantidade de suporte presente.

Com o sistema FP/CS/S/T contendo 1 e 2 g de FP, o álcool *S*-(+)-(4) foi obtido com 30% (ee >99%) e 65 % (ee 17%) de conversão, respectivamente após 96 h de reação. Mesmo com conversão ao álcool mais baixa, o sistema contendo 1,0 g de FP se mostrou mais enantiosseletivo que o contendo 2,0 g de FP.

Sugere-se que a presença simultânea dos açúcares (S e T), devido à proteção da parede celular, pode ter favorecido a biorredução de tal forma que foi observado uma relação entre quantidade de biocatalisador e %c ao produto, em função do tempo. Utilizando maior quantidade do biocatalisador, a reação é mais rápida porém menos enantiosseletiva (ee 17%, 96h). (Figura 24).

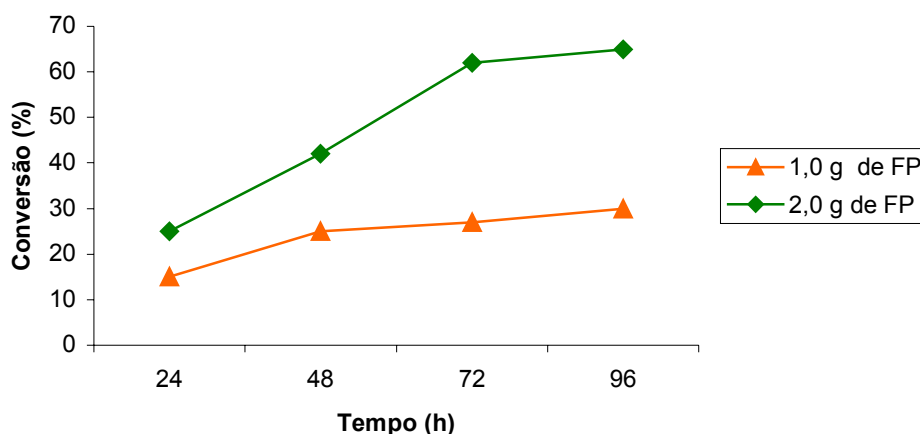


Figura 24. Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo com o sistema FP/CS/S/T contendo 1 ou 2 g de fermento de pão imobilizado.

Posteriormente, os sistemas FP/CS, FP/CS/T, FP/CS/S/T contendo 2 g de FP, foram testados quanto à sua reutilização. Os resultados obtidos após a primeira reutilização são mostrados na Figura 25.

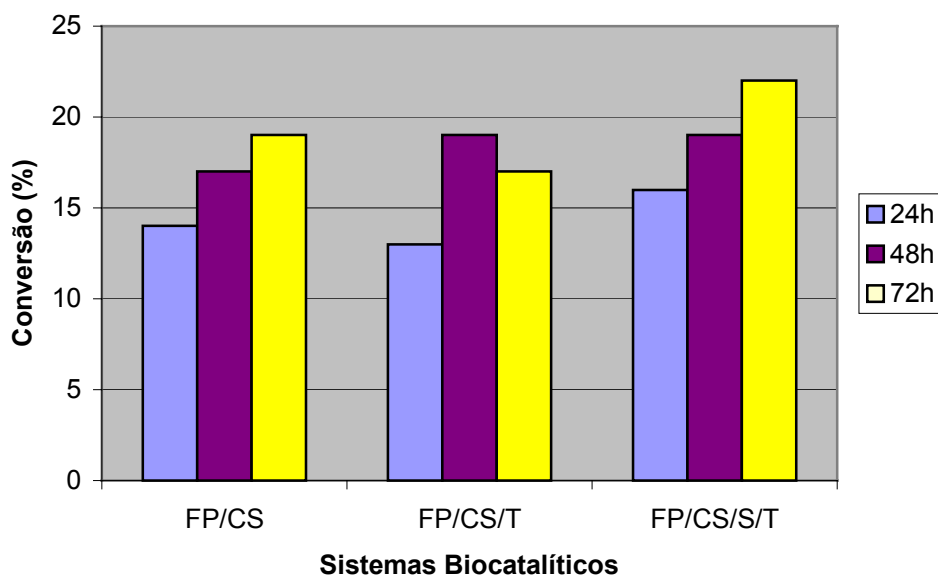


Figura 25. Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) com os diferentes sistemas biocatalíticos reutilizados, em função do tempo. 2,0 g de FP e 1,57 mmol de (3).

Após a primeira reutilização, os sistemas FP/CS, FP/CS/T e FP/CS/S/T converteram o acetoacetato de etila ao respectivo álcool *S*-(+)-(4) com conversões de 19, 17 e 22% respectivamente, após 72 horas de reação. O ee obtido com os três sistemas foi > 99%.

A fim de observar a manutenção da atividade catalítica das células do microorganismo, analisaram-se os sistemas separadamente, comparando estes resultados com os obtidos anteriormente. A Figura 26 mostra os resultados obtidos para o sistema FP/CS frente à sua primeira reutilização.

