

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS-CFM
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

César Agostinho Schaefer

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS
COM MICRORGANISMOS EM SISTEMA AQUOSO E/OU
BIFÁSICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Co-orientador: Prof. Dr. Boris Ugarte Stambuk

Florianópolis, 12 de fevereiro de 2015

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial a todos que de alguma forma participaram positivamente desta jornada. Dentre todos, destaco:

- A minha família pelo incentivo inicial e apoio durante toda a jornada.
- A professora Maria da Graça Nascimento pela confiança depositada, pela amizade e por todo apoio durante a realização deste trabalho.
- Ao professor Boris U. Stambuk pelas contribuições para a realização deste trabalho.
- Aos colegas e amigos do laboratório 301/306, Jaqueline, Fernanda Reis, Manuella, Julyetty, Juana, Mayara, Leandro, Paulo, Vanessa e Damianni.
- A doutoranda Adriane Mouro do Departamento de Bioquímica da UFSC, pela colaboração no cultivo da levedura *S. roraimanensis*.
- A todos os professores do Departamento de Química que contribuíram para a minha formação acadêmica.
- A todos os amigos do curso, principalmente aos colegas do 3º andar.
- A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e INCT-Catálise, pelo apoio financeiro e por possibilitar a realização deste trabalho.
- Ao Departamento de Química da UFSC pelo suporte na realização deste trabalho.

Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele se assemelhará, com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que a uma criatura harmoniosamente desenvolvida. Deve aprender a compreender as motivações dos homens, suas quimeras e suas angústias para determinar com exatidão seu lugar exato em relação a seus próximos e à comunidade.

(Albert Einstein)

RESUMO

Neste trabalho utilizou-se a levedura *Spathaspora roraimanensis* como catalisador na biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão comercial (**FP**)) e partes inteiras de vegetais, foram usados na redução dos derivados do benzaldeído (**5a,b,d-g**) e da acetofenona (**30a,e-g,j,k**). Na biotransformação de **32** em meio aquoso com a levedura *S. roraimanensis* cultivada em *D*-glicose, avaliou-se o pH, temperatura, massa de substrato e levedura, agitação e volume do meio reacional. Os melhores resultados foram obtidos sob agitação orbital (150 rpm); pH=6,5; 25°C; 9,4 μmol de **32**; 180 mg de levedura e volume reacional de 3 mL. As dihidrocarvonas (**33a-b**) foram obtidas com conversão de 21,5% e *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 88%, e os dihidrocarveóis (**34a-d**) com conversão de 71,6% e *e.d.* de **34b** (1*R*,2*S*,4*S*) de 16% em 48h de reação. Ao utilizar a levedura cultivada em *D*-xilose, nas mesmas condições, obteve-se **33** com conversão de 8,2% e *e.d.* de **33b** de 78%, e **34** com conversão de 87,1% e *e.d.* de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 42%. A redução de **5a,b,d-g** e **30a,e-g,j,k** foi efetuada com borohidreto de sódio para preparar os álcoois **22a,b,d-g** e **23a,e-g,j,k**, respectivamente em bons rendimentos. Todos os compostos foram caracterizados por análises de RMN de ¹H e IV, e usados como padrões nas análises de CG-quiral nas reações de biorredução. Na reação de **5a,b,d-g** (0,5 mmol) com **FP** em sistema bifásico (**SB**), obteve-se **22a,b,d-g** com conversão de 100% em 2h. Resultados similares foram obtidos ao usar 3 e 4 mmol dos substratos **5a** e **5e**, respectivamente. Na biotransformação de **30a,e-g,j,k** (0,5 mmol), obteve-se **23a,e-g,j,k** com conversões entre 11 e 88% em 48h de reação, usando o sistema bifásico. Os álcoois **23a,e-g,k** foram obtidos com configuração *S*- e *e.e.* >99%, e apenas **23j** como mistura racêmica. Utilizando cenoura na biotransformação de **5a** (0,4 mmol) em meio aquoso, obteve-se **22a** com conversão de 93%, sob agitação orbital, a 30°C e 4h de reação. Usando o mesmo sistema na redução de **5d,d-g** (0,2 mmol), as conversões foram entre 82 e 98% de **22b,d-g** em 5h. Na biotransformação de **30a** (0,3 mmol) com cenoura, a conversão em (*S*)-1-feniletanol (**23a**) foi de 70% com *e.e.* >99% em 24h. Ressalta-se que todas as reações foram realizadas em condições brandas de reação, e em geral foram obtidos bons resultados de conversão e seletividade aos produtos.

Palavras chaves: *Saccharomyces cerevisiae*, *Spathaspora roraimanensis*, compostos carbonílicos, sistema aquoso e bifásico

ABSTRACT

In this study, yeast *Spathaspora roraimanensis* was used as catalyst in the biotransformation of (4*S*)-carvone (**32**). *Saccharomyces cerevisiae* (commercial baker's yeast (BY)), and whole parts of plants were used to reduce some derivatives of benzaldehyde (**5a,b,d-g**) and acetophenone (**30a,e-g,j,k**). In the biotransformation of **32** in aqueous medium with *S. roraimanensis* yeast grown in the presence of *D*-glucose, some experimental parameters such as pH, temperature, yeast and substrate amount, agitation and reaction medium volume were evaluated. The best results were achieved under orbital shaking (150 rpm); pH = 6.5; 25 °C; 9.4 μmol of **32**, 180 mg of yeast and a reaction volume of 3 mL. The dihydrocarvones (**33a-b**) were obtained with conversion degree of 21.5% and *d.e.* for **33a** (1*S*,4*S*) of 88%, and the dihydrocarveols (**34a-d**) with conversion degree of 71.6% and *d.e.* for **34b** (1*R*,2*S*,4*S*) of 16% in 48h reaction. By the use of the yeast grown with *D*-xylose, under the same reaction conditions, **33** was obtained in conversion degree of 8.2% and *e.d.* for **33b** of 78%, and **34** with conversion of 87.1% and *e.d.* for **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) of 42%. The reduction of **5a,b,d-g** and **30a,e-g,j,k** was realized with sodium borohydride in order to obtain the alcohols **22a,b,d-g** and **23a,e-g,j,k**, respectively, in good yields. All compounds were characterized by ¹H NMR and IR analysis, and used as standards in chiral GC-analysis in the bioreduction reactions. In the reaction of **5a,b,d-g** (0,5 mmol) with BY in a biphasic system (BS) **22a,b,d-g** were obtained in conversion degree of 100% in 2 h. Similar results were obtained when 3 and 4 mmol of **5a** and **5e** were used, respectively. In the biotransformation of **30a,e-g,j,k** (0,5 mmol), the alcohols **23a,e-g,j,k** were obtained in conversion degrees between 11 and 88% in 48h reaction, using biphasic system. The alcohols **23a,e-g,k**, were obtained with *S*- configuration and *e.e.* > 99%, and only **23j** as a racemic mixture. Using carrot root in the biotransformation of **5a** (0,4 mmol) in aqueous system, **22a** was obtained in 93% conversion degree under orbital shaking, 30 °C and 4h reaction. Using the same system in the reduction of **5d,d-g** (0,2 mmol), the conversion degrees of **22b,d-g** were between 82 and 98% at 5h reaction. In the biotransformation of **30a** (0,3 mmol) with carrot root, the conversion degree to (*S*)-1-phenylethanol (**23a**) was 70% with *e.e.* > 99% in 24 h reaction. It is worthy of mentioning that all reactions were performed under mild conditions and, in general, good results of conversion degrees and products selectivity were obtained.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Spathaspora roraimanensis*, carbonyl compounds, aqueous and biphasic system.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática das estruturas primária (**a**), secundária (α -hélice (**b**) e folha β -pregueada (**c**)), terciária (**d**) e quaternária (**e**) de uma proteína. (Adaptado das ref. 15,17 e 18).....3
- Figura 2.** Representação dos modelos que descrevem a ligação substrato/enzima. (**a**) chave fechadura (**b**) ajuste induzido (Adaptado da ref. 15).....4
- Figura 3.** Estruturas da hexoquinase antes da ligação com o substrato (vermelho) e depois da ligação com o substrato (verde).....4
- Figura 4.** Diagrama de energia para uma reação catalisada e uma não catalisada. (Adaptado da ref. 10).....5
- Figura 5.** Estruturas dos cofatores dinucleotídeo de nicotinamida adenina e dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma oxidada (NAD^+ e NADP^+) e reduzida (NAD(H) e NADP(H)), respectivamente.....7
- Figura 6.** Redução de β -iminas com extrato de *Eisenia foetida*.....8
- Figura 7.** Biotransformação do dietil-2-oxoalquilfosfanato (**3**) com leveduras *Saccharomices cerevisiae*.....8
- Figura 8.** Obtenção do (*R*)-fenil-1,2-etanodiol (**10**) com levedura *S. cerevisiae*.....10
- Figura 9.** Redução seletiva dos α -cetomalونات com levedura *S. cerevisiae*..11
- Figura 10.** Estruturas químicas da testosterona (**13**), ácido pantotênico (**14**), fenilalanina (**15**), cocaína (**16**) e vanilina (**17**).....11
- Figura 11.** Estruturas químicas do cinamaldeído (**18**), jasmona (**19**), formaldeído (**20**) e acetona (**21**).....12
- Figura 12.** Estruturas químicas de **22a**, **22b**, **23a**, **24** e **25**.....12
- Figura 13.** Mecanismo de transferência de hidreto das coenzimas NADP(H) para compostos carbonílicos pró-quirais.....14
- Figura 14.** Redução de derivados da acetofenona com leveduras *S. cerevisiae* livres e imobilizadas.....15
- Figura 15.** Estruturas da (*4R*)-(-)-carvona (**31**) e da (*4S*)-(+)-carvona (**32**).....17
- Figura 16.** Biotransformação da (*4S*)-carvona com leveduras enoato redutases.....17
- Figura 17.** (**a**) Representação do sistema bifásico (**SB**); (**b**) Estrutura química da 1,3-difenil-2-propen-1-ona (**36**).....19

- Figura 18.** Atividade enzimática em relação aos valores de log *P* dos solventes do **SB** na obtenção seletiva do (*S*)-2,3-dicloro-1-propanol (**38**).....20
- Figura 19.** Biotransformação da 2-hexanona com microorganismos *Geotrichum candidum*.....21
- Figura 20.** Biotransformação da (*Z*)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (**40**) com diferentes microorganismos.....21
- Figura 21.** Biotransformação de derivados da acetofenona com levedura *Kluyveromyces marxianus*.....22
- Figura 22.** Biotransformação do 1-acetoxi-2-metilciclohexeno.....24
- Figura 23.** Biotransformação da trans-4-fenilbut-3-en-2-ona com vegetais.....25
- Figura 24.** Biorredução seletiva da acetofenona com células isoladas de cenouras imobilizadas em alginato de sódio.....25
- Figura 25.** Biorredução do *para*-(dimetilamino)benzaldeído com células isoladas da cenoura e com os pedaços de cenoura.....26
- Figura 26.** Representação esquemática da técnica de microextração com fibras de polipropileno. [(1) corte da membrana; (2) introdução da membrana no fio de aço inoxidável; (3) montagem do sistema de extração; (4) agitação; (5) reextração] (Adaptado da ref. 102).....27
- Figura 27.** Derivado da β-ciclodextrina utilizado como adsorvente quiral na cromatografia gasosa.....29
- Figura 28.** Esquema da técnica de microextração com membrana oca de polipropileno.....26
- Figura 29.** Estruturas dos possíveis produtos obtidos na biotransformação da (4*S*)-(+)-carvona (**32**) com levedura *S. roraimanensis*.....38
- Figura 30.** Sobreposição dos cromatogramas de CG-quiral. [azul: dihidrocarveóis adquiridos da Sigma-Aldrich (75% de **34a**, 13% de **34b**, 3% de **34c** e 6% de **34d**); preto: padrão **32**; vermelho: dihidrocarvonas (**33a** e **33b**) e verde: alíquota da biotransformação de **32** com levedura *S. roraimanensis*].....39
- Figura 31.** Efeito da variação do pH do meio reacional na biotransformação de **32** com levedura *S. roraimanensis* utilizando agitação orbital. [Condições: 180 mg levedura; 9,4 μmol de **32**; 3 mL solução tampão (0,1 mol L⁻¹, pH 2,5–8,5); 25°C; 48 h; agitação orbital (150 rpm); (conv.: ■ - **33a-b** e ● - **34a-d**; e.d.: □ - **33a-b** e ○ - **34a-d**)].....40
- Figura 32.** Efeito da variação do pH do meio reacional na biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**) com levedura *S. roraimanensis* utilizando agitação magnética. [Condições: 180 mg levedura; 9,4 μmol de **32**; 3 mL solução tampão (0,1 mol

- L⁻¹, pH 2,5–8,5); 25°C; 48 h; agitação magnética (150 rpm); (conv.: ■ - **33a-b** e ● - **34a-d**; *e.d.*: □ - **33a-b** e ○ - **34a-d**).....41
- Figura 33.** Efeito da variação da temperatura na biotransformação da (4S)-carvona com levedura *S. roraimanensis*. [Condições: 180 mg levedura; 9,4 μmol de **32**; 3 mL solução tampão (0,1 M, pH 6,5); 25°C; 48 h; agitação magnética (150 rpm); (conv.: ■ - **33a-b** e ● - **34a-d**; *e.d.*: □ - **33a-b** e ○ - **34a-d**)].....42
- Figura 34.** Valores de conversão e *e.d.* em dihidrocarvonas (**33a-b**) e dihidrocarveóis (**34a-d**) em função da massa de levedura (**A**: 24h e **B**: 48h). [Condições: 9,4 μmol de **32**; 3 mL tampão pH 6,5; 25°C; agitação orbital (150 rpm); (conv.: ■ - **33a-b** e ● - **34a-d**; *e.d.*: □ - **33a-b** e ○ - **34a-d**)].....44-45
- Figura 35.** Valores de conversão e *e.d.* em **33a-b** e **34a-d** em função da adição da massa de substrato (**A**: 24h e **B**: 48h). [Condições: 6,4-25 μmol de **32**; 180mg de levedura; 3 mL tampão pH 6,5; agitação orbital (150 rpm); 25°C; (conv.: ■ - **33a-b** e ● - **34a-d**; *e.d.*: □ - **33a-b** e ○ - **34a-d**)].....46-47
- Figura 36.** Valores de conversão em **33** e **34** em função do tempo de estocagem da levedura. [Condições: 9,4 μmol de **32**; 180mg de levedura; 3 mL tampão pH 6,5; 48h; 25°C; agitação orbital (150 rpm); (conv.: ■ - **33a-b** e ■ - **34a-d**)] *os valores de *e.d.* não estão apresentados na Figura.....48
- Figura 37.** Conversão em **33** e **34** em função da reutilização da levedura *S. roraimanensis* na biotransformação de **32**. [Condições: 9,4 μmol de **32**; 3 mL tampão pH 6,5; 25°C; 48h; agitação orbital (150 rpm); (■ - **33a-b**; ■ - **34a-d**)] *os valores de *e.d.* não foram apresentados na Figura.....49
- Figura 38.** Espectro de RMN de ¹H do álcool **22a**. [CDCl₃; 400MHz].....55
- Figura 39.** Espectro de IV de **22a**. [Filme sobre cela de ZnSe].....56
- Figura 40.** Sobreposição dos cromatogramas de **5a** e de **22a** (B).....56
- Figura 41.** Sobreposição dos cromatogramas das análises de CG-quiral de **30e** (preto) e de **23e** (azul)..... 58
- Figura 42.** Espectro de RMN de ¹H do álcool **23e**. [CDCl₃; 400MHz]..... 59
- Figura 43.** Espectro de IV de **23e**. [Filme sobre cela de ZnSe].....60
- Figura 44.** Sobreposição dos cromatogramas de **5a** (azul), **22a** (vermelho) e alíquota da biotransformação de **5a** com **FP** (verde).....62
- Figura 45.** Variação da concentração de **5a** entre 1-10 mmol. [4 g **FP**, 1 – 10 mmol de **5a**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C][conv.: ■- 30 min; ●- 1,0 h e ▲- 1,5 h].....63
- Figura 46.** Efeito da variação da concentração de **5e** na biotransformação com **FP**. [4 g **FP**, 1 – 5 mmol de **5e**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5,