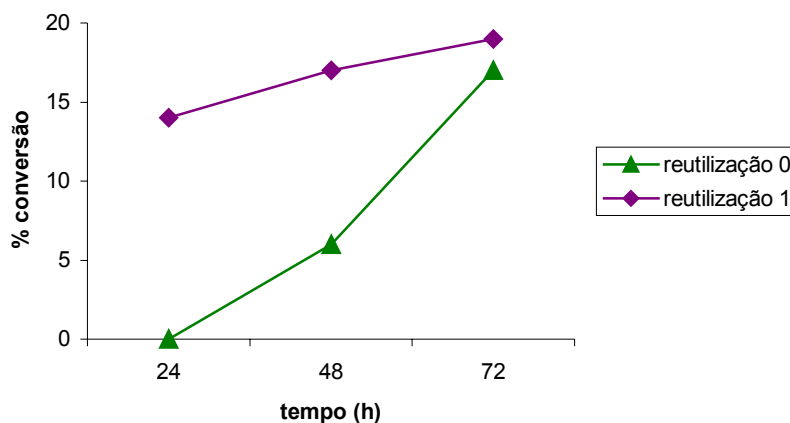


Figura 26. Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo para o sistema FP/CS. 2 g e 1,57 mmol (3).

Em comparação à primeira utilização desse sistema, a conversão ao álcool *S*-(+)-(4) foi inicialmente maior (14 %) provavelmente devido à presença de produto remanescente no suporte (que não foi descartado durante a lavagem), mantendo-se praticamente constante ao longo do tempo (19% de conversão após 72 horas de reação). O ee permaneceu maior que 99%. Observa-se que neste sistema a atividade catalítica das células do biocatalisador se manteve.

A Figura 27 mostra os resultados obtidos para a primeira reutilização do sistema FP/CS/T.

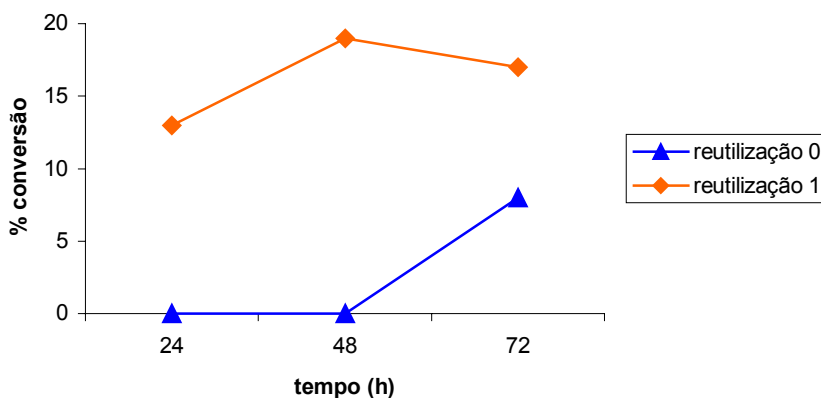


Figura 27. Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo para o sistema FP/CS/T 2 g de FP e 1,57 mmol (3).

A conversão ao álcool *S*-(+)-(4) foi inicialmente de 13% provavelmente devido à presença de produto remanescente no suporte, alcançando 17% após 72 h de reação. O ee foi maior que 99%. Comparando-se estes resultados com os obtidos na primeira utilização, observa-se que neste sistema a atividade catalítica aumentou após a primeira reutilização.

A Figura 28 mostra os resultados obtidos para a primeira reutilização do sistema FP/CS/S/T.

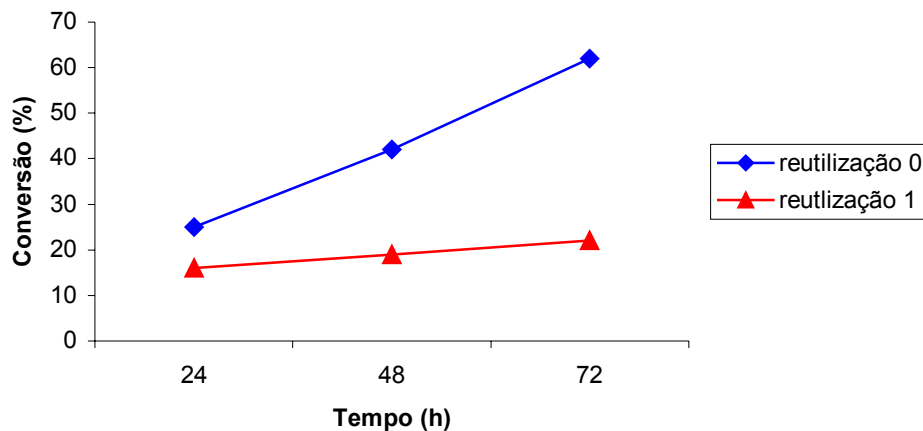


Figura 28. Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo para o sistema FP/CS/T. 2 g de FP e 1,57 mmol de (3).

O álcool *S*-(+)-(4) foi obtido com uma média de 19% de conversão ao longo da reação. O ee obtido foi >99%. Como esperado, a atividade catalítica diminuiu após a sua primeira reutilização, devido ao efeito do solvente orgânico sobre o microorganismo.