- agitação magnética (150 rpm), 35 °C] [conv.: ■- 30 min; ●- 1,0 h e ▲- 1,5 h].....64
- Figura 47.** Cromatogramas de **30a** (vermelho), alcoóis *R* e *S*-**23a** (preto) e alíquota da biotransformação de **30a** com **FP** (verde).....66
- Figura 48.** Conversão em **23a** em função do pH do meio reacional. [4 g **FP**, 0,5 mmol de **30a**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão, agitação magnética (150 rpm), 35 °C] [conv.: ■-2h; ●-5h e ▲-8h].....69
- Figura 49.** Estudo de variação da quantidade de **30a** na biotransformação com **FP**. [4 g **FP**, 0,1 – 0,9 mmol de **30a**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C] [conv.: ■- 24h e □- 48h].....71
- Figura 50.** Conversão em **23a** em função da variação da porcentagem de fase aquosa na biotransformação da acetofenona. [4 g **FP**, 0,3 mmol de **30a**, 0-18 mL *n*-hexano, 42-60 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C] [conv.: ■- 8h; ●- 24h e ▲- 48h].....73
- Figura 51.** Influência do pH na biotransformação do benzaldeído (**5a**) com cenoura. [0,2 mmol de **5a**, 10g cenoura, 50mL tampão, agitação orbital (150 rpm), 30°C] [conv.: ■- 1h; ●- 2h e ▲- 5h].....77
- Figura 52.** Influência da variação de *n*-hexano na biotransformação de **5a** com cenoura. [0,2mmol de **5a**; 10g cenoura, 35 - 47,5 mL tampão pH=8; 2,5 - 15mL *n*-hexano; agitação orbital (150 rpm); 30°C] [conv.: ■- 1h e □- 2h].....79
- Figura 53.** Influência da variação da temperatura na biotransformação de **5a** com cenoura. [Condições: 0,4 mmol de **5a**, 10g cenoura, 30mL tampão, agitação orbital (150 rpm)] [conv.: ■- 2h e □- 4h].....81
- Figura 54.** Variação da conversão em **23a** em função da quantidade de acetofenona na biotransformação com cenoura. [Condições: 0,1 – 0,5 mmol de **30a**, 10 g cenoura, 30 mL tampão, agitação orbital (150 rpm), 24h, 30°C].....85
- Figura 55.** Espectro de RMN-¹H de **22b**. [CDCl₃, 400 MHz].....101
- Figura 56.** Espectro de IV de **22b**. [Filme sobre cela de ZnSe].....101
- Figura 57.** Sobreposição dos cromatogramas de **5b** (vermelho), **22b** (preto) e alíquota da biotransformação de **5b** com **FP** (azul).....102
- Figura 58.** Espectro de RMN-¹H de **22d**. [CDCl₃, 400 MHz].....102
- Figura 59.** Espectro de IV de **22d**. [Pastilha de KBr].....103
- Figura 60.** Sobreposição dos cromatogramas de **5d** (vermelho), **22d** (azul) e alíquota da biotransformação de **5d** com **FP** (preto).....103
- Figura 61.** Espectro de RMN-¹H de **22e**. [CDCl₃, 400 MHz].....104

Figura 62. Espectro de IV de 22e . [Pastilha de KBr].....	104
Figura 63. Sobreposição dos cromatogramas de 5e (preto), 22e (azul) e alíquota da biotransformação de 5e com FP (vermelho).....	105
Figura 64. Espectro de RMN- ¹ H de 22f entre 4,6 e 8,6 ppm. [CDCl ₃ , 400 MHz].....	105
Figura 65. Espectro de IV de 22f . [Pastilha de KBr].....	106
Figura 66. Sobreposição dos cromatogramas de 5f (vermelho), 22f (azul) e alíquota da biotransformação de 5f com FP (verde).....	106
Figura 67. Espectro de RMN- ¹ H de 22g entre 4,6 e 8,4 ppm. [CDCl ₃ , 400 MHz].....	107
Figura 68. Espectro de IV de 22g . [Filme sobre cela de ZnSe].....	107
Figura 69. Sobreposição dos cromatogramas de 5g (vermelho), 22g (azul) e alíquota da biotransformação de 5g com FP (verde).....	108
Figura 70. Espectro de RMN- ¹ H de 23a . [CDCl ₃ , 400 MHz].....	108
Figura 71. Espectro de IV de 23a . [Filme sobre cela de ZnSe].....	109
Figura 72. Espectro de RMN- ¹ H de 23f . [CDCl ₃ , 400 MHz].....	109
Figura 73. Espectro de IV de 23f . [Filme sobre cela de ZnSe].....	110
Figura 74. Sobreposição dos cromatogramas de 30f (vermelho), 23f (azul) e alíquota da biotransformação de 30f com FP (verde).....	110
Figura 75. Espectro de RMN- ¹ H de 23g . [CDCl ₃ , 400 MHz].....	111
Figura 76. Espectro de IV de 23g . [Filme sobre cela de ZnSe].....	111
Figura 77. Sobreposição dos cromatogramas de 30g (vermelho), 23g (azul) e alíquota da biotransformação de 30g com FP (verde).....	112
Figura 78. Espectro de RMN- ¹ H de 23j . [CDCl ₃ , 400 MHz].....	112
Figura 79. Espectro de IV de 23j . [Filme sobre cela de ZnSe].....	113
Figura 80. Sobreposição dos cromatogramas de 30j (vermelho), 23j (azul) e alíquota da biotransformação de 30j com FP (verde).....	113
Figura 81. Espectro de RMN- ¹ H de 23k . [CDCl ₃ , 400 MHz].....	114
Figura 82. Espectro de IV de 23k . [Pastilha de KBr].....	115
Figura 83. Sobreposição dos cromatogramas de 30k (vermelho), 23k (azul) e alíquota da biotransformação de 30k com FP (verde).....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a UIBBM.....	6
Tabela 2. Biotransformação de 32 com leveduras <i>S. roraimanensis</i> em função do tempo.....	43
Tabela 3. Conversão em 33 e 34 com a levedura cultivada em D-xilose.....	50
Tabela 4. Biotransformação de 32 com leveduras <i>S. roraimanensis</i> cultivada em D-glicose em função do tempo.....	52
Tabela 5. Biotransformação de 32 com leveduras <i>S. roraimanensis</i> cultivada em D-xilose em função do tempo.....	52
Tabela 6. Rendimentos e tempos de reação para a preparação dos derivados 22a,b,d-g com os dois métodos.....	54
Tabela 7. Rendimento e tempo de reação da preparação de 23a,e-g,j,k pelos dois métodos utilizados.....	57
Tabela 8. Biotransformação do benzaldeído e derivados (5a,b,d-g) com FP	61
Tabela 9. Variação da quantidade de 5a na biotransformação com FP	63
Tabela 10. Biotransformação de 30a,e-g,j,k com FP em SB	65
Tabela 11. Medidas de rotação óptica efetuadas com amostras obtidas nas reações de redução de 30a,e-g,j,l com FP	67
Tabela 12. Variação da massa de FP na biotransformação da acetofenona.....	68
Tabela 13. Variação da temperatura na biotransformação de 30a com FP	70
Tabela 14. Estudo de variação das leveduras na biotransformação de 30a	72
Tabela 15. Influência da adição de aditivos na fase aquosa na biotransformação de 30a	74
Tabela 16. Influência da variação dos substituintes na biotransformação dos derivados da acetofenona.....	75
Tabela 17. Influência da agitação na biotransformação do benzaldeído com cenoura.....	78
Tabela 18. Influência da variação da quantidade de benzaldeído na biotransformação com cenoura.....	80
Tabela 19. Biotransformação dos derivados de benzaldeído com cenouras.....	82
Tabela 20. Variação da conversão em 22a em função da utilização de diferentes vegetais e maçã na biotransformação de 5a	83
Tabela 21. Variação da conversão em 23a em função do pH e do tempo na biotransformação de 30a com cenoura.....	84
Tabela 22. Variação da conversão em 23a em função da utilização de diferentes vegetais e maçã na biotransformação da acetofenona.....	86

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtenção da L-efedrina.....	10
Esquema 2. Obtenção da terbutalina (26) e do salmeterol (27).....	13
Esquema 3. Redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados por diferentes métodos.....	16
Esquema 4. Possibilidades de biotransformação de um composto carbonílico α,β -insaturado.....	16
Esquema 5. Preparação dos alcoóis 22a,b,d-g através da redução dos correspondentes aldeídos 5a,b,d-g com NaBH_4	54
Esquema 6. Preparação dos alcoóis 23a,e-g,j,k através da redução das correspondentes cetonas 30a,e-g,j,k com NaBH_4	57

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α : alfa

β : beta

Conf.: configuração

Conv.: conversão

CG: cromatografia gasosa

CG-quiral: cromatografia gasosa com fase estacionária quiral

CD: ciclodextrina

DMSO: dimetilsulfóxido

Eq.: equação

e.d.: excesso diastereoisomérico

e.e.: excesso enantiomérico

FP: fermento de pão comercial

γ : gama

IV: infravermelho

LI: líquido iônico

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio

ref.: referência

Rend.: rendimento

$[\alpha]_D$: rotação ótica específica

rpm: rotações por minuto

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

S. roraimanensis: *Spathaspora roraimanensis*

SB: sistema bifásico

S/L: substrato/levedura

UIBBM: União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2.	ENZIMAS	2
1.2.1.	Classificação das enzimas.....	6
1.2.2.	Oxidoredutases e aplicações.....	7
1.3.	COMPOSTOS CARBONÍLICOS.....	11
1.4.	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E MEIO REACIONAL.....	18
1.5.	NOVAS LEVEDURAS E CÉLULAS VEGETAIS COMO FONTES DE ENZIMAS.....	22
1.6.	TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E DE ANÁLISE DOS PRODUTOS DAS BIOTRANSFORMAÇÕES.....	26
2.	OBJETIVOS.....	30
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2.	OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	30
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1.	EQUIPAMENTOS.....	31
3.2.	REAGENTES, SOLVENTES E BIOCATALISADORES.....	32
3.2.1.	Reagentes e solventes.....	32
3.2.2.	Biocatalisadores.....	32
3.3.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	33
3.3.1.	Cultivo e biotransformação com levedura <i>Spathaspora roraimanensis</i>	33
3.3.2.	Redução dos compostos carbonílicos via química.....	34
3.3.3.	Biotransformação utilizando fermento de pão comercial (FP)	35
3.3.4.	Biotransformação utilizando cenouras (<i>Daucus carota</i>) e/ou outros vegetais.....	35
3.3.5.	Microextração.....	35
3.3.6.	Determinação da conversão e caracterização dos produtos por cromatografia gasosa.....	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38

4.1.	BIOTRANSFORMAÇÃO DA (4S)-(+)-CARVONA MEDIADA POR LEVEDURA <i>SPATHASPORA RORAIMENSIS</i> (<i>S. roraimanensis</i>)	38
4.1.1.	Influência da agitação e do pH na biotransformação de 32 ...	39
4.1.2.	Efeito da variação da temperatura.....	42
4.1.3.	Influência do tempo	43
4.1.4.	Efeito da massa de levedura <i>Spathaspora roraimanensis</i> na biorredução de 32.....	44
4.1.5.	Efeito da concentração de 32	46
4.1.6.	Efeito do tempo de estocagem do biocatalisador.....	48
4.1.7.	Influência da reutilização da levedura <i>S. roraimanensis</i>	49
4.1.8.	Influência do tempo na biotransformação de 32 com <i>S. roraimanensis</i> cultivada em D-xilose.....	50
4.1.9.	Biotransformação de 32 em escala maior do sistema reacional	51
4.2.	PREPARAÇÃO DOS ÁLCOOIS 22a,b,d-g E 23a,e-g,j via REDUÇÃO DE 5a,b,d-g E 30a,e-g,j,k COM BOROHIDRETO DE SÓDIO (NaBH_4)	53
4.2.1.	Preparação dos alcoóis 22a,b,d-g com NaBH_4	53
4.2.2.	Preparação dos alcoóis 23a,e-g,j,k com NaBH_4	57
4.3.	BIOTRANSFORMAÇÕES MEDIADAS COM LEVEDURA <i>S. CEREVISIAE</i>	60
4.3.1.	Biotransformação de 5a,b,d-g com FP da marca Fleischmann	61
4.3.1.1.	Influência do grupo substituinte	61
4.3.1.2.	Influência da quantidade de substrato.....	62
4.3.2.	Biotransformação da acetofenona e derivados (30a,e-g,j,k) com FP	65
4.3.2.1.	Influência do tempo e do grupo substituinte.....	65
4.3.2.2.	Variação da massa de FP na biotransformação de 30a	68
4.3.2.3.	Variação do pH.....	68
4.3.2.4.	Avaliação da influência da temperatura.....	69
4.3.2.5.	Avaliação da quantidade de substrato.....	70

4.3.2.6. Avaliação do biocatalisador na biotransformação de 30a	71
4.3.2.7. Influência do volume da fase aquosa.....	73
4.3.2.8. Avaliação da adição de aditivos na biotransformação de 30a	74
4.3.2.9. Biotransformação de 30a , 30e , 30f , 30g , 30j e 30k	75
4.4. ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO VEGETAIS COMO FONTE DE ENZIMAS.....	76
4.4.1. Biotransformação do benzaldeído e derivados (5a,b,d-g) utilizando vegetais como biocatalisadores.....	76
4.4.1.1. Variação do pH na biotransformação do benzaldeído (5a) com pedaços de cenoura.....	76
4.4.1.2. Variação da agitação do sistema reacional.....	78
4.4.1.3. Adição de solvente orgânico.....	79
4.4.1.4. Efeito da quantidade do substrato.....	80
4.4.1.5. Efeito da temperatura.....	81
4.4.1.6. Influência da variação dos grupos substituintes.....	82
4.4.1.7. Uso de diversos vegetais e maçã na biotransformação de 5a	82
4.4.2. Biotransformação da acetofenona utilizando vegetais como biocatalisadores.....	83
4.4.2.1. Avaliação do tempo e pH na biotransformação da acetofenona com cenoura.....	84
4.4.2.2. Quantidade do substrato.....	85
4.4.2.3. Uso de diversos vegetais e maçã na biotransformação de 30a	85
5. CONCLUSÃO.....	87
6. PERSPECTIVAS	89
6. REFERÊNCIAS	90
ANEXO-ESPECTROS E CROMATOGRAMAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As reações mediadas por enzimas e microrganismos, reconhecidas como biocatálise ou biotransformação, têm uma longa história. A Bíblia, os monumentos egípcios e mesopotâmicos já registravam a fermentação alcoólica da uva, produção da cerveja e o preparo do pão. Todos esses processos tem a ação de enzimas presentes em microrganismos, que são responsáveis pelas transformações bioquímicas. Entretanto, a produção de compostos químicos utilizando biocatalisadores começou a ser reportada na segunda metade do século XIX, época em que a associação entre os microrganismos e o fenômeno químico foi comprovada por Pasteur (1862) e posteriormente por Brown (1886), e aceita com o modelo “chave-fechadura proposto por Fischer (1894)”^{1,2,3}

A produção de etanol a partir de açúcares, realizada por Eduard Büchner (1897) e a obtenção de grandes quantidades de glicerol para a fabricação de explosivos durante a I Guerra Mundial, marcaram o início da obtenção de produtos utilizando biocatalisadores em escala industrial, mais especificamente por processos fermentativos.^{2,4} No Brasil, pode-se destacar o programa Pro-álcool, na década de 1970 para a produção de etanol através da utilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), como o marco inicial na produção industrial com biocatalisadores.⁴

As reações biocatalisadas representam uma extensão das rotas clássicas de síntese com reduções significantes nos impactos ambientais gerados pelos processos clássicos. Seu grande atrativo é o fato de que as reações promovidas por enzimas geralmente ocorrem em temperatura e pressão ambiente e podem ocorrer em meio aquoso, permitindo que a biocatálise também seja uma metodologia que pode ser explorada no desenvolvimento da química verde. A alta régio e estereosseletividade das reações biocatalisadas pode simplificar os processos industriais, aumentando o rendimento e diminuindo a formação de subprodutos.^{1,5,6}

Processos biocatalisados são utilizados como ferramentas muito eficazes para realizar uma ampla variedade de transformações químicas que permitem a preparação de diferentes classes (grupos) de compostos orgânicos,⁷ tais como aromatizantes, fragrâncias, fármacos e defensivos agrícolas.^{8,9} Certamente, os métodos que utilizam biocatalisadores não

são superiores, mas representam uma ferramenta sintética bastante útil para completar outras metodologias da química orgânica sintética moderna, aumentando e enriquecendo-as significativamente.^{9,10,11}

A biocatálise envolve transformações químicas onde são utilizadas tanto enzimas isoladas, como células íntegras de organismos vivos (plantas, pequenos animais, etc) ou microrganismos (leveduras, bactérias e fungos).^{9,10,12}

Pode-se destacar a levedura *S. cerevisiae*, o fermento biológico de padaria ou fermento de pão (**FP**), como um dos biocatalisadores mais utilizados pelos químicos orgânicos em diversos tipos de reações, destacando-se a redução seletiva de compostos carbonílicos. O principal atrativo do uso deste biocatalisador é a ampla disponibilidade, facilidade de manuseio do mesmo e o baixo custo.^{10,13,14}

Dentro da lógica das propostas da biocatálise, este trabalho visa o desenvolvimento de metodologias que utilizam leveduras comerciais e/ou cultivadas em laboratório e células inteiras de plantas na redução de compostos carbonílicos, avaliando algumas estratégias experimentais para melhorar os valores de conversão e a seletividade dos produtos formados.