4.4. Redução do acetoacetato de etila com os sistemas FP/PVA e FP/PEO

Depois dos resultados obtidos com o FP imobilizado em filmes de caseinato de sódio (CS), foi testada e comparada a influência dos polímeros poli (álcool vinílico) (PVA) ou poli (óxido de etileno) (PEO) como suportes para a imobilização do FP.

A Figura 29 mostra os resultados obtidos quando 2,0 g de FP foram imobilizados nesses dois suportes.

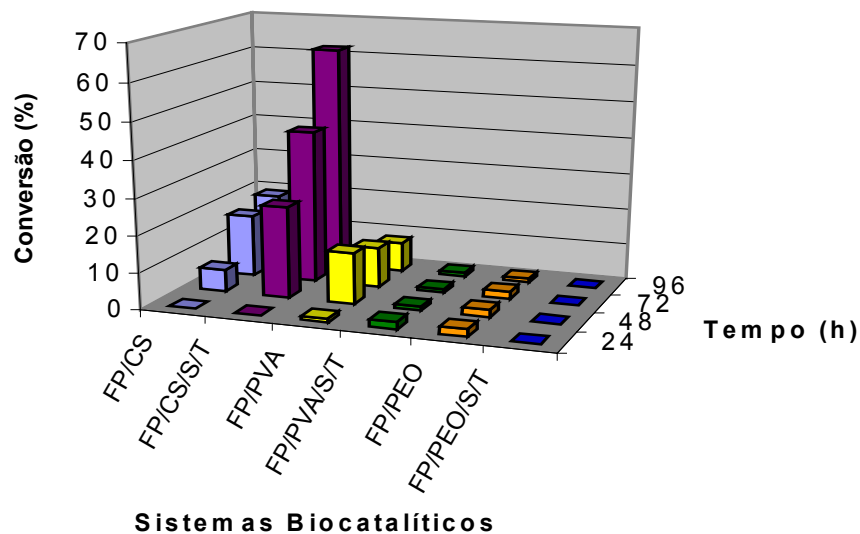


Figura 29. Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo, com o FP imobilizado em filmes de PVA e PEO. 2 g FP , 1,57 mmol de (3) .

Comparando estes dois novos polímeros (PVA e PEO), verifica-se que o sistema FP/PVA foi o que melhor converteu o substrato (3), no qual obteve-se o álcool *S*-(+)-(4) com 14 % c após 48 horas de reação. O ee obtido nesta condição foi >99%. Com os demais sistemas, as conversões foram menores que 3%, obtendo-se ee de 53% com o sistema FP/PVA/S/T e >99% com o sistema FP/PEO, após 96 h de reação. De acordo com os resultados obtidos, tanto o PVA quanto o PEO não foram suportes eficientes na biorredução do substrato (3), mesmo na presença de S e T para a proteção da parede celular.

A grande diferença nas conversões obtidas com o fermento de pão imobilizado nestes dois polímeros, em comparação com os resultados obtidos com CS (65% c), pode ser devido à notável diferença estrutural existente entre eles. O caseinato de sódio, além de ser de natureza protéica (semelhante à membrana do microorganismo), deve interagir de maneira mais eficiente para proteção celular do FP. Ou ainda, a utilização dos suportes hidrofílicos PVA e PEO, pode ter reduzido a atividade enzimática devido a mudanças conformacionais; uma vez que estes suportes podem reduzir a difusão do substrato hidrofóbico em regiões mais hidrofílicas da rede polimérica.²¹

Assim, fica evidente que as diferentes interações biocatalisador/polímero existentes para cada caso podem comprometer a atividade do biocatalisador.

Para o sistema FP/PEO/S/T, onde foi testada a adição da solução dos açúcares diretamente ao meio reacional, não foi observada a formação de produto. Analisando-se os cromatogramas obtidos para este sistema, observa-se que tanto o pico referente ao substrato quanto o referente ao produto não são observados, evidenciando que o suporte hidrofílico possa ter retido ambos. A Figura 30 mostra o cromatograma referente ao sistema FP/PEO/S/T ao longo da reação.

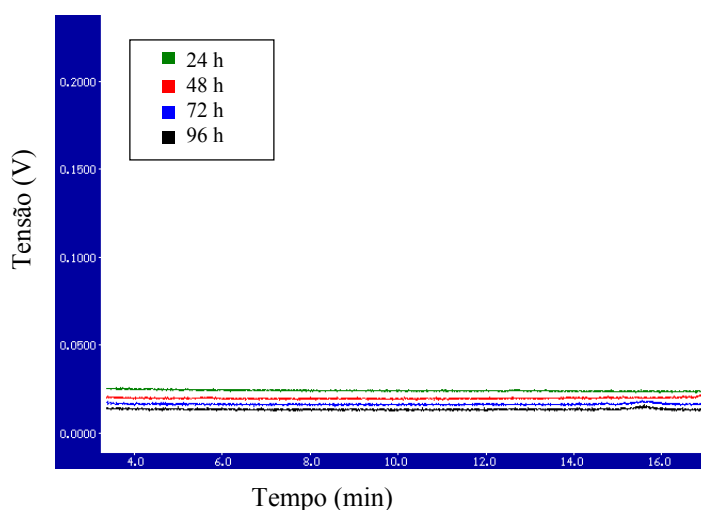


Figura 30. Cromatogramas obtidos ao longo da reação de redução de **(3)**, com o sistema FP/PEO/S/T.

Para efeito de comparação, foram testados estes suportes na imobilização de 1,0 g de FP. Desta vez, os açúcares foram adicionados à solução dos polímeros. A Figura 31 mostra os resultados obtidos para estes sistemas.

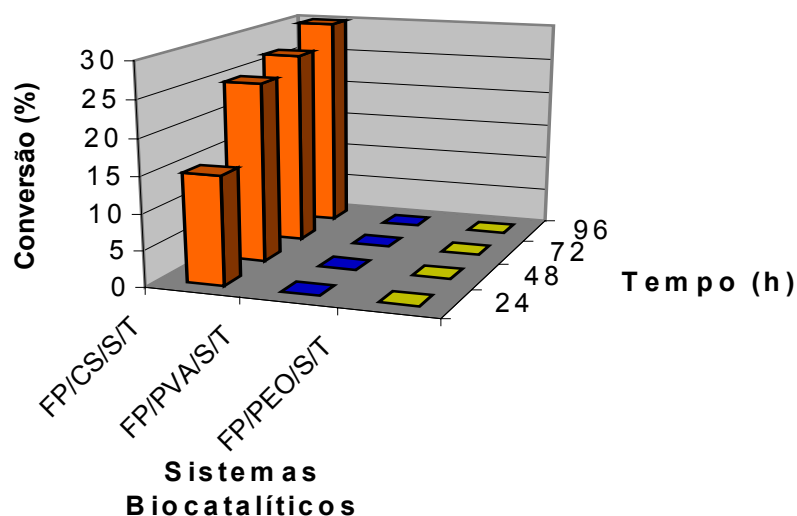


Figura 31. Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo, com o FP imobilizado nos diferentes suportes poliméricos com adição simultânea de S e T. 1g FP, 1,57 mmol (3).

O álcool *S*-(+)-(4) foi obtido somente com o sistema FP/CS/S/T, anteriormente utilizado, alcançando 30% de conversão e ee>99%, após 72 h. O FP imobilizado em PVA e PEO, não foi eficiente na redução do substrato (3).

A Figura 32 mostra comparativamente a diferença nos resultados obtidos quando se diminuiu a quantidade de FP imobilizado.

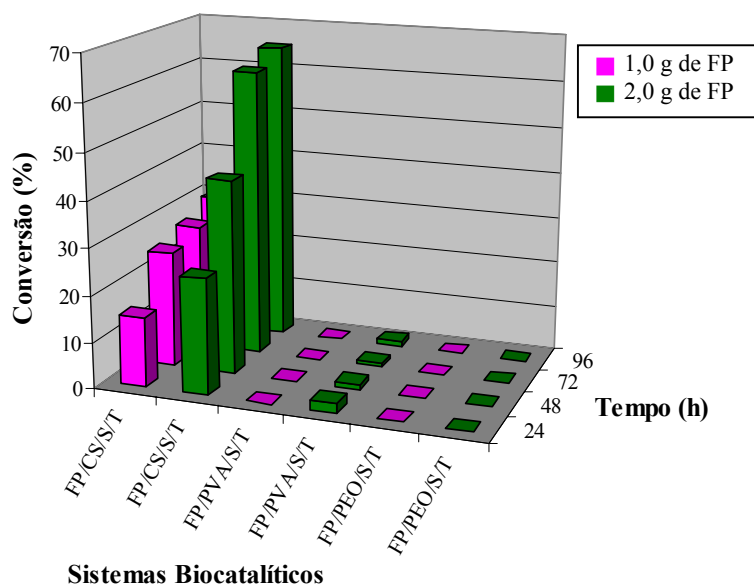


Figura 32. Conversão ao álcool *S*-(+)-(4) em função do tempo para os diversos sistemas biocatalíticos. 1 ou 2g FP, 1,57 mmol (3).

Assim, conforme já comentado anteriormente e de acordo com os resultados obtidos, o caseinato de sódio foi o melhor suporte utilizado para imobilizar o FP provavelmente devido a sua natureza protéica.

A Tabela 2, mostra todos os resultados obtidos de ee do álcool S(+)-4 com os diferentes sistemas contendo 2 g de FP.

Tabela 2. Valores de ee do álcool S(+)-4 obtidos com os diferentes sistemas biocatalíticos.

Entrada	Sistema	% ee				
		17h	24h	48h	72h	96h
1 ^c	FP	-	99	99	99	99
2	FP/CS	-	99	99	99	99
3	FP/CS/S	-	-	-	-	99
4	FP/CS/T	-	99	99	99	99
5 ^d	FP/CS/S/T	-	78	88	28	17
6	FP/K10	-	99	99	99	99
7	FP/K10/S	-	99	99	99	99
8	FP/K10/T	-	99	99	99	99
9	FP/PVA	99	99	99	99	-
10 ^d	FP/PVA/S/T	99	60	55	53	-
11	FP/PEO	99	99	99	99	-
12 ^d	FP/PEO/S/T	-	-	-	-	-

FP: 2,0 g.