1.2. ENZIMAS

Todas as reações que ocorrem em sistemas biológicos necessitam de catalisador, sendo as enzimas este catalisador biológico.¹⁵ Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ácido ribonucleico (RNA) catalíticos, as enzimas são proteínas formadas por longas cadeias de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas e especializadas na catálise de reações biológicas.^{3,16,17}

A estrutura destas proteínas é descrita por quatro níveis organizacionais, sendo classificadas como primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária (**Figura 1a**) representa a sequência exata dos aminoácidos da cadeia peptídica, sendo específica para cada enzima. A estrutura secundária consiste no arranjo espacial da sequência dos aminoácidos, mantida principalmente por ligações de hidrogênio intramoleculares, sendo a α -hélice e a folha β -pregueada as mais estáveis. A α -hélice (**Figura 1b**) é mantida por ligações de hidrogênio entre o oxigênio do grupo -C=O e o grupo N-H do quarto peptídeo subsequente, enquanto a folha β -pregueada (**Figura 1c**) é mantida por ligações de hidrogênio entre cadeias peptídicas diferentes e paralelas, ou entre segmentos distantes e distendidos da mesma cadeia. A estrutura

terciária constitui o arranjo tridimensional de todos os átomos da proteína (**Figura 1d**), e a quaternária representa a associação de duas ou mais subunidades polipeptídicas por ligações não covalentes para compor uma unidade funcional (**Figura 1e**).^{15,16,18}

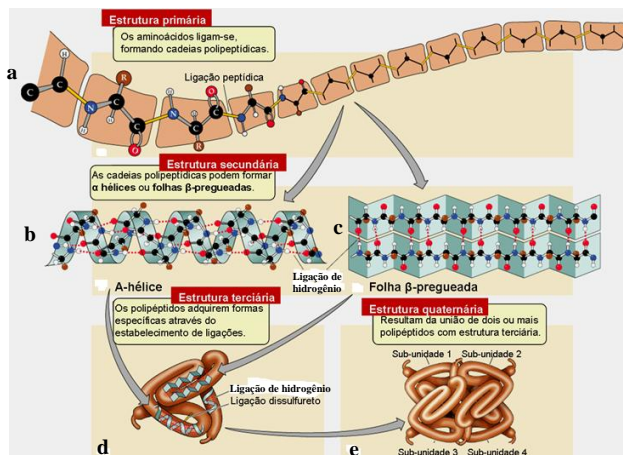


Figura 1. Representação esquemática das estruturas primária (a), secundária (α -hélice (b) e folha β -pregueada (c)), terciária (d) e quaternária (e) de uma proteína. (Adaptado das ref. 15,17 e 18)

Todas as enzimas, para atuarem como catalisadores, apresentam uma espécie de fenda frequentemente localizada na superfície da estrutura proteica, chamada de sítio ativo. O sítio ativo é uma pequena porção da enzima composta por determinados resíduos de aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional que pode ser complementar ao substrato e que são essenciais para a atividade catalítica. O substrato liga-se às enzimas através do sítio ativo para a formação do complexo enzima-substrato, sendo que esta ligação pode ser por meio de interações eletrostáticas, de Van der Waals e de ligações de hidrogênio.¹⁵⁻¹⁸

A formação do complexo enzima-substrato pode ser descrita por dois modelos, o modelo chave-fechadura onde o substrato liga-se ao sítio ativo cujo formato complementa o seu, como uma chave na fechadura (**Figura 2a**), e o do ajuste induzido, que considera que o substrato vai induzir uma mudança conformacional na estrutura da enzima, resultando em um encaixe complementar depois que o substrato é ligado (**Figura 2b**).^{15,16,18}

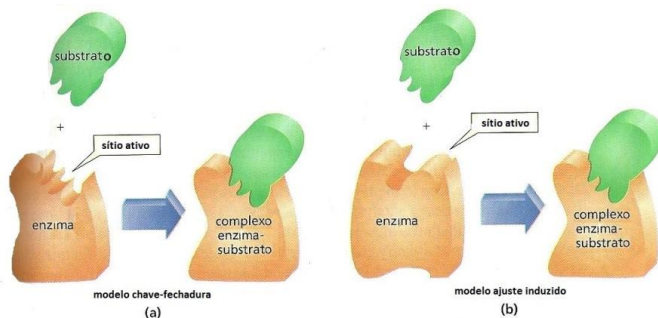


Figura 2. Representação dos modelos que descrevem a ligação substrato/enzima. **(a)** chave fechadura **(b)** ajuste induzido (Adaptado da ref. 15).

Através do modelo chave-fechadura não é possível explicar por que muitas enzimas são capazes de transformar não só os seus substratos naturais, mas também numerosos compostos não naturais e que possuem diferentes características estruturais. Esta capacidade pode ser melhor compreendida através do modelo do ajuste induzido, considerando que a estrutura protéica das enzimas não é rígida e sim maleável, permitindo que mude sua conformação sob influência do substrato de modo a envolver-se em torno do mesmo para biocatalisar a reação.¹⁰

Um exemplo do modelo de ajuste induzido é apresentado na **Figura 3**, onde é possível observar a estrutura tridimensional da enzima hexoquinase antes e depois de ligar ao seu substrato, a glicose. Destaca-se a diferença na conformação da estrutura da enzima antes e depois da ligação com o substrato.¹⁵

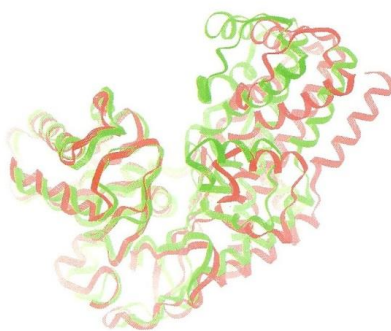
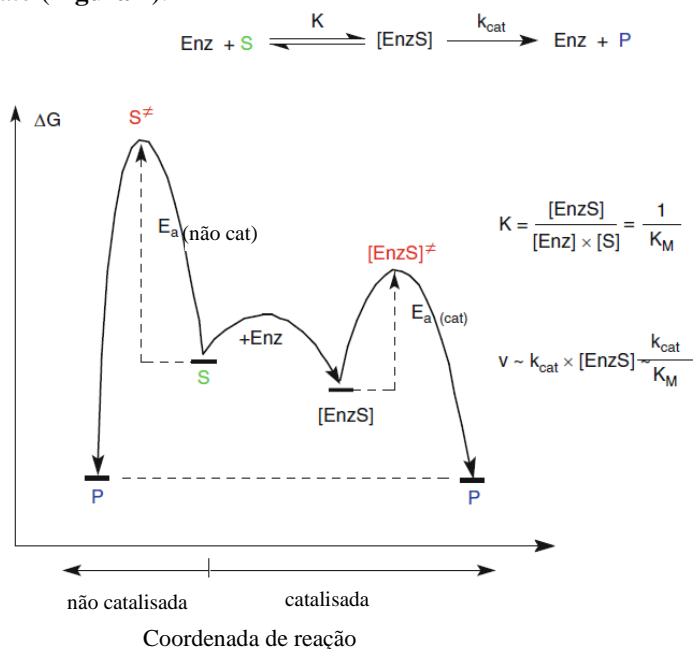


Figura 3. Estruturas da hexoquinase antes da ligação com o substrato (vermelho) e depois da ligação com o substrato (verde).¹⁵

As reações biocatalisadas acontecem normalmente em duas etapas. Na primeira, ocorre a ligação do substrato enzima devido às interações específicas entre o mesmo e às cadeias laterais dos aminoácidos que constituem o sítio ativo. Na segunda etapa, ocorre a formação do produto e o sítio ativo da enzima é regenerado para uma próxima reação.^{17,18} Como todos os catalisadores, as enzimas aceleram as reações diminuindo a barreira energética (energia de ativação) entre o substrato e o produto, sendo seu poder catalítico atribuído geralmente a estabilização pela enzima do estado de transição da reação, supondo que o catalisador está ligado mais fortemente ao estado de transição que ao substrato (**Figura 4**).^{10,19}



Enz = enzima, S = substrato, [EnzS] = complexo enzima substrato, P = produto, K = constante de equilíbrio para a formação do complexo enzima substrato, k_{cat} = constante velocidade da reação para $[\text{EnzS}] \rightarrow \text{Enz} + \text{P}$, E_a = energia de ativação, ‡ denota o estado de transição, K_M = constante de Michaelis-Menten, v = velocidade da reação

Figura 4. Diagrama de energia para uma reação não catalisada e uma catalisada por enzima. (Adaptado da ref. 10)

Uma característica importante das enzimas é a capacidade de aumentar a velocidade das reações, chegando a ser de $10^6 - 10^{23}$ vezes mais rápidas do que as não catalisadas. Este aumento da velocidade das

reações catalisadas por enzimas, além da estabilização do estado de transição, também está associado à capacidade que estas possuem em aproximar os substratos em uma orientação que favorece a formação do complexo enzima-substrato, para posteriormente formar os produtos.^{17,18}

Além da capacidade de aumentar a velocidade das reações, as enzimas, em geral, apresentam alta seletividade, atuam em condições brandas de reação (temperatura e pressão ambiente) e preferencialmente em meio aquoso.^{10,15,20}

1.2.1. Classificação das enzimas

Segundo a UIBBM – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as enzimas são classificadas em seis grandes classes, de acordo com o tipo de reação que catalisam, como mostrado na **Tabela 1**.^{10,16,17}

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a UIBBM.

Classe	Utilização na biocatálise	Reações
1-Oxidoredutases	24 %	Oxidação-redução.
2-Transferases	6 %	Transferência de grupos funcionais.
3-Hidrolases	55 %	Hidrólise de grupos funcionais.
4-Liases	12 %	Adição ou remoção de grupos.
5-Isomerases	2 %	Rearranjo intramolecular.
6-Ligases	1 %	Formação de ligações C-O, C-S, C-N ou C-C.

Com 24 % do total de utilizações, as oxidoredutases são a segunda maior classe de enzimas utilizadas como biocatalisadores em transformações químicas, sendo inferiores às hidrolases (55%).^{3,10} As oxidoredutases são um grupo de enzimas dependentes de cofatores e assim, a utilização de células íntegras ou de alternativas que permitem a regeneração destes cofatores a partir dos subprodutos das reações, são necessárias para viabilizar o custo na aplicação destas na indústria.^{10,20}

Os cofatores funcionam como auxiliares da enzima para a catálise de reações através das cadeias laterais dos aminoácidos presentes nas estruturas. Eles podem ser íons metálicos (Ex.: Co^{2+} , Cu^{2+} ,

Fe^{2+} , Mo^{2+} , Zn^{2+}) ou moléculas orgânicas pequenas, também chamadas de coenzimas (ex.: nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) (**Figura 5**)).^{15,17,21}

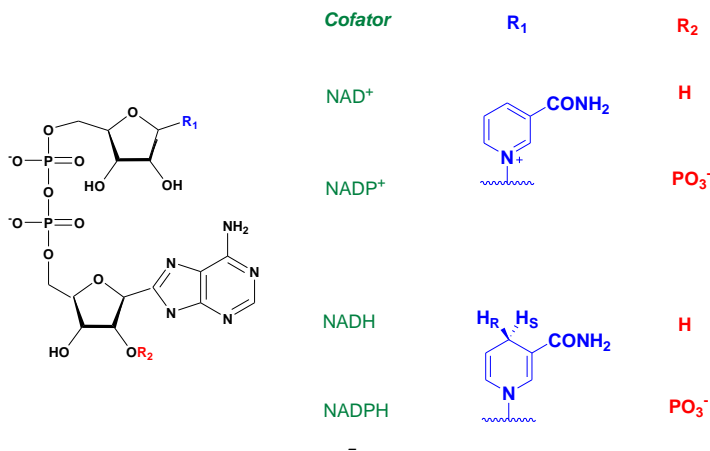


Figura 5. Estruturas dos cofatores dinucleotídeo de nicotinamida adenina e fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida nas formas oxidada (NAD⁺ e NADP⁺) e reduzida (NAD(H) e NADP(H)), respectivamente.^{15,17,21}

Os cofatores atuam usualmente como agentes oxidantes ou redutores, transportadores intermediários de grupos funcionais, ou de elétrons que são transferidos na reação enzimática global. Estes apresentam a capacidade de serem reciclados, permitindo desta forma que uma reação utilize o cofator e o regenere através de outra reação, disponibilizando-o novamente para catalisar o próximo ciclo da reação inicial.^{15,17,20}

Neste trabalho foram utilizadas as enzimas da classe das oxidorredutases como biocatalisadores na biotransformação de compostos carbonílicos, e estas são dependentes de cofatores.

1.2.2. Oxidorredutases e aplicações

A classe das oxidorredutases é subdividida em três categorias: desidrogenases (ou redutases), oxigenases e oxidases.^{10,17} Elas formam um grupo de enzimas que são muito usadas na redução de grupos

carbônicos de aldeídos e cetonas (C=O),^{21,22,23} da ligação dupla carbono-carbono (C=C),²⁴ na redução assimétrica de iminas (C=N)²⁵ e em reações de condensação.^{26,27} Esta variedade de aplicações e a capacidade de converter substratos pró-quirais em produtos quirais opticamente puros, tornam as oxidoredutases biocatalisadores valiosos para a síntese orgânica.^{23,28-30}

Na busca de obter produtos opticamente ativos e com altos rendimentos, Gallardo, Soriano e Santos (2013) utilizaram extrato de minhocas vermelhas californianas (*Eisenia foetida*) na biotransformação de iminas β -carbolina (**1a-e**). Foram obtidas as aminas (**2a-e**) correspondentes, com rendimentos entre 74-83% e *e.e.* para o enantiômero *R* entre 92-99% (Figura 6).³¹

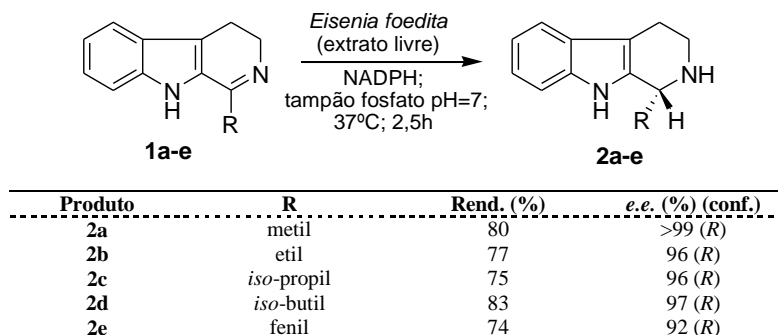


Figura 6. Redução de β -iminas com extrato de *Eisenia foetida*.