De acordo com os dados da Tabela 2, para a maioria dos sistemas os valores de ee obtidos foram >99%. Apenas para os sistemas FP/CS/S/T (entrada 5) e FP/PVA/S/T (entrada 10) os valores de ee diminuíram, sendo de 17% (72h) e 53% (96h), respectivamente.

Estes resultados indicam que alterações nas condições reacionais favoreceram a atuação de outras redutases seletivas para o enantiômero *R* (determinado a partir do cromatograma do padrão racêmico), fazendo com que as células deste microorganismo (apesar de continuarem reduzindo o substrato **(3)**) tivessem sua enantiosseletividade diminuída.

4.5. Obtenção do álcool *S*-(+)-hidroxibutanoato de etila em maior escala com o sistema FP/K-10

Conforme descrito no item 3.2.4., foram utilizadas quantidades maiores do biocatalisador e substrato (4 mL) de acordo com a metodologia desenvolvida por Zanotto¹⁶, com o intuito de obter o álcool quiral (**4**) em maior escala.

Após evaporação do solvente orgânico, foi obtido 4 mL de um óleo amarelo que foi submetido a análises por CG-quiral, RMN-¹H e medida de rotação óptica.

O cromatograma de uma alíquota da reação utilizando o sistema FP/K10, evidenciando o pico do reagente (**3**) e o cromatograma do produto obtido após sete dias de reação estão apresentados na Figura 33.

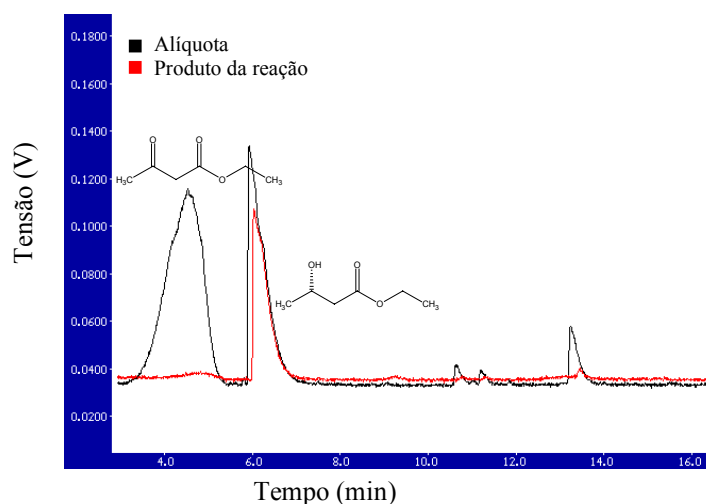


Figura 33. Cromatograma de uma alíquota da reação (48h) utilizando o sistema FP/K10 evidenciando o pico do reagente (■) e o cromatograma do produto obtido após sete dias de reação (■).

De acordo com o cromatograma (■), o produto é o álcool *S*-(+)-(**4**).

O espectro de RMN (400 MHz) em CDCl₃, mostra para o álcool *S*-(+)-**4** obtido na biorredução com FP/K10 os seguintes picos característicos (δ , ppm): 4,1-4,3 (m, 3H_a, referentes a -CH₂ e -CH- vizinhos ao oxigênio do éster etílico e do carbono hidroxílico, respectivamente); 2,4-2,6 (m, 2H_b, referente ao CH₂ vizinho ao carbono carbonílico do

éster e do carbono hidroxílico), 0,9 e 1,3 (m referente aos dois grupos CH₃). A integração destes sinais corresponde a mais de 6H, indicando a presença de solvente (hexano) ou do reagente de partida (acetoacetato de etila) (Figura 34).

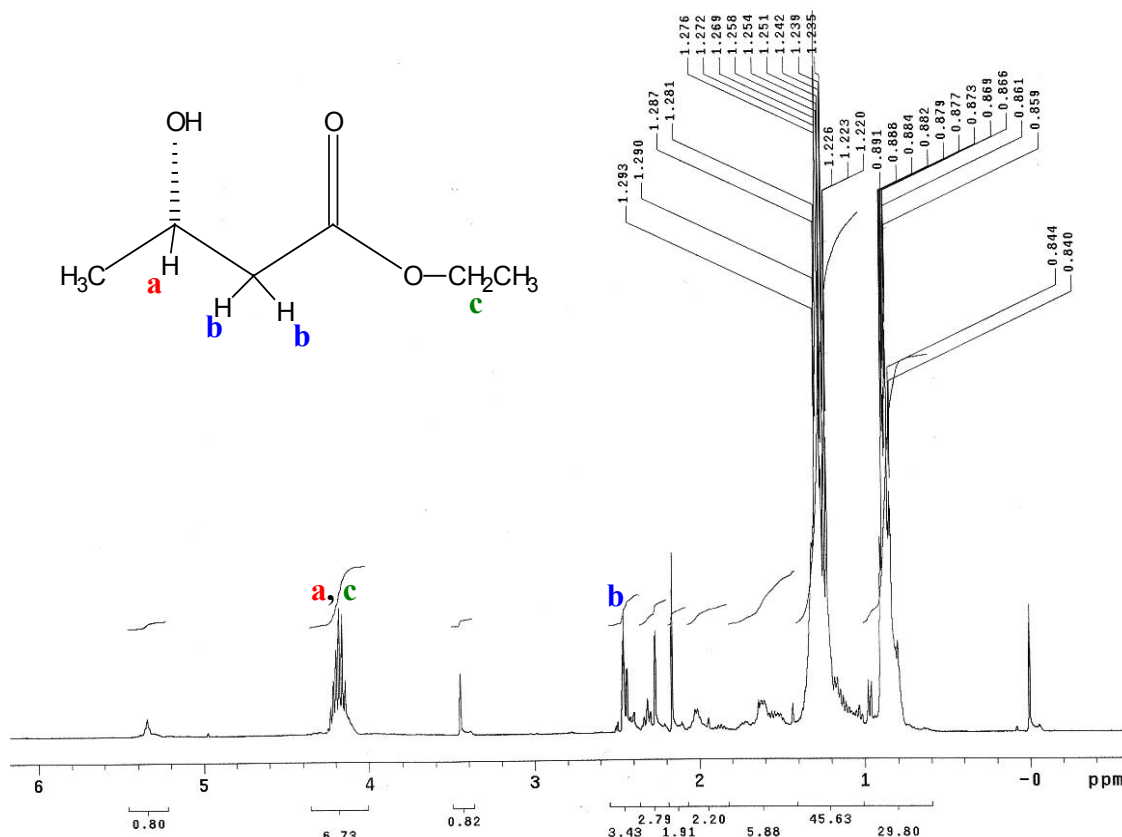


Figura 34. Espectro de RMN-¹H do álcool (4), obtido via biorredução com o sistema FP/K10. (400 MHz, CDCl₃).

Esta análise também mostra que o produto requer purificação para a obtenção com a pureza desejada

O valor de $[\alpha]_D^{25}$ citado na literatura para o álcool *S*-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila é de +43.⁴³ O valor encontrado para o álcool obtido com o sistema biocatalítico FP/K10 foi de +47, próximo ao reportado. Este resultado sugere que o produto não está totalmente puro, e que deve ser mais purificado para se obter o álcool quiral com a pureza desejada.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados ao longo da discussão, pôde-se chegar a algumas conclusões:

- ✓ Os filmes contem 13 % de água , o que garante a estabilidade das células de FP em meio orgânico.
- ✓ Os sistemas utilizados são estáveis em diversos solventes orgânicos por 48 h, a temperatura ambiente.
- ✓ Na ausência de açúcares, o filme contendo 1,0 g de FP imobilizado em CS reduziu o substrato (16-30%*c*) mais eficientemente do que com 2,0 g (0-19%*c*), no mesmo tempo de reação;
- ✓ Independente da quantidade de biocatalisador utilizado a maior porcentagem de conversão foi alcançada com o uso simultâneo de sacarose e trealose; sendo de 30% para 1,0 g e 65% para 2,0 g de FP;
- ✓ Com o sistema contendo 1,0 g de FP, a trealose foi o açúcar que apresentou melhor efeito protetor (20%*c*, após 72 h de reação);
- ✓ Os sistemas FP/CS, FP/CS/T e FP/CS/S/T foram testados quanto à sua reutilização. Com o sistema FP/CS observou-se considerável manutenção da atividade, obtendo-se conversões de 14 a 22 %, após 72 h de reação;
- ✓ Dentre os outros dois suportes utilizados, o biocatalisador imobilizado em PVA sem adição de açúcar foi o que melhor converteu o substrato ao álcool *S*-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (14%*c* após 48 horas de reação);

- ✓ O FP imobilizado em PVA e PEO não foi eficiente na biorredução de **(3)**, sendo o máximo de 14% com o sistema FP/PVA;
- ✓ A adição de açúcar ao meio reacional não pode ser feita de maneira semelhante ao sistema com K10¹⁶, visto que os suportes poliméricos são mais hidrofílicos;
- ✓ De maneira geral, o suporte não exerceu influência na enantiosseletividade do álcool obtido, os valores obtidos foram >99% com a maioria dos sistemas utilizados;
- ✓ Com o sistema FP/CS/S/T e 2g de FP, foi observado uma diminuição nos valores de enantiosseletividade (ee 17% , 96h de reação);
- ✓ Com o sistema FP/PVA/S/T obteve-se o produto racêmico com ee 53% após 72 h de reação.
- ✓ Os resultados mostraram que a escolha adequada do suporte é importante para a manutenção da atividade catalítica do biocatalisador, independente de estar sendo utilizado como enzima isolada ou célula íntegra.