Kolodiaznyi *et al* (2014) utilizaram a levedura *S. cerevisiae* na biotransformação do dietil-2-oxoalquilfosfanato (**3**), obtendo seletivamente o 2*S*-hidroxialquilfosfanato (**4**) com rendimento de 77% e *e.e.* de 92% (Figura 7).²³



Figura 7. Biotransformação do dietil-2-oxoalquilfosfanato (**3**) com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.²³

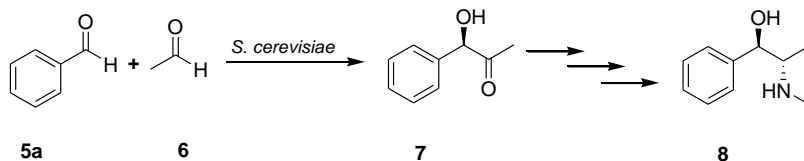
A levedura *Saccharomices cerevisiae* (*S. cerevisiae*, **FP**), tem enzimas do grupo das oxidorreductases no seu interior celular, e é um microrganismo amplamente utilizado na indústria para a produção de biomassa, bebidas alcoólicas, etanol, fármacos, feromônios e vacinas, entre outros produtos de interesse comercial.^{14,20,24,26,32,33}

As leveduras *S. cerevisiae* são utilizadas na biocatálise na forma de células íntegras, que são microrganismos provenientes da biodiversidade, ou ainda leveduras geneticamente modificadas. Entretanto, nos processos biocatalíticos também são utilizadas enzimas na forma isolada. A escolha na utilização de enzimas isoladas ou células íntegras depende de alguns fatores, tais como o tipo de reação, reciclagem de cofatores e a escala em que as transformações são realizadas.^{1,4,10,12,32}

A utilização de enzimas isoladas respalda-se na sua alta especificidade, maior produtividade e facilidade de isolamento dos produtos. Fatores relacionados com o custo, disponibilidade da enzima isolada e a inexistência de sistemas apropriados de regeneração de cofatores para determinadas classes enzimáticas, podem inviabilizar sua aplicação.

Os processos que utilizam células íntegras são, em geral, de baixo custo e especialmente interessantes para aplicação em sistemas dependentes de cofatores, pois a própria célula possui os caminhos metabólicos para promover a regeneração. Entretanto, a ocorrência de reações paralelas, resultantes do metabolismo celular, reversibilidade e baixa tolerância a substratos e solventes orgânicos, podem inativar a célula e desfavorecer o emprego de microrganismos íntegros na biocatálise.^{1,4,10,21,32}

A utilização da levedura *S. cerevisiae* para catalisar reações orgânicas é explorada desde meados do século XX.^{3,10} Um dos primeiros registros de sua utilização como biocatalisador para a obtenção de compostos orgânicos de interesse industrial, é a reação de condensação entre o benzaldeído (**5a**) e o acetaldeído (**6**) para a formação seletiva da (*R*)-1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (**7**), realizada por Neuberg e Hirsch em 1921. O produto (**7**) pode ser utilizado posteriormente para a preparação da *L*-efedrina (**8**) (**Esquema 1**).²



Esquema 1. Obtenção da *L*-efedrina a partir do benzaldeído e acetaldeído.²

Na forma de células íntegras, as leveduras *S. cerevisiae* tem sido usualmente o biocatalisador mais utilizado na redução de compostos carbonílicos, em especial de aldeídos e cetonas. Esta aplicação deve-se à ampla biodisponibilidade deste biocatalisador e à facilidade de seu manuseio nas reações de redução destes compostos carbonílicos.^{10,13, 21,23,34,35}

Hu, Xu e Nie (2010) realizaram a redução seletiva da 2-hidroxi-1-feniletanona (9) com leveduras *S. cerevisiae*, obtendo o (*R*)-fenil-1,2-etanodiol (10) com rendimento de 80% e *e.e.*>99% (Figura 8).³⁴

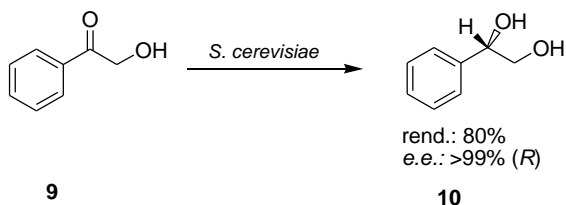


Figura 8. Obtenção do (*R*)-fenil-1,2-etanodiol (10) com levedura *S. cerevisiae*.³⁴

Recentemente, Hoegl *et al* (2014), utilizaram a levedura *S. cerevisiae* na redução seletiva de α -cetomalonatos (11a-f) obtendo os correspondentes (*R*)-álcoois (12a-f) com excelente estereosseletividade (Figura 9).³⁶

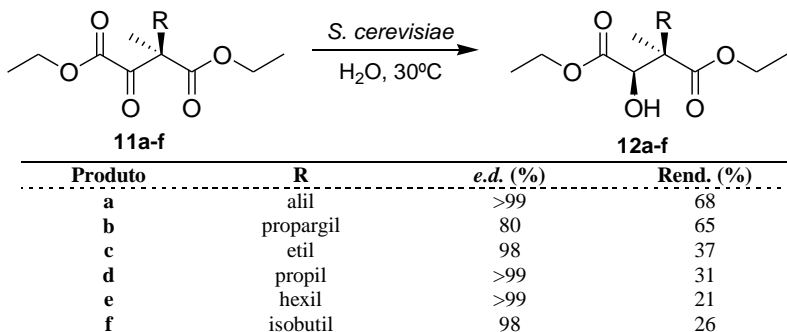


Figura 9. Redução seletiva dos α -cetomalonatos com levedura *S. cerevisiae*.

Os produtos (**12a-f**) são intermediários importantes para a síntese de pantotemidas, compostos com propriedades antibacterianas, antifúngicas e antiplasmodiais, que possuem, por exemplo, aplicação no tratamento da malária.^{36,37}

1.3. COMPOSTOS CARBÔNICOS

O grupo funcional no qual os átomos de carbono e oxigênio estão unidos por uma ligação dupla C=O, é denominado de grupo carbonila e as substâncias que apresentam esse grupo em sua estrutura são denominadas de substâncias carboniladas ou compostos carbonilados.³⁸ Dentre as substâncias que apresentam o grupo carbonila em sua estrutura pode-se destacar os ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, aldeídos e cetonas. Estas substâncias são abundantes na natureza, sendo grande parte delas importantes em muitos processos biológicos e estando presentes, por exemplo, em hormônios (testosterona (**13**)), vitaminas (ácido pantotênico (**14**)), aminoácidos (fenilalanina (**15**)), drogas (cocaína (**16**)) e flavorizantes (vanilina (**17**)) (Figura 10).^{15,38,39}

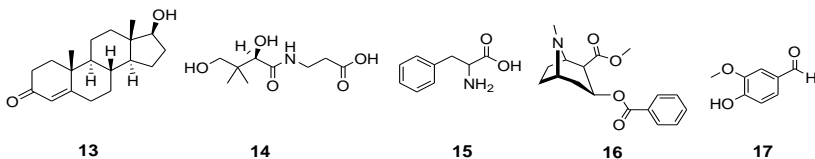


Figura 10. Estruturas químicas da testosterona (**13**), ácido pantotênico (**14**), fenilalanina (**15**), cocaína (**16**) e vanilina (**17**).

Das classes de compostos carbonilados destacam-se os aldeídos e as cetonas, que diferem estruturalmente das demais substâncias carboniladas pela ausência de grupos que possam ser substituídos por um nucleófilo, conseqüentemente formando somente produtos de adição nucleofílica.¹⁵ Aldeídos e cetonas podem ser encontrados na natureza, tendo também grande importância na indústria química, onde por exemplo, são produzidos para o uso como solventes, materiais de partida e reagentes para a síntese.^{38,39}

Na **Figura 11**, são apresentados exemplos de aldeídos e cetonas encontrados na natureza (ex.: cinamaldeído (**18**) e jasmona (**19**)) e com importância industrial (formaldeído (**20**) e acetona (**21**)), respectivamente.^{38,39}

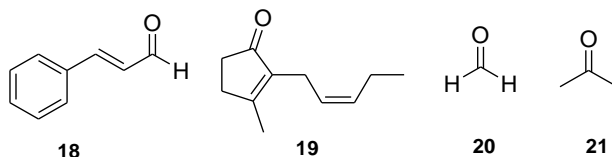


Figura 11. Estruturas químicas do cinamaldeído (**18**), jasmona (**19**), formaldeído (**20**) e acetona (**21**).^{38,39}

A redução de compostos carbonílicos é uma reação de grande importância na síntese orgânica para formar alcoóis,¹⁵ que são interessantes na indústria por constituírem materiais de partida ou intermediários para a síntese de vários produtos químicos importantes, incluindo fármacos, agro-químicos, fragrâncias e flavorizantes.⁴⁰⁻⁴⁴

Os álcoois fenilmetanol (**22a**), 1-feniletanol (**23a**), 4-metoxifenilmetanol (**22b**), 4-hidroximetil-2-metoxifenol (**24**) e o 3-fenil-prop-2-en-1-ol (**25**) (**Figura 12**), são utilizados na composição ou como fixadores de aromas e flavorizantes com toques de baunilha, cereja, gardênia e lilás nas indústrias de alimentos e cosméticos, respectivamente.⁴¹

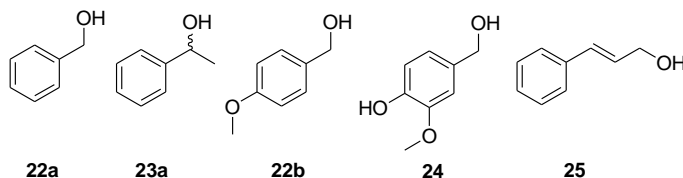
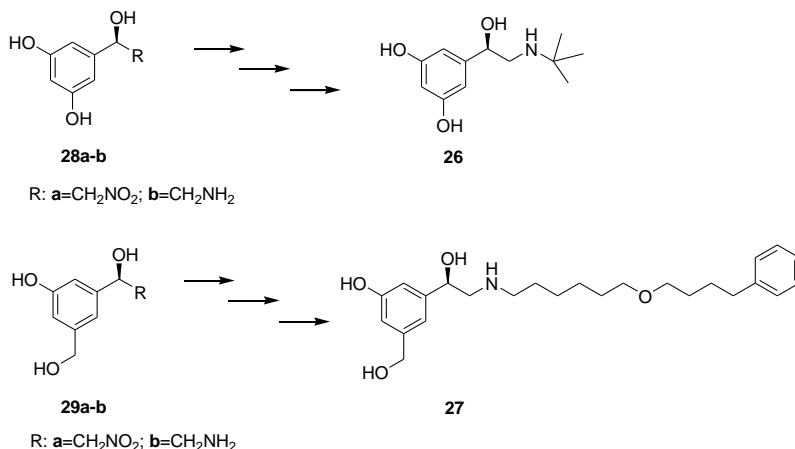


Figura 12. Estruturas químicas de **22a**, **22b**, **23a**, **24** e **25**.⁴¹

Usualmente, para a preparação destes álcoois utiliza-se o borohidreto de sódio (NaBH_4), que fornece um íon hidreto para ser adicionado no grupo carbonílico de aldeídos e cetonas, com posterior protonação em presença de um solvente prótico ou um ácido fraco.^{15,45} O NaBH_4 é considerado um agente redutor barato, seguro de manusear e ambientalmente amigável, além de apresentar seletividade para o grupo carbonila em compostos polifuncionais. Porém, obtém-se uma mistura de isômeros a partir de cetonas, quando a carbonila é pró-quiral.⁴⁵⁻⁴⁸

A obtenção de álcoois secundários oticamente ativos é um campo de pesquisa interessante na catálise enantiosseletiva, tendo em vista que compostos oticamente ativos são importantes materiais de partida ou mesmo auxiliares quirais para a obtenção de produtos farmacêuticos enantiomericamente puros.^{43,49-52}

Por exemplo, a síntese dos fármacos terbutalina (**26**) e salmeterol (**27**), que são usados principalmente no tratamento de asma e outras doenças pulmonares, necessitam dos álcoois enantiomericamente puros (*R*)-nitro (**28a** e **29a**) ou de amino derivados (**28b** e **29b**) da acetofenona, respectivamente (**Esquema 2**).⁴³



Esquema 2. Obtenção da terbutalina (**26**) e do salmeterol (**27**).

Pelos métodos tradicionais a obtenção de produtos oticamente ativos muitas vezes requer várias etapas de proteção e desproteção de grupos funcionais.⁴³ A biocatálise, apresenta-se como um componente economicamente viável no desenvolvimento de processos químicos sustentáveis para a obtenção de produtos ou intermediários de síntese

oticamente ativos.^{43,53} A redução de compostos carbonílicos utilizando enzimas e/ou microrganismos oferece uma abordagem atraente, uma vez que estes biocatalisadores apresentam normalmente uma boa seletividade, que é importante para a obtenção de compostos enantiomericamente puros. Acrescenta-se que as condições das reações biocatalisadas são consideradas como sendo ambientalmente mais benignas.^{10,43,54,55}

O mecanismo da redução de compostos carbonílicos pró-quirais mediado por enzimas dependentes do cofator NADP(H), tais como a *L*-lactato desidrogenase e a álcool desidrogenase presentes na levedura *S. cerevisiae*, está apresentado na **Figura 13**.^{10,21}

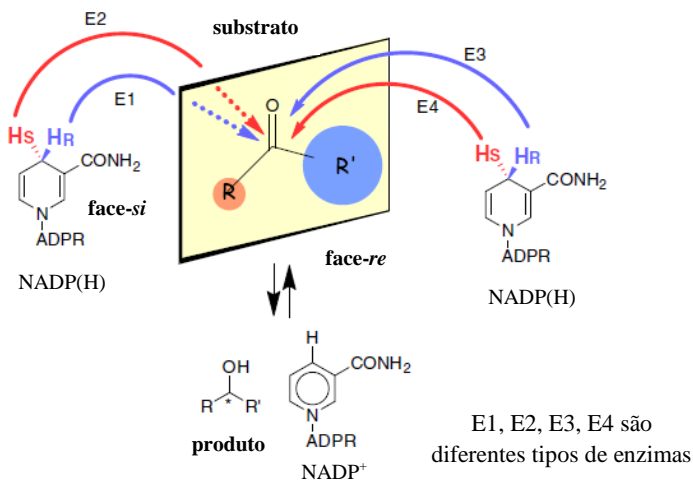
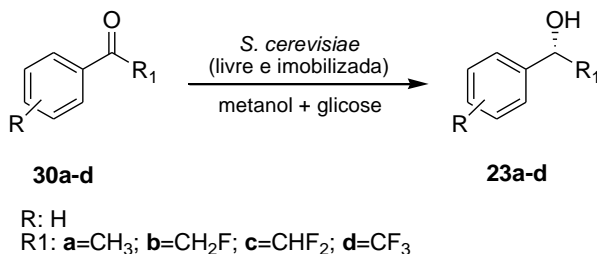


Figura 13. Mecanismo de transferência de hidreto das coenzimas NADP(H) para compostos carbonílicos pró-quirais mediados por enzimas.²¹

A estereoquímica da reação é dependente dos requisitos estéreos do substrato e pode ser prevista pela regra de Prelog, que prediz por qual face da carbonila ocorre à transferência de hidretos através do tamanho ou volume dos grupos ligados ao carbono carbonílico.^{10,36} O hidreto fornecido pelo cofator NADPH ataca a face *si* ou a face *re* do grupo carbonila dependendo da orientação da ligação da enzima com o substrato, resultando na formação do (*R*)- e/ou (*S*)-álcool, respectivamente.²¹

A influência do tamanho dos grupos laterais vizinhos a carbonila na estereoquímica dos produtos de redução foi investigada por Kato, Nakamura e Nakanishi (2014) na redução de derivados da acetofenona (**30a-d**) com levedura *S. cerevisiae* livre e encapsulada em sílica gel, variando o número de átomos de fluor no carbono vizinho a carbonila (**Figura 14**).⁵⁶

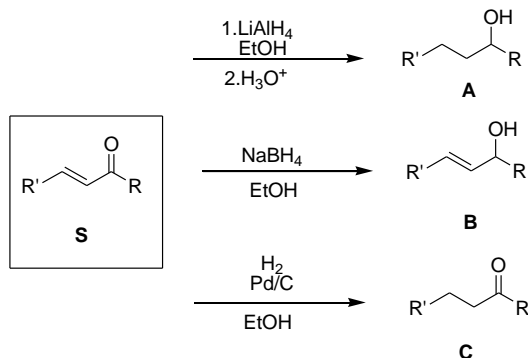


Produto	R ₁	e.e. (%)	
		(lev. livre)	(lev. imob.)
23a	CH ₃	>99	>99
23b	CH ₂ F	82	88
23c	CHF ₂	78	82
23d	CF ₃	52	55

Figura 14. Redução de derivados da acetofenona com levedura *S. cerevisiae* livre e imobilizada.