6. PERSPECTIVAS

- ✓ Caracterizar morfológicamente os filmes por técnicas de infravermelho e medidas de calorimetria de varredura diferencial (DSC) e degradação térmica (TGA).
- ✓ Testar outros suportes (bentonita, carvão ativado, bauxita, etc) com o intuito de padronizar alguns métodos de imobilização do FP para serem utilizados em reações de redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila;
- ✓ Prosseguir com a obtenção do álcool enantiomericamente puro em maior quantidade, para ser utilizado como produto de partida na síntese de compostos que apresentam atividade biológica;
- ✓ Testar líquidos iônicos em quantidades catalíticas como co-solventes nestas reações visando aumentar a conversão a produto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VOET, D.; VOET, J. G.; *Biochemistry*, 2nd Edition, John Wiley & Sons Inc., New York, 1994.
2. AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S.; GAMA, M. *Engenharia Enzimática*, LIDEL-Edições Técnicas Lda, Lisboa, 2003.
3. FABER, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3rd Edition, Springer-Verlag, New York, 1997.
4. <http://www.ciadaescola.com.br/zoom/materia.asp?materia=249> acessado em 7 de novembro de 2005.
5. <http://160.114.99.91/astrojan/prot3t.htm> acessado em 7 de novembro de 2005.
6. NELSON, D. L.; COX, M. M.; *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000.
7. <http://eesc.columbia.edu/courses/ees/life/lectures/lect18/lect18.html> acessado em 7 de novembro de 2005.
8. PALMER, T.; Specificity of Enzyme Action, in *Understanding Enzymes*. 1995, Prentice Hall – Ellis Horwood. P. 67-75.
9. ADLERCREUTZ, P.; IBORRA, J. L.; SCHMIDT, E.; PEDERSEN, S. Applications. In: CABRAL, J. M. S.; BEST, D.; BOROSS, L.; TRAMPER, J. (Eds). *Applied Biocatalysis*. Chur: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 109-156.
10. STEWART, J.D. Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000. **11**: p. 363-368.
11. PEREIRA, R.S. The use of baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1998. **18**(1): p. 25-83.
12. SHIMIZU, S.; KATAOKA, M.; KITA, K. Chiral alcohol synthesis with yeast carbonyl reductases. *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 1997. **5**:p. 321-325.
13. RODRIGUES, J. A.; MILAGRE, M. S.; MILAGRE, C. D. F.; MORAN, P. J. S.; SANTANA, M. H. A. Reduction of ethyl benzoylformate mediated by *S. cerevisiae*

- entrapped in alginate fibers with double gel layers in a continuously operated reactor. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2005. **37**: p. 121-125.
14. NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; INANLOU, N. D.; FARAHMAND, B.; SALEH, M.; SHEIKH-UL-ESLAM, F.; VAEZ, J. Biotransformation of alcohol to aldehydes by immobilized cells of *S. cerevisiae* PTCC5080. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2003. **33**: p. 150-153.
 15. SHANJING, Y.; QUN, J.; LEHE, M. Tolerance of immobilized baker's yeast in organic solvents. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2002. **30**: p. 721-725.
 16. NASCIMENTO, M. G.; ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P. Estudos de proteção da célula de *S. cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. *Quim. Nova*, 2002. **25**(4): p. 567-571.
 17. NAKAMURA, K.; KONDO, S.; KAWAI, Y.; OHNO, A. Reduction by baker's yeast in benzene. *Tetrahedron Lett.*, v. 32, n. 48, p. 7075-7078, 1991.
 18. SMALLRIDGE, A. J.; MEDSON, C.; TREWHELLA, M. A. Baker's yeast activity in an organic system. *J. Mol. Cat.B: Enzym.*, 2001. **11**: p. 897-903.
 19. SMALLRIDGE, A. J.; DUMANSKI, P. G.; FLOREY, P.; KNETTIG, M.; TREWHELLA, M. A. The baker's yeast-mediated reduction of conjugated methylene groups in an organic solvent. *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 2001. **11**: p. 905-908.
 20. LÉON, R.; FERNANDES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. Whole cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 1998. **23**: p. 483-500.
 21. ZANOTTO, S. P. *Utilização de enzimas e microrganismos para a obtenção de compostos opticamente ativos*. Florianópolis, 2003. 115 p. Tese (doutorado), Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
 22. FUJII, S.; OBUCHI, K.; IWAHASHI, H.; FUJII, T.; KOMATSU, Y. Saccharides that protect yeast against hydrostatic pressure stress correlated to the mean number of equatorial OH groups. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 60, n. 3, p. 476-478, 1996.
 23. FERRAZ, A. M.; BITENCOURT, T. B.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. *Utilização de filmes de dextrana/glicerol na imobilização de lipases*. Livro de resumos da 13-SBQSul, QO-096, Florianópolis, 2005.