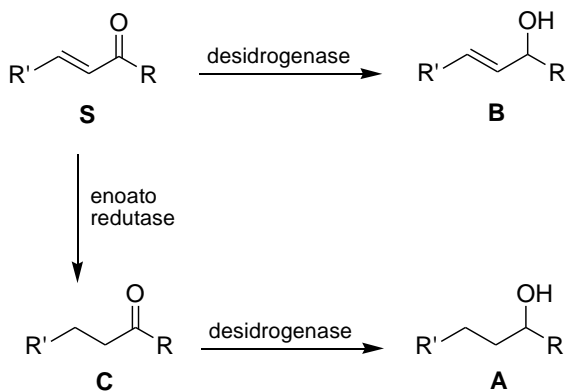
Os autores observaram que sem a presença do átomo de fluor, ocorreu somente a formação do (*R*)-1-feniletanol (**23a**). A seletividade da formação dos (*R*)-álcoois diminuiu com o aumento do número de átomos de fluor no carbono vizinho da carbonila, utilizando levedura livre (99-52%) ou imobilizada (99-55%). A diminuição na seletividade foi justificada pelo impedindo estéreo devido ao aumento no volume dos grupos substituintes laterais a carbonila.⁵⁶

Dentre os compostos carbonílicos, uma classe interessante e bastante utilizada em biorreduções com microrganismos, compreende os compostos carbonílicos α,β -insaturados.^{20,32,33,57} A redução desta classe de compostos pode resultar em diversos produtos, sendo dependentes do agente redutor e/ou catalisador. Por exemplo, a redução completa do sistema α,β -insaturado de um composto carbonílico (**S**) pode formar o álcool saturado (**A**), a redução exclusiva da carbonila origina o álcool alílico correspondente (**B**) e a redução da ligação dupla C=C leva a formação da cetona ou aldeído saturado (**C**) (**Esquema 3**).^{38,58}



Esquema 3. Redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados por diferentes métodos.

A biotransformação desta classe de compostos com células íntegras de levedura *S.cerevisiae* presente no fermento de pão comercial, em muitos casos, também pode resultar em uma mistura de produtos, sendo a formação destes relacionados às diferentes enzimas presentes nas células. Enzimas desidrogenases atuam na redução da ligação dupla C=O formando o álcool alílico (**B**) e enoato redutases na redução da ligação C=C formando a cetona ou aldeído saturado (**C**). A atuação subsequente ou concomitante de enzimas enoato redutases e desidrogenases reduzem a ligação dupla C=C e a C=O, formando o álcool saturado (**A**) (Esquema 4).^{59,60}



Esquema 4. Possibilidades de biotransformação de um composto carbonílico α,β -insaturado.^{59,60}

Um composto α,β -insaturado que pode ser destacado é a carvona (2-metil-5-(1-metiletenil)-2-ciclo-hexen-1-ona), um monoterpreno encontrado naturalmente em duas formas estereoisoméricas. A (4*R*)-(-)-carvona (**31**) é o componente principal do óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata*), e a (4*S*)-(+)-carvona (**32**) é do óleo essencial da alcaravia (*Carum carvi*), também conhecida como cominho (**Figura 15**).⁶¹

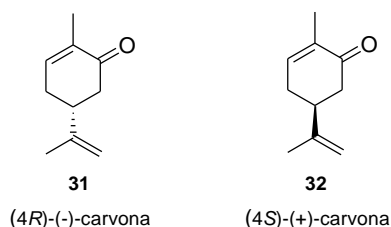


Figura 15. Estruturas da (4*R*)-(-)-carvona (**31**) e da (4*S*)-(+)-carvona (**32**).

Diversos trabalhos na literatura reportaram a biotransformação da (4*S*)-carvona e (4*R*)-carvona, utilizando diferentes fontes de enzimas.^{32,62-68} Goretti *et al* (2009) induziram a produção de enoato redutases nas leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Saccharomyces*. Estas foram utilizadas posteriormente na biotransformação da (4*S*)-(+)-carvona. Foi observado a formação das dihidrocarvonas (2-metil-5-(1-metiletenil)-ciclo-hexanona) (**33 (a,b)**), com a redução da ligação C=C α,β -insaturada, e dos dihidrocarveóis (2-metil-5-(1-metiletenil)-ciclo-hexanol) (**34 (a-d)**), com a redução da ligação dupla C-C e da ligação C=O. Não foi observado a formação dos carveóis (2-metil-5-(1-metiletenil)-2-ciclohexen-1-ol) (**35 (a,b)**) com apenas a redução da ligação C=O (**Figura 16**).

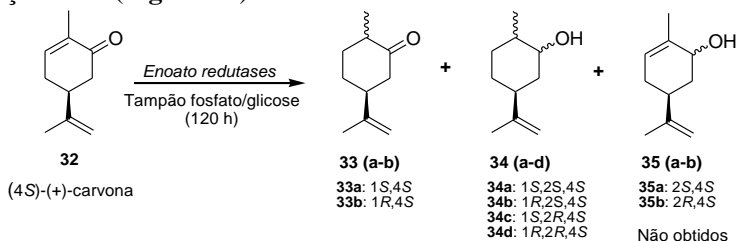


Figura 16. Biotransformação da (4*S*)-carvona com enoato redutases de leveduras.

Os produtos obtidos mostraram que mesmo induzindo a produção de enoato redutases nas leveduras, há a presença de enzimas carbonil redutases, resultando na redução do grupo C=O com subsequente redução da ligação C=C.⁶⁸

A importância da biotransformação tanto da (4*S*)-carvona como da (4*R*)-carvona, está relacionada na utilização de seus produtos de redução. As dihidrocarvonas (2-metil-5-(1-metiletenil)-ciclo-hexanona) são intermediários sintéticos importantes para compostos com diferentes atividades biológicas, como por exemplo, fármacos para o tratamento de malária.⁶⁹ Os dihidrocarveóis (2-metil-5-(1-metiletenil)-ciclo-hexanol) são utilizados na composição de fragrâncias em xampus, sabonetes e detergentes.⁷⁰

A seguir, será apresentada uma breve revisão sobre algumas técnicas e meios reacionais utilizados para melhorar o desempenho das biotransformações.

1.4. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E MEIO REACIONAL

As enzimas e os microrganismos estão sujeitos a inativação por fatores físicos, químicos ou biológicos, devido a estocagem ou mesmo durante o uso. O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas e/ou microrganismos, visa minimizar os efeitos causados pelo seu uso em ambientes adversos, tais como solventes orgânicos, variações no pH e/ou altas temperaturas, e ao mesmo tempo melhorar as propriedades das enzimas como a seletividade e especificidade.^{10,71-74}

A imobilização de biocatalisadores consiste no seu confinamento em uma região restrita (biorreator), garantindo a retenção da atividade catalítica e assegurando a possibilidade de reutilização. O confinamento consiste em técnicas onde os biocatalisadores são encapsulados em matrizes poliméricas ou microcápsulas, e/ou de técnicas onde as enzimas são ligadas ao suporte por ligação covalente e/ou cruzada, por adsorção física e/ou adsorção iônica.^{1,10,19,21,75}

O sistema bifásico (**SB**) também é considerado um método de imobilização, apesar de não apresentar uma barreira física entre o catalisador e o meio reacional. Esse sistema é formado por uma fase aquosa onde se encontra o biocatalisador e uma orgânica onde está o substrato de interesse (**Figura 17a**). Esse método é indicado para substratos, tais como a (*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (**36**) (**Figura 17b**), com potencialidade de serem biotransformados e que possuem pouca solubilidade em meio aquoso. Entretanto, este sistema necessita

de agitação mecânica contínua para possibilitar que a reação ocorra.^{10,20,33,57,76,77}

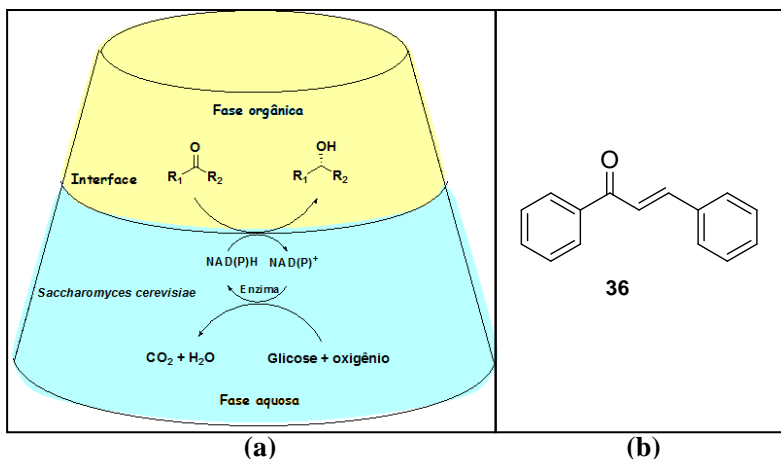
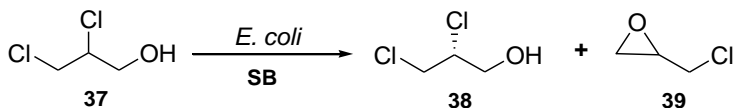


Figura 17. (a) Representação do sistema bifásico (SB); (b) Estrutura química da (*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (**36**).³³

As vantagens de usar o sistema bifásico incluem a facilidade de separação do biocatalisador do reagente e ou produto e a minimização da inibição da atividade catalítica. O solvente orgânico a ser utilizado é escolhido pela sua capacidade de solubilizar tanto o substrato bem como o produto. A biocompatibilidade é expressa pelo log *P* (coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água). As estabilidades térmica e química, não formação de emulsão com a água, baixa periculosidade no manuseio e o custo acessível são também características desejáveis.^{10,20}

Zou *et al* (2014) realizaram a resolução seletiva do (*R,S*)-2,3-dicloro-1-propanol (**37**) com células inteiras de *Escherichia coli* em sistema bifásico contendo tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 8,0) e solventes orgânicos com diferentes valores de log *P* (Figura 18).⁷⁸



Solvente orgânico	Log <i>P</i>	Atividade enzimática (μmol min ⁻¹ g ⁻¹)
isooctano	4,5	69,7
<i>n</i> -heptano	4,0	102,0
<i>n</i> -hexano	3,5	81,7
diclorometano	3,4	1,5
ciclohexano	3,2	66,7
tolueno	2,5	97,5
água	1,0	40,3

Figura 18. Atividade enzimática em relação aos valores de log *P* dos solventes do **SB** na obtenção seletiva do (*S*)-2,3-dicloro-1-propanol (**38**).

Os melhores resultados, em relação a atividade enzimática foram de 102 μmol min⁻¹ g⁻¹, utilizando *n*-heptano como solvente no sistema bifásico. Ao variar o volume de *n*-heptano os melhores resultados foram obtidos com a adição de 20%, sendo que **38** foi obtido com rendimento de 45% e *e.e.* de 98%. Ao aumentar a quantidade de *n*-heptano, ou na ausência deste, os rendimentos e valores de *e.e.* de **38** foram menores. Por exemplo, na presença de 80% de *n*-heptano, estes foram de 25 e 73%, respectivamente.

O aumento do volume da fase orgânica reduziu a taxa de difusão do produto para a fase aquosa, diminuindo o efeito inibitório deste no biocatalisador. Com o aumento da proporção de fase orgânica, aumentaram as chances de interação do biocatalisador com solvente orgânico, que pode inativar as enzimas e diminuir a taxa de reação e o rendimento do produto.⁷⁸

Visando manter a estabilidade e atividade das enzimas no meio reacional em reações mediadas por células íntegras de microrganismos, também vêm sendo utilizadas a adição de aditivos e/ou cossolventes no meio aquoso e/ou no sistema bifásico, tais como açúcares, alcoóis, compostos sulfurados e líquidos iônicos. Além de auxiliar a manter a estabilidade e atividade das enzimas, os aditivos e/ou cossolventes podem auxiliar no aumento da conversão e seletividade dos produtos destas transformações.^{21,57,77,79,80}

Matsuda, Yamanaka e Nakamura (2009), reportaram a biotransformação da 2-hexanona (**40**) com o microrganismo *Geotrichum candidum*, obtendo o (*S*)-2-hexanol (**41**) com rendimento de 78% e *e.e.* de 99%. A biotransformação foi realizada em líquido iônico, utilizando

excesso de 2-propanol como fonte de hidrogênio para regenerar o cofator NADH (**Figura 19**).²¹

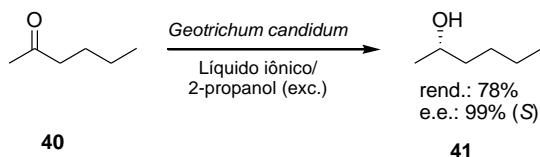
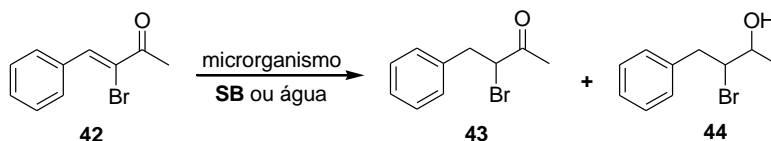


Figura 19. Biotransformação da 2-hexanona com *Geotrichum candidum*.²¹

Zampieri *et al.* (2013) realizaram a biotransformação da (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (**42**) com diversos microorganismos em meio aquoso e em sistema bifásico com líquido iônico (LI) (hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio, [BMIm][PF₆], e água (**Figura 20**).⁵⁷



Microrganismo	Sistema	43 (%)	44 (%)	
			<i>syn</i> (ee 2S,3S)	<i>anti</i>
<i>S. cerevisiae</i>	H ₂ O	26	74 (90)	-
	H ₂ O/LI	10	62 (97)	-
<i>C. albicans</i>	H ₂ O	18	61 (65)	-
	H ₂ O/LI	13	55 (81)	-
<i>R. glutinis</i>	H ₂ O	9	47 (70)	26
	H ₂ O/LI	14	47 (92)	-
<i>G. candidum</i>	H ₂ O	13	39 (65)	36
	H ₂ O/LI	15	52 (91)	-
<i>M. luteus</i>	H ₂ O	5	40 (38)	-
	H ₂ O/LI	-	42 (42)	-

Figura 20. Biotransformação da (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (**40**) com diferentes microorganismos.

Os resultados obtidos pelos autores mostraram um aumento da seletividade na formação da halohidrina (**44**), com todos os microorganismos utilizados para as biotransformações efetuadas em sistema bifásico (H₂O/LI) em comparação com as realizadas em sistema aquoso. Estes resultados podem ser devido à redução drástica das concentrações de substrato na fase aquosa e a melhor solubilidade em

LI, reduzindo o efeito inibitório deste sobre os biocatalisadores na presença de LI.⁵⁷

1.5. NOVAS LEVEDURAS E CÉLULAS VEGETAIS COMO FONTES DE ENZIMAS

As leveduras *S. cerevisiae* vem sendo usadas com sucesso na biotransformação de compostos carbonílicos,⁸¹ mas os microorganismos *Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Micrococcus luteus*,⁵⁷ *Cryptococcus*,³² *Yarrowia lipolytica*,⁴⁹ *Alternaria alternata*, *Talaromyces flavus*⁸² e *Kluyveromyces marxianus* também tem sido utilizados em reações de redução de compostos carbonílicos. Assim é importante e necessário pesquisar novos sistemas catalíticos eficientes e seletivos através do rastreio de fontes de enzimas diferentes das encontradas nas leveduras *S. cerevisiae*.⁸¹

Na busca por novos biocatalisadores, Vitali *et al* (2013) realizaram a biotransformação de derivados da acetofenona (**30(a,e-j)**) utilizando levedura *Kluyveromyces marxianus* (**Figura 21**).

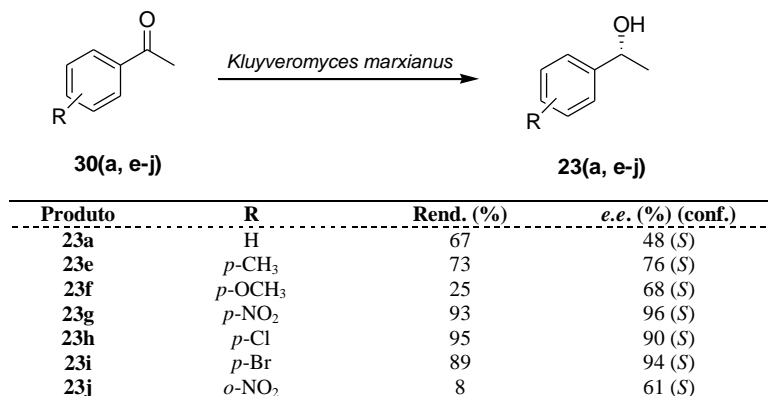


Figura 21. Biotransformação de derivados da acetofenona com levedura *Kluyveromyces marxianus*.

Inicialmente, foi investigado a influência de grupos doadores de elétrons (CH₃ e OCH₃), e de retiradores de elétrons (NO₂, Cl e Br) na posição para (*p*) do anel aromático com relação à carbonila. Na presença de grupos retiradores, foram obtidos os correspondentes *S*-alcoóis (**23g-i**) com rendimentos entre 89-93% e *e.e.* de 90-96%. Utilizando a acetofenona e os derivados com substituintes doadores de elétrons, os rendimentos e *e.e.* para os *S*-alcoóis (**23a,e,f**) foram de 25-

73% e 48-76%, respectivamente. Ao utilizar o substrato com o grupo NO₂ na posição orto (*o*), foi obtido o correspondente *S*-álcool (**23j**) com rendimento de 8% e *e.e.* de 61%. Os resultados indicaram que a posição e a natureza do grupo substituinte influenciaram na biorredução e seletividade do produto formado.⁸¹

A busca por novos biocatalisadores a partir de leveduras (fungos unicelulares) é favorecida pelo fato de que estas estão distribuídas por todos os biomas do planeta e cerca de 90% desta biodiversidade permanece desconhecida, sendo de interesse a sua exploração em especial nas regiões tropicais do planeta.^{83,84}

A levedura *Spathaspora roraimanensis* foi isolada de madeira em decomposição da floresta amazônica no estado de Roraima (Brasil). Esta levedura é biotecnologicamente importante na produção de etanol a partir de *D*-xilose, e apresenta-se também como uma alternativa para ser utilizada como biocatalisador em síntese orgânica.⁸⁵⁻⁸⁸

O alto custo em utilizar enzimas isoladas e as dificuldades em produzir determinados microrganismos em larga escala, abrem a possibilidade de explorar outras fontes de enzimas, tais como as culturas de células presentes em cenouras, beterrabas, salsaão, gengibre e batatas.^{54,89,90} A utilização de partes inteiras destas plantas como biocatalisadores em reações orgânicas vem crescendo, acompanhando o interesse cada vez maior no potencial biotecnológico das reações enzimáticas na obtenção de compostos oticamente ativos, como por exemplo o *R*- ou *S*-1-feniletanol (**23a**).⁹¹⁻⁹³

A utilização de vegetais é uma área da química com grande potencial de desenvolvimento, em especial nos países menos desenvolvidos, onde os recursos para as pesquisas nem sempre são adequados e, em geral existe uma grande variedade de vegetais com possibilidades de serem utilizados.¹¹

Tem sido reportada na literatura a utilização de diversas culturas de vegetais na biocatálise, tais como cenouras (*Daucus carota*), bananas (*Musa sapientum*), mandioca (*Manihot esculenta* e *Manihot dulcis*) e a água de coco (*Cocos nucifera*) em diversas biotransformações químicas, tais como a redução de aldeídos e cetonas, redução de ligações C=C e hidrólise de ésteres.^{11,94-98}

Bruni *et al* (2002), utilizaram pedaços de cenoura na biotransformação do 1-acetoxi-2-metilciclohexeno (**45**), e obtiveram inicialmente o produto da hidrólise (*S*-2-metilciclohexanona (**46**)), com conversão de 89% e *e.e.* de 45% em 2h de reação. Mantendo o sistema sob agitação, foi observado a formação do 1*S*,2*S*-*trans*-2-

metilciclohexanol (**47**) com conversão de 75% e *e.e.* de 100% em 24 h de reação (**Figura 22**).⁹⁸

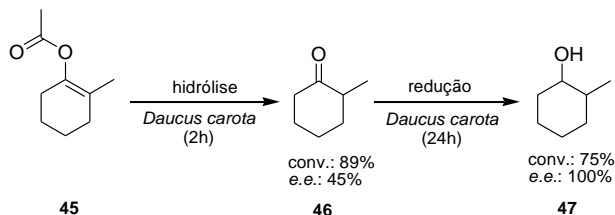


Figura 22. Biotransformação do 1-acetoxi-2-metilciclohexeno.⁹⁸

A capacidade de hidrolisar o enol acetato e em seguida efetuar a redução do grupo carbonílico do produto da hidrólise, mostra a versatilidade das enzimas encontradas na cenoura para serem utilizadas como biocatalisadores.^{97,98}

A utilização de células de vegetais em reações de biorredução se apresenta como uma alternativa para as leveduras *S. cerevisiae*, principalmente pela facilidade de manuseio e não formação de emulsão durante a extração dos produtos da biotransformação.^{91,98}

Outras vantagens deste método, são a possibilidade de reutilizar o biocatalisador e o fato de que a grande maioria das reações com vegetais são efetuadas em meio aquoso, temperatura ambiente e geram apenas resíduos biodegradáveis. Ressalta-se também que este tipo de biotransformação, é uma maneira interessante de promover o aproveitamento de alguns subprodutos da agricultura, tais como cascas de vegetais que não são utilizadas para o consumo humano.^{11,54}

Todos estes fatores devem ser considerados para verificar a sustentabilidade do método, incluindo-se ainda o custo, eficiência da biotransformação, tempo de reação, utilidade do produto obtido e a potencial importância da síntese. Talvez, a grande dificuldade do uso de pedaços de plantas como fonte de enzimas para a biocatálise seja a pouca solubilidade de alguns substratos em água, meio preferencialmente utilizado em reações de biotransformação.^{40,90,91,97}

Para melhorar a solubilidade do substrato, Majewska e Kozłowska (2013) efetuaram a biotransformação da (*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ona (**48**) com células inteiras de cenouras, salsaõ (*Apium Graveolens*) e beterrabas (*Beta vulgaris*) em *iso*-octano, obtendo o (*S*)-(*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ol (**49**) com conversões de 71-96% e *e.e.* de 72 e >99%, em 3 dias de reação. No mesmo estudo, não ocorreu a biotransformação do substrato utilizando água e acetonitrila como solventes (**Figura 23**).⁹¹

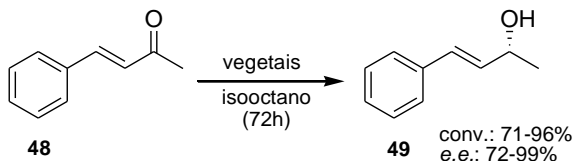


Figura 23. Biotransformação da (*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ona com vegetais.

Os resultados obtidos mostraram que os solventes orgânicos podem interagir com a membrana celular, conduzindo a uma alteração na fluidez da membrana, resultando na retenção da atividade enzimática e na facilidade de utilização de substratos insolúveis em meio aquoso. Acrescenta-se também, que alguns microrganismos possuem paredes celulares relativamente rígidas, permitindo-lhes alta robustez e tolerância a solventes e produtos orgânicos.⁹¹

A imobilização das células encontradas em vegetais serve para melhorar a resistência destas com relação a solventes e substratos orgânicos, sendo necessário utilizar células isoladas para efetuar a imobilização. A utilização de células imobilizadas resulta na capacidade de reutilização, que é uma das maiores vantagens em relação às células livres.^{75,97,99}

Akakabe e Naoshima (1994) isolaram células das cenouras e imobilizaram as mesmas em alginato de sódio, e estas foram utilizadas na biorredução seletiva da acetofenona (**30a**) (Figura 24).⁹⁵

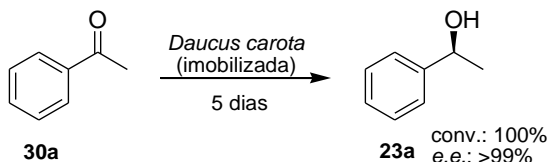


Figura 24. Biorredução seletiva da acetofenona com células isoladas de cenouras imobilizadas em alginato de sódio.

Neste trabalho, foi observada a conversão total da acetofenona em (*S*)-1-feniletanol (**23a**) com *e.e.* de >99% em 5 dias de reação, mostrando que as células imobilizadas foram seletivas na biotransformação do substrato. Ressalta-se que os autores não compararam os resultados obtidos na biorredução das células imobilizadas com as não imobilizadas, ou mesmo com pedaços de cenoura.⁹⁵

Em uma tentativa de verificar se ocorreram variações entre a utilização de células isoladas e os pedaços inteiros de plantas, Omori, Portas e Oliveira (2012) isolaram os microrganismos presentes em cenouras e investigaram a efetividade da biotransformação do *para*-(dimetilamino)benzaldeído (**5c**), nas mesmas reações e condições (Figura 25).⁹⁰

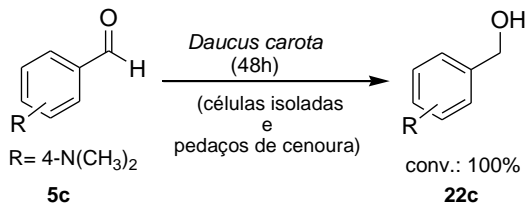


Figura 25. Biorredução do *para*-(dimetilamino)benzaldeído com células isoladas da cenoura e com os pedaços de cenoura.

Os autores observaram a mesma reatividade tanto utilizando os microrganismos isolados da cenoura e os pedaços da planta, sendo que o substrato foi totalmente biotransformado ao correspondente álcool (**22c**) em 48h de reação. Entretanto, eles ressaltaram que a utilização de cenouras cultivadas com a utilização de fungicidas e bactericidas praticamente inibiu a atividade catalítica das células.⁹⁰

Ressalta-se que as enzimas presentes nas cenouras que são responsáveis pela redução de grupos carbonílicos estão contidas nos microrganismos endofíticos. Além disto, a capacidade em biotransformar determinados substratos com a mesma eficiência que os microrganismos isolados, demonstram que o uso de pedaços de cenouras diretamente nas reações é vantajoso, principalmente pela economia de tempo e de custos para isolar os microrganismos.^{54,90,100}

A partir destas informações, neste trabalho utilizou-se cenoura (*Daucus carota*) como fonte de enzimas para a biotransformação de derivados do benzaldeído e da acetofenona em meio aquoso. Posteriormente foram utilizados alguns outros vegetais nas melhores condições obtidas na biotransformação com cenouras.

1.6. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E DE ANÁLISE DOS PRODUTOS DAS BIOTRANSFORMAÇÕES

Para acompanhar e quantificar a formação ou não dos produtos nas reações de biotransformação, é necessário extraí-los do meio

reacional e posteriormente efetuar a análise. Considerando que as biotransformações são em geral realizadas em meio aquoso ou em sistemas com a presença de água, a técnica de extração líquido-líquido com solvente orgânico é bastante utilizada. Para esta técnica é necessário que o solvente extrator forme uma fase distinta com a fase aquosa, e efetue a extração adequada dos reagentes e produtos do meio reacional.¹⁰¹

Considerando que na extração líquido-líquido, cada alíquota do meio reacional a ser analisada deve ser ao menos extraída duas vezes com o solvente orgânico adequado, o volume de solvente utilizado e conseqüentemente de resíduos gerados tende a ser grande. Neste sentido, a técnica de microextração com membranas ocas de polipropileno, vem sendo utilizada visando economia de solvente no monitoramento das reações de biotransformação.^{67,102}

A técnica de microextração consiste em mergulhar a membrana no solvente extrator e em seguida colocá-la na alíquota do meio reacional sob agitação por um período pré-determinado. Posteriormente, a membrana é colocada em pequenas quantidades de solvente em um banho de ultrassom, para a re-extração dos reagentes e produtos das reações de biotransformação (**Figura 26**).

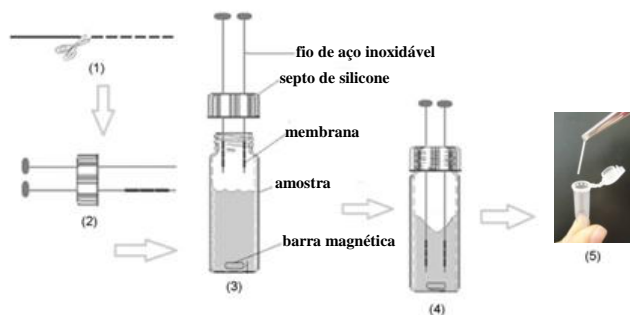


Figura 26. Representação esquemática da técnica de microextração com fibras de polipropileno. [(1) corte da membrana; (2) introdução da membrana no fio de aço inoxidável; (3) montagem do sistema de extração; (4) agitação; (5) reextração] (Adaptado da ref. 102)

A grande diferença da técnica de microextração é a quantidade pequena de solvente utilizada (microlitros), enquanto que na extração líquido-líquido tradicional são utilizados mililitros de solvente para cada

alíquota a ser analisada, chegando a uma economia de solvente na faixa de 99%.^{67,102}

Independente da técnica de extração utilizada, a formação ou não dos produtos oriundos das reações biocatalisadas por microrganismos podem ser monitorados por diversas técnicas, entre elas a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H), polarimetria, e com destaque para a cromatografia gasosa (CG).

A cromatografia gasosa (CG) é uma ferramenta instrumental muito útil para a separação e análise de compostos orgânicos que podem ser vaporizados sem decomposição.¹⁰¹ Esta técnica é bastante utilizada para testar a pureza de substâncias e para separar componentes de misturas, sendo também utilizada para determinar as quantidades relativas de cada componente de uma mistura e para a identificação de compostos, comparando-os com seus respectivos padrões.¹⁰¹

Nas análises de reações de biotransformação por CG, a conversão é calculada pela razão das áreas dos picos referentes ao reagentes e aos produtos.^{103,104}

Na formação de enantiômeros ou diastereoisômeros, a separação destes é um desafio adicional, destacando-se a cromatografia gasosa com fase estacionária quirál (CG-quirál) como um método que pode ser utilizado na identificação e caracterização dos mesmos. Este método permite a separação, identificação e quantificação de espécies químicas envolvidas nos processos biocatalíticos. A cromatografia gasosa com fase estacionária quirál é baseada em associações moleculares que podem levar a um reconhecimento quirál suficiente que resultem na resolução enantiomérica. É possível obter a razão dos picos de maneira que forneçam uma medida precisa e quantitativa da composição enantiomérica ou diastereoisomérica da amostra analisada.^{104,105}

Dentre as fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente, é possível destacar as que são baseadas em derivados de ciclodextrinas (CD). As ciclodextrinas, que são oligossacarídeos cíclicos contendo 6, 7 ou 8 unidades de glicose e denominadas de α -, β -, e γ - ciclodextrina respectivamente, são modificadas quimicamente de modo que sua cavidade fique mais apolar e que a superfície possa ser imobilizada nas paredes da coluna cromatográfica. Estas modificações são efetuadas alquilando as hidroxilas internas e substituindo as hidroxilas externas por grupos *tert*-butildimetilsilila.^{101,103,104}

Na **Figura 27** está apresentada a estrutura de um derivado da β -ciclodextrina (β -CD), utilizado como adsorvente quirál na cromatografia gasosa.¹⁰¹

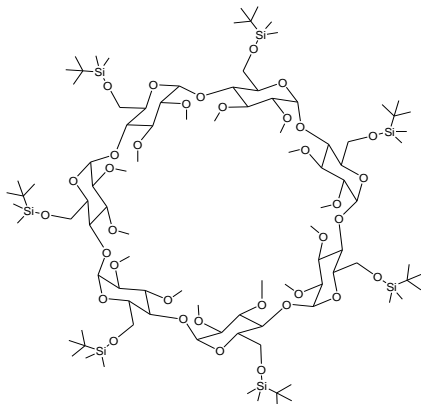


Figura 27. Derivado da β -ciclodextrina utilizado como adsorvente quiral na cromatografia gasosa.¹⁰¹