24. NASCIMENTO, M. G.; DALLA-VECCHIA, R.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quim. Nova*, 2004. **27**(4): p. 623-630.
25. IRIME, F.D.; TOSA, M.; PAIZS, CS.; MAJDIK, C.; MISCA, R. Baker's yeast mediated enantioselective reduction of phenothiazine based prochiral ketones. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 2001. **6**(4): p. 305-313.
26. PSARIANOS, C.; PLESSAS, S.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. Cells immobilized in a starch-gluten-milk matrix usable for food production. *Food Chem.*, 2005. **89**: p. 175-179.
27. http://www.remynd.be/yeast_systems_files/image002.gif acessado em 7 de novembro de 2005.
28. FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Quim. Nova*, 2005. **28**(5): p. 871-879.
29. RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. *Quim. Nova*, 2001. **24**(6): p. 893-897.
30. ANTUNES, O. A. C.; RIBEIRO, J. B.; RAMOS, M. C. K. V.; NETO, F. R. A.; LEITE, S. G. F. Microbiological enantioselective reduction of ethyl acetoacetate. *J. Mol. Cat. B: Enzym*, 2003. **24-25**: p. 121-124.
31. DONNICI, C. L.; TEMBA, E. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F. Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. *Quim. Nova*, 2003. **26**(1): p. 112-122.
32. SEEBACH, D.; SUTTER, M. A.; WEBER, R. H. Bakers' yeast reduction of ethyl acetoacetate. In: ROBERTS, S. M. (Eds). *Biocatalysts for Fine Chemicals Synthesis*. Chicester: John Wiley & Sons, 1999.
33. Clay-catalyzed RNA polymerization activity. Disponível em <http://www.origins.rpi.edu/claycatalyzed.html>. Acessada em 7 de novembro de 2005.
34. MINISIN, B.; TSOBNANG, F. *Ab initio* comparative study of montmorillonite structural models. *Appl. Surf. Sci.*, v. 242, p. 21-28, 2005.
35. SGARBIERI, V. C. *Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações*. Livraria Varela Ltda, São Paulo-SP, 1996.

36. SEBRAO, D. *Síntese de Ésteres Catalisada por Lipase de Pseudomonas sp. Imobilizada em Filmes de Caseinato de Sódio/Glicerol*; Trabalho de Conclusão de Curso, UFSC, 2003.
37. DALLA-VECCHIA, R.; SEBRÃO, D.; SOLDI, V.; NASCIMENTO, M. G.; *Process Biochem.*, 2005. **40**: p. 2677
38. DALLA-VECCHIA, R. *Imobilização de lipases em materiais poliméricos: Aplicações na síntese de ésteres*. Florianópolis, 2004. Tese de Doutorado – Curso de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina.
39. FURNISS, B. S.; HANNAFORD, A. J.; ROGERS, V.; SMITH, P. W. G.; TATCHELL, A. R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4th Ed.; Longman Group Limited; New York, 1978; 353 p.
40. MARPLES, B.A. *Elementary Organic Stereochemistry and Conformational Analysis*. Monographs for Teachers. Vol. 34. 1981, London: The Royal Society of Chemistry. 82.
41. ZHANG, B.-L.P., S. Cofactor recycling mechanism in asymmetric biocatalytic reduction of carbonyl compounds mediated by yeast: which is the efficient electron donor? *Chem. Eur. J.*, 2003. **9**: p. 3604-3610.
42. MAGAZÙ, S.; MIGLIARDO, F.; RAMIREZ-CUESTA, A. J. Inelastic neutron scattering study in bioprotectant systems *J. R. Soc. Interface*, 2005. **2**: p. 527-532.
43. *Catalog of Organic and Fine Chemicals*, Acrós Organic, 2002/2003, Fisher Scientific, p. 1008.

8. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS

2004

ALBUQUERQUE, P. M.; WITT, M. A.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G.; *Estudo comparativo do uso de açúcares para a proteção das células de Saccharomyces cerevisiae W3031A na redução do acetoacetato de etila*; XII SBQ-Sul; QO-024; Guarapuava-PR.

ALBUQUERQUE, P. M.; WITT, M. A.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G.; *Utilização de Saccharomyces cerevisiae comercial e da cepa W3031A na redução do acetoacetato de etila*; Biocatálisis y Biotransformaciones, 1er Encuentro Regional; PQF-2; Montevideo, Uruguai.

2005

ALBUQUERQUE, P. M.; WITT, M. A.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G.; *Influência da adição de açúcares na redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila mediada por Saccharomyces cerevisiae W3031A*; 28ª RA-SBQ; QO-114; Poços de Caldas-MG.

ALBUQUERQUE, P. M.; WITT, M. A.; ZANOTTO, S. P.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G.; *Influence of the support on the reduction of ethyl acetoacetate by immobilized baker's yeast*; 11th BMOS; PS-170; Canela-RS.

WITT, M. A.; ALBUQUERQUE, P. M.; ZANOTTO, S. P.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G.; *Influência do suporte na redução do acetoacetato de etila mediada por fermento de pão imobilizado*; XV Seminário de Iniciação Científica; UFSC; Florianópolis-SC.

WITT, M. A.; ALBUQUERQUE, P. M.; ZANOTTO, S. P.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G.; *Redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila mediada por fermento de pão imobilizado em diferentes suportes*; 13-SBQSul; QO-119; Florianópolis-SC.