Utilizando ciclodextrinas modificadas como fase estacionária, a discriminação entre enantiômeros depende da interação entre os estereoisômeros e a cavidade quiral formada dentro das ciclodextrinas. A separação está baseada no princípio de que os enantiômeros diferem em formato se ajustando de modo distinto na cavidade quiral, passando pela fase estacionária da ciclodextrina com diferentes taxas e leva a separação dos mesmos.^{101,105}

Como para todos os métodos de análise, existem limitações para cromatografia gasosa com fase estacionária quiral, algumas das quais ocorrem também para a cromatografia gasosa em geral. As amostras deverão ser suficientemente voláteis e termicamente estáveis e, é claro, os picos deverão ser quantitativamente resolvidos na fase quiral do CG.^{104,106}

Quando é pertinente, esta metodologia é utilizada em conjunto com a polarimetria, além das técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV) e ressonância magnética de hidrogênio (RMN de ¹H) para a comprovação da formação ou não dos produtos formados nas reações de biotransformação.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a biotransformação de alguns compostos carbonílicos em diferentes meios reacionais, tais como orgânico, aquoso e/ou bifásico mediada pela levedura *S. cerevisiae*, e/ou levedura *S. roraimanensis* cultivada em laboratório, e/ou com cenoura e outros vegetais.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Cultivar a levedura *S. roraimanensis* em meio contendo diferentes fontes de carbono (glicose e xilose) visando induzir (ou reprimir) a produção das enzimas oxidoredutases.
- Otimizar as diferentes condições reacionais para a biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**) com a levedura *S. roraimanensis* em reações de micro-escala.
- Obter os compostos padrões (racêmicos ou não) (**22a,b,d-g**) e (**23a,e-g,j,k**) através da redução dos compostos carbonílicos (**5a,b,d-g**) e (**30a,e-g,j,k**) com borohidreto de sódio (NaBH₄), e caracterizá-los pelas técnicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e cromatografia gasosa com fase estacionária quiral (CG-quiral).
- Utilizar o fermento de pão comercial como catalisador para otimizar as diferentes condições reacionais na biotransformação do benzaldeído **5a** e da acetofenona **30a**, e estender as melhores condições para os derivados **5b,d-g** e **30e-g,j,k**.
- Biotransformar e otimizar as condições experimentais para a redução do benzaldeído (**5a**) e de seus derivados, bem como para a acetofenona (**30a**) utilizando cenoura (*Daucus carota*).
- Estender as melhores condições obtidas na biorredução de **5a** e **30a** utilizando cenouras, para os diferentes vegetais (batata doce, batata inglesa, maçã, açafraão, lírio-do-brejo e batata aipo).
- Comparar os resultados obtidos e determinar quais são os melhores sistemas biocatalíticos para cada substrato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado e desenvolvido no laboratório de Biocatálise, coordenado pela Prof^a Dr^a Maria da Graça Nascimento e situado nos laboratórios 301 e 306 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Também participou neste projeto como co-orientador, o Prof. Dr. Boris U. Stambuk do Departamento de Bioquímica da UFSC, coordenador do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras.

O cultivo da levedura *S. roiraimanensis* foi efetuado em colaboração com a doutoranda Adriane Mouro do Departamento de Bioquímica da UFSC.

3.1. EQUIPAMENTOS

➔ Equipamentos utilizados nos laboratórios 301 e 306:

- Agitadores magnéticos (Dist e/ou Micro Química).
- Rotaevaporador (Büchi 461).
- Balanças analíticas (Adventurer Ohaus-AR2140 e AND-EK200i).
- Shaker (B. Braun Biotech International- Certomat^RMO).
- Cromatógrafo a gás (Agilent Technologies 7820 A, CG System) equipado com coluna quiral (CP - Chirasil - Dex CB).
- Polarímetro (Eleptron - Schmid + Haensch).
- Centrifuga (Excelsa Baby - 208N).
- Autoclave (Phoenix - AV30).
- Medidor de pH (Marte MB10).
- Banho Termostatizado (Micro Química - MQBTC9920).
- Banho Dubnoff (Tecnal - TE0532).
- Banho Ultrassom (Thorton - T1440).
- Aparelho de Ponto de Fusão (Micro Química - APF301).

➔ Equipamentos utilizados na Central de Análises:

- Espectrofotômetro de infravermelho (Bruker ALPHA FT-IR spectrometer).
- Espectrômetro de RMN-¹H (Varian AC 400F, 400MHZ).

3.2. REAGENTES, SOLVENTES E BIOCATALISADORES

3.2.1. Reagentes e solventes

Merck: (S)-(+)-carvona (98 %), tolueno (99,7 %), acetona (99,5 %), 4-metóxiacetofenona (98 %), L-cisteína (99%);

Grupo Química: etanol (99,5 %), dimetilsulfóxido (99 %);

Acumedia: peptona;

Biobrás: extrato de levedura;

Vetec: ácido bórico (99,5 %), fosfato de potássio dibásico (98 %), diclorometano (99,5 %), acetato de etila (99,5 %), sílica gel (5-40 μ), hidróxido de sódio (99,5 %), benzaldeído (99 %), glicerol (98 %), ácido cítrico (99,5 %), bicarbonato de sódio (99,5 %);

Sigma-Aldrich: sacarose (99,9%), trealose, glicose; 4-metilbenzaldeído (97 %), 3-nitrobenzaldeído (97%), 2-nitrobenzaldeído (98%), 4-nitrobenzaldeído (98 %), 4-metilacetofenona (95 %), 3-nitroacetofenona (98%), 2-nitroacetofenona (99%), 4-nitroacetofenona (98 %), 4-metóxi-benzaldeído (98 %), borohidreto de sódio (98,5 %); dihidrocarveóis [75% (1S,2S,4S); 13% (1R,2S,4S); 3% (1S,2R,4S) e 6% (1R,2R,4S)];

Synth: n-hexano (99,5 %), clorofórmio (99,8 %);

CIL: clorofórmio deuterado (99,8);

3.2.2. Biocatalisadores

➤ Fermento biológico comercial (leveduras secas de *S. cerevisiae*) das marcas Fleischmann, Dona Benta, Emulzint, Mauri e Nordeste.

➤ Linhagens industriais CAT-1 e PE-2 de *S. cerevisiae* (leveduras secas).³³

➤ Leveduras da espécie *Spathaspora roraimanensis*⁸⁵, cultivada no laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras (BQA-UFSC).

➤ Cenoura (*Daucus carota*), maçã (*Malus domestica*), lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), batata inglesa (*Solanum tuberosum*), batata aipo (*Arracacia xanthorrhiza*), mandioca (*Manihot esculenta*), e açafrão-da-terra (*Curcuma longa*) obtidos de fontes comerciais (sem agrotóxico).

3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. Cultivo e biotransformação com levedura *Spathaspora roraimanensis*

3.3.1.1. Cultivo das leveduras

Para o cultivo da levedura *Spathaspora roraimanensis*, preparou-se uma solução com 2% de peptona, 1% de extrato de levedura e 2% de *D*-glicose (ou 2% de *D*-xilose), ajustando o pH para 5 e completando o volume até 50 mL. Esta solução foi colocada em um erlenmeyer de 250 mL e esterilizada em uma autoclave a 121°C, 1 atm de pressão, por 15 min. Após a esterilização retirou-se 3 mL desta solução e transferiu-se para um tubo de ensaio estéril para realizar o pré-inóculo da levedura (semeadura), mantendo o tubo sob agitação orbital (160 rpm), 28°C por 48h. O restante da solução foi armazenado na geladeira durante este período. Após as 48h, retirou-se 50 µL do pré-inóculo transferindo-os para a solução no erlenmeyer e colocando em seguida o mesmo por 48h sob agitação orbital (160 rpm) a 28°C. Após as 48h o conteúdo foi transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 4°C e 6000 rpm, o sobrenadante foi descartado e a levedura foi lavada com água destilada e novamente centrifugada, repetindo o ciclo por 3 vezes. A levedura foi armazenada na geladeira (4 - 8°C) no tubo Falcon com água destilada.

A metodologia de cultivo da levedura foi adaptada do trabalho de Cadete *et al* (2013).⁸⁵

3.3.1.2. Biotransformação com levedura *Spathaspora roraimanensis*

As reações de biotransformação com a levedura cultivada em laboratório foram realizadas em micro escala, com uma razão substrato/levedura (S/L) de 8 mg g⁻¹ em solução tampão fosfato de potássio/citrato (pH 3,5-8,5), em um volume total inicial de 3 mL. Posteriormente, foram realizados testes de biotransformação em volumes de 30 mL, com a mesma razão S/L.⁶⁷ A formação dos produtos das reações foram acompanhadas por análises de CG-quiral, utilizando a técnica de microextração para extrair os reagentes e produtos do meio reacional.

3.3.2. Redução dos compostos carbonílicos via química

A redução de compostos carbonílicos (**5a,b,d-g**) e (**30a,e-g,j,k**) utilizando o borohidreto de sódio (NaBH_4) para obter seus correspondentes alcoóis (**22a,b,d-g**) e (**23a,e-g,j,k**) foi efetuada em dois meios reacionais distintos. Sendo utilizadas duas técnicas, uma utilizando sílica (SiO_2) e outra utilizando ácido bórico (H_3BO_3).

3.3.2.1. Redução via $\text{NaBH}_4/\text{SiO}_2$

Os compostos derivados do benzaldeído (**5a,b,d-g**) e da acetofenona (**30a,e-g,j,k**) foram reduzidos com $\text{NaBH}_4/\text{SiO}_2$ para a formação dos respectivos álcoois. Em um erlenmeyer (125 mL) com agitação magnética adicionou-se 1,0 g dos derivados em aproximadamente 20 mL de etanol absoluto, seguido de 0,6 g de NaBH_4 (15 mmol) e 1,0 g de sílica gel (5-40 μ). As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (ccd), utilizando misturas *n*-hexano/acetato de etila em diferentes proporções. Após o término das mesmas, a mistura reacional foi filtrada e lavada com diclorometano (3 x 20 mL), sendo este evaporado no rotaevaporador.⁴⁷

Os correspondentes álcoois foram analisados por IV, RMN de ^1H , CG-quiral e medidas de rotação óptica (quando pertinente), servindo como padrões para as reações de biotransformação. Estes compostos foram usados como padrões para as reações de biotransformação.

3.3.2.2. Redução via $\text{NaBH}_4/\text{H}_3\text{BO}_3$

Alternativamente efetuou-se a reação de redução com $\text{NaBH}_4/\text{H}_3\text{BO}_3$. Este método é uma alternativa que pode ser considerada como sendo mais ecologicamente correta, pois nestas condições foram adicionados quantidades equimolares de NaBH_4 , H_3BO_3 e dos compostos carbonílicos em um graal e macerados até a completa homogeneização e formação do produto. A reação também foi monitorada por ccd utilizando misturas *n*-hexano/acetato de etila em diferentes proporções. Ao final o produto foi extraído com diclorometano (2x 20 mL) e filtrado.⁴⁶ Após a evaporação do diclorometano os produtos também foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H , IV, CG-quiral e medidas de rotação óptica (quando pertinente).

3.3.3. Biotransformação utilizando fermento de pão comercial (FP)

Para as reações de biotransformação com **FP**, colocou-se em um erlenmeyer de 125 mL, 0,5 mmol dos substratos (**5a,b,d-g**) e (**30a,e-g,j,k**) dissolvidos em 18 mL de *n*-hexano, 42 mL de solução tampão fosfato de potássio/ácido cítrico (pH 3,5-8,5) e 4 g de FP. Este sistema foi submetido à agitação com temperatura controlada (20-40°C).

As condições experimentais iniciais foram adaptadas de trabalhos descritos na literatura.¹⁰⁷

Alíquotas foram tiradas da reação em tempos pré-determinados e extraídas com diclorometano (3 x 15 mL) ou usando a técnica de microextração. A formação ou não dos produtos foi acompanhada submetendo as amostras extraídas a análises por CG-quiral e RMN de ¹H.

3.3.4. Biotransformação utilizando cenouras (*Daucus carota*) e/ou outros vegetais

Para a biotransformação de (**5a,b,d-g**) e (**30a**) foram adquiridas cenouras frescas no comércio local deste gênero. Lavou-se as cenouras com água corrente e, em seguida, estas foram cortadas em fatias de aproximadamente 0.5 cm (sem descascar). Pesou-se 10 g em um Erlenmeyer de 125 mL e em seguida adicionou-se 50 mL de solução tampão potássio/ácido cítrico (pH 6 - 9) e 0,2 mmol dos substratos. O sistema foi submetido à agitação sendo tiradas alíquotas da reação em tempos pré-determinados e extraídas com diclorometano (3 x 10 mL).^{90,93} A formação ou não dos produtos foi acompanhada submetendo as amostras extraídas a análises por ccd, CG e RMN de ¹H.

O mesmo procedimento foi adotado para a biotransformação de **5a** e **30a** com maçã, lírio-do-brejo, batata-doce, batata inglesa, batata aipo, mandioca e açafrão-da-terra.

3.3.5. Microextração

Para efetuar a extração dos produtos das reações realizadas em micro-escala na biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**) com leveduras *Spathasporas roraimanensis* e nas biotransformações com **FP** e cenouras, foi utilizada a técnica de microextração.

Foi inserida uma membrana porosa, oca e tubular de polipropileno de aproximadamente 1,0 cm em um fio de aço inoxidável fixado na tampa de um frasco de vidro de 4 mL. Depois de fixada, a membrana foi mergulhada em um solvente adequado por alguns segundos e imersa no frasco com a amostra do meio reacional, sendo o sistema mantido sob agitação constante por 15 min. Após este tempo, a membrana foi removida do fio de aço e introduzida num frasco eppendorf contendo 80 μL de diclorometano. Este sistema foi colocado em banho de ultrassom por 5 min e a solução resultante analisada por CG-quiral (**Figura 28**).^{67,102}

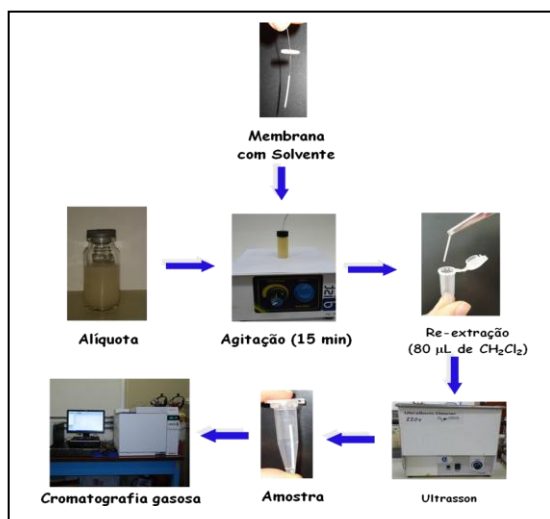


Figura 28. Esquema da técnica de microextração com membrana oca de polipropileno.

Na microextração da biotransformação de **32** com a levedura *S. roraimanensis*, o solvente extrator utilizado foi o tolueno, com os derivados **5a,b,d-g** utilizou-se o 1-octanol e com **30a,e-g,j,k** solvente foi o 1-hexanol.

3.3.6. Determinação da conversão e caracterização dos produtos por cromatografia gasosa.

As alíquotas retiradas do meio reacional e depois de extraídas por microextração ou extração líquido-líquido tradicional, foram

analisadas no cromatógrafo a gás equipado com uma coluna capilar de fase estacionária quirál (CG-quirál). A conversão (c) em produto foi calculada utilizando a **Equação 1**, e os valores de excesso diastereoisomérico (*e.d.*) ou enantiomérico (*e.e.*) com a **Equação 2**.

$$c = \frac{(\text{área do produto})}{(\text{área do substrato}) + (\text{área do produto})} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

$$e.d. \text{ ou } e.e. = \frac{(\text{área do isômero maior}) - (\text{área do isômero menor})}{(\text{área do isômero maior}) + (\text{área do isômero menor})} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

As condições de análise de CG-quirál para cada substrato estão apresentadas nos itens abaixo.

3.3.6.1. Condições de programação do CG-quirál para a (4S)-carvona (32)

- Coluna: Supelco (BetaDEX™ 120, 30m x 0.25mm x 0.25µm)
- Detector por ionização em chama (FID): 220°C
- Injetor split (50:1): 220°C
- Fluxo do gás de arraste (H₂): 0,76 mL min⁻¹
- Temperatura do forno: 90-135°C (10°C/min), 135-140°C (2°C/min) e 140-230°C (10°C/min).
- volume da amostra: 1 µL

3.3.6.2. Condições de programação do CG-quirál para os derivados do benzaldeído (5a,b,d-g) e da acetofenona (30a,e-g,j,k)

- Coluna: Restek (RT-BetaDEX-sm, 30m x 0.32mmID x 0.25mm df)
- Detector por ionização em chama (FID): 220°C
- Injetor split (50:1): 220°C
- Fluxo do gás de arraste (H₂): 2,0 mL min⁻¹
- Temperatura do forno: 90-135°C (10°C/min), 135-160°C (5°C/min) e 160-230°C (10°C/min).
- volume da amostra: 1 µL

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. BIOTRANSFORMAÇÃO DA (4*S*)-(+)-CARVONA MEDIADA POR LEVEDURA *SPATHASPORA RORAIMENSIS* (*S. roraimanensis*)

Em trabalho realizado anteriormente, foi efetuada a biotransformação da (4*S*)-(+)-carvona (**32**) utilizando as leveduras *S. cerevisiae*, *C. flavecens* e *S. roraimanensis*, e os fungos CF 0305 e CG 0504.¹⁰⁸ A partir dos resultados obtidos nas biotransformações realizadas em sistemas de microescala, utilizou-se a levedura *S. roraimanensis* para otimizar algumas condições experimentais, tais como, variação do pH, agitação do sistema, temperatura, massa do substrato e da levedura, com o objetivo de aumentar a conversão do substrato e a seletividade dos produtos obtidos.

Na **Figura 29** são apresentados os possíveis produtos obtidos na biotransformação da (4*S*)-(+)-carvona (**32**) mediada pelas células da levedura *S. roraimanensis*.

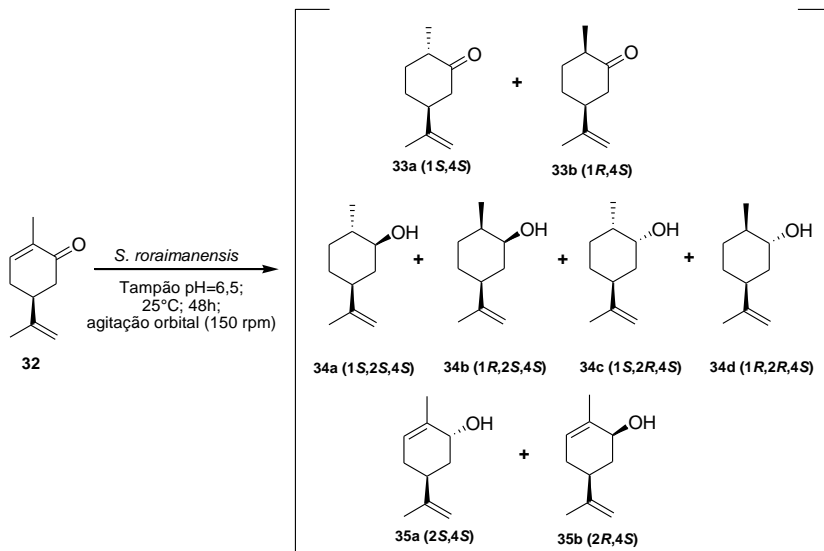


Figura 29. Estruturas dos possíveis produtos obtidos na biotransformação da (4*S*)-(+)-carvona (**32**) com a levedura *S. roraimanensis*.

Os estudos iniciais foram feitos com a levedura cultivada em *D*-glicose, sendo a identificação e caracterização da formação dos produtos determinada pela comparação dos tempos de retenção com os respectivos padrões adquiridos da Sigma-Aldrich. Na **Figura 30** está apresentada a sobreposição das análises de cromatografia gasosa para os padrões adquiridos e a análise da biotransformação de **32** com a levedura *S. roraimanensis*. Não foi observada a formação dos carveóis **35a** e **35b**.

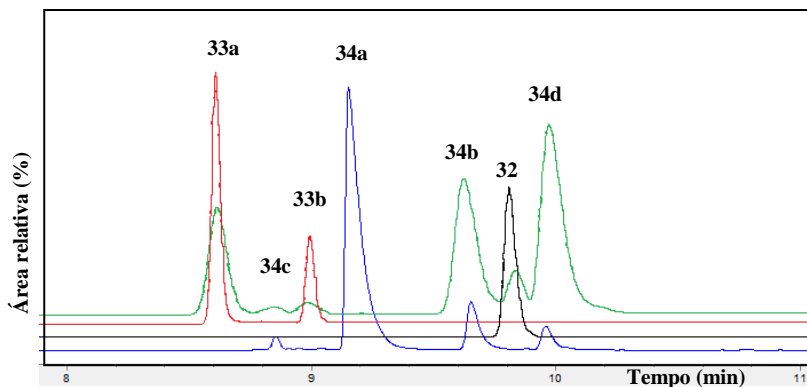


Figura 30. Sobreposição dos cromatogramas de CG-quiral. [azul: dihidrocarveóis adquiridos da Sigma-Aldrich (75% de **34a**, 13% de **34b**, 3% de **34c** e 6% de **34d**); preto: padrão **32**; vermelho: dihidrocarvonas (**33a** e **33b**) e verde: alíquota da biotransformação de **32** com levedura *S. roraimanensis*]

4.1.1. Influência da agitação e do pH na biotransformação de **32**

As enzimas tem por característica atuarem melhor como biocatalisadores a uma determinada faixa de temperatura e pH, sendo que estas informações são importantes na perspectiva de utilizá-las em reações de biocatálise com possíveis aplicações industriais.⁵³ Deve-se considerar que os microrganismos são suscetíveis de sofrer danos em sua estrutura devido a agitação mecânica, diminuindo ou até perdendo a atividade enzimática.¹⁰⁹

Para avaliar a influência destes parâmetros, variou-se o pH do meio reacional de 2,5 até 8,5 sob duas condições diferentes de agitação, orbital e a magnética. A identificação e caracterização dos produtos foram determinadas pela comparação dos tempos de retenção com os

respectivos padrões comerciais. Os resultados de conversão e *e.d.* para a formação de **33a,b** e **34a-d** foram determinados por cromatografia gasosa e estão apresentados nas **Figuras 31** e **32**, respectivamente.

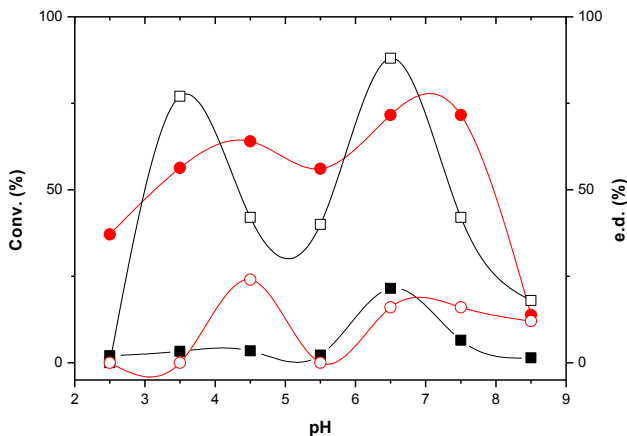


Figura 31. Efeito da variação do pH do meio reacional na biotransformação de **32** com levedura *S. roraimanensis* utilizando agitação orbital. [Condições: 180 mg levedura; 9,4 μmol de **32**; 3 mL solução tampão ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,5–8,5); 25°C; 48 h; agitação orbital (150 rpm); (conv.: ■ - **33a-b** e ● - **34a-d**; *e.d.*: □ - **33a-b** e ○ - **34a-d**)

Observa-se na **Figura 31** que o melhor resultado de biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**) em produtos foi em pH 6,5, formando as dihidrocarvonas (**33a-b**) com conversão de 21,5% e *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 88%, e os dihidrocarveóis (**34a-d**) com conversão de 71,6% e *e.d.* de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 16%. A dihidrocarvona **33b** (1*R*,4*S*) foi formada em baixas conversões (0,5 - 2,5%), apresentando valores de *e.d.* de 40 - 77% entre pH 2,5 e 5,5. Ao usar os pH 6,5 até pH 8,5, houve a formação preferencial de **33a** (1*S*,4*S*) com valores de *e.d.* de 18 - 88%. Em pH 2,5, 3,5 e 5,5 a formação dos dihidrocarveóis (**34a-d**) não foi seletiva, e não foi possível calcular os valores de *e.d.*. Em pH 4,5, 6,5 e 7,5 ocorreu preferencialmente a formação de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) com *e.d.* variando de 16 - 24%, e em pH 8,5 observou-se a formação de **34a** (1*S*,2*S*,4*S*) com *e.d.* de 12%.

A partir dos valores de conversão e de seletividade dos produtos formados verifica-se que a biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**) com levedura *S. roraimanensis* sob agitação orbital foi dependente do pH do meio, indicando que este influenciou na atividade enzimática.

A seguir, realizou-se a biotransformação de **32** nas mesmas condições anteriores, mas sob agitação magnética. Os resultados estão apresentados na **Figura 32**.

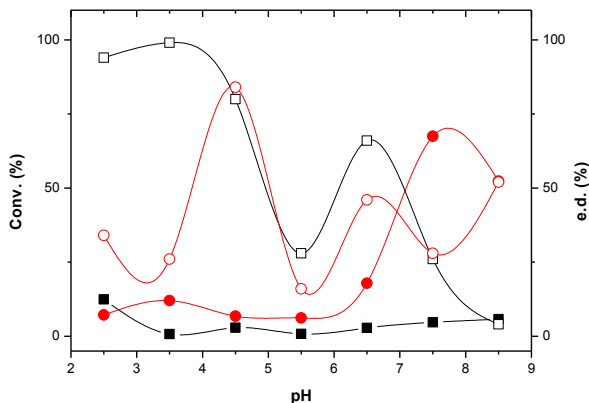


Figura 32. Efeito da variação do pH do meio reacional na biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**) com levedura *S. roraimanensis* utilizando agitação magnética. [Condições: 180 mg levedura; 9,4 μmol de **32**; 3 mL solução tampão (0,1 mol L⁻¹, pH 2,5–8,5); 25°C; 48 h; agitação magnética (150 rpm); (conv.: ■ - **33a-b** e ● - **34a-d**; e.d.: □ - **33a-b** e ○ - **34a-d**)]

Como pode ser observado, utilizando a agitação magnética os melhores resultados foram obtidos em pH 7,5 formando as dihidrocarvonas (**33a-b**) com conversão de 4,7% e e.d. de **33a** (1*S*,4*S*) de 26%, e os dihidrocarveóis (**34a-d**) com conversão de 67,7% e e.d. de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 28%.

Comparativamente aos resultados da agitação orbital, a magnética não foi muito efetiva para a conversão do substrato a produtos. Estes resultados podem ser explicados considerando a dificuldade em manter a velocidade correta da agitação neste sistema, sendo que agitações muito vigorosas podem afetar fisicamente as leveduras danificando as mesmas e diminuindo a capacidade das enzimas ali presentes em efetuar a biotransformação do substrato.^{109,110}

A partir dos resultados obtidos na biotransformação da (4*S*)-carvona com a levedura *S. roraimanensis* em diferentes valores de pH e dos dois tipos de agitação, foi selecionado o pH 6,5 e a agitação orbital para realizar os estudos subseqüentes, que se relacionam a variação da temperatura, massa de levedura e do substrato, tempo de estocagem da

levedura, reutilização e volume do meio reacional. Estes estudos visam obter os produtos com conversões e excessos diastereoisoméricos maiores.

4.1.2. Efeito da variação da temperatura

O incremento da temperatura, em geral leva a um aumento da capacidade dos biocatalisadores transformarem os substratos, uma vez que temperaturas maiores, em geral, aceleraram as colisões entre o biocatalisador e o substrato. No entanto, aumentos de temperatura podem causar a inativação das enzimas afetando o desempenho dos biocatalisadores.¹⁰ Portanto, a influência da temperatura na biotransformação de **32** foi avaliada entre 15 e 35°C, em intervalos de 5°C. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 33**.

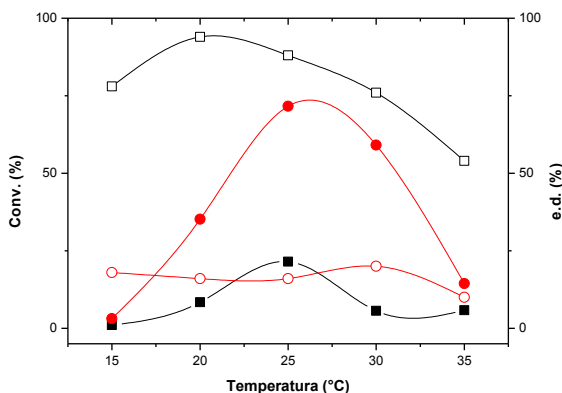


Figura 33. Efeito da variação da temperatura na biotransformação da (4*S*)-carvona com levedura *S. roraimanensis*. [Condições: 180 mg levedura; 9,4 μmol de **32**; 3 mL solução tampão (0,1 mol L⁻¹, pH 6,5); 25°C; 48 h; agitação orbital (150 rpm); (conv.: ■ - **33a-b** e ● - **34a-d**; e.d.: □ - **33a-b** e ○ - **34a-d**)]

Observa-se na **Figura 33** que a temperatura influenciou na conversão da (4*S*)-carvona em produtos. Para as dihidrocarvonas ocorreu a formação preferencial de **33a** (1*S*,4*S*) em todas as temperaturas, com valores de e.d. variando de 54 - 94%, sendo que a maior conversão obtida foi de 20% com e.d. de 88% a 25°C.

A conversão em **33b** (1*R*,4*S*) foi baixa (0,1 - 1,5%) em todas as temperaturas estudadas, sendo que o maior valor foi obtido a 25°C

(1,5%). O dihidrocarveol **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) foi obtido com conversão de 41,7 e 7,8% e *e.d.* de 16 e 10% a 25°C e a 35°C, respectivamente. Em 15, 20 e 30°C, obteve-se **34a** (1*S*,2*S*,4*S*) com conversão 1,8 - 20,5 e 35,5% e *e.d.* de 18, 16 e 20%, respectivamente.

A obtenção dos maiores valores de conversão em **33** (21,5%) e **34** (71,6%) na temperatura de 25°C, e diminuição destes a 35°C (20,2%) e 15°C (4,1%), condizem com o fato de que reações biocatalisadas são mais eficientes em temperaturas nas quais a atividade enzimática é maior. De modo análogo Silva *et al* (2013), reportaram a redução assimétrica da (4*S*)-carvona com leveduras *S. cerevisiae* em sistema aquoso, obtendo **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) com conversão de 52% e *e.d.* >99% entre 35 e 40°C, sendo que a 20 e 45°C as conversões em **34d** foram de 30% e 24%, respectivamente.⁶⁷

Baseando-se nos valores de conversão de **32** em **33** e **34**, a temperatura de 25°C foi selecionada para os estudos subsequentes.

4.1.3. Influência do tempo

Neste estudo, foi avaliada a influência do tempo na biotransformação de **32** com levedura *S. roraimanensis* em sistema aquoso e nas melhores condições já estudadas. A biotransformação foi monitorada entre 5 e 48h, no intuito de verificar se em tempos menores ocorreu preferencialmente a formação das dihidrocarvonas (**33a-b**) ou dos dihidrocarveóis (**34a-d**). Os resultados obtidos estão apresentados **Tabela 2**.

Tabela 2. Biotransformação de **32** com leveduras *S. roraimanensis* em função do tempo.

Entrada	Tempo (h)	Conv. (%) 33	<i>e.d.</i> (%) (conf.)	Conv. (%) 34	<i>e.d.</i> (%) (conf.)
1	5	4,0	>99 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	5,1	0
2	8	8,4	96 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	7,1	6 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)
3	24	15,9	92 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	33,9	2 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)
4	48	21,5	88 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	71,6	16 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)

Condições: 9,4 µmol de **32**; 180mg levedura; 3 mL tampão pH 6,5; 25°C.

Observa-se nos dados da **Tabela 2**, que as conversões em dihidrocarvonas (**33a-b**) aumentaram de 4 - 21,5% quando o tempo de reação variou de 5 - 48h, e os valores de *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) diminuíram de >99 - 88%. Os dihidrocarveóis (**34a-d**) foram obtidos com conversões de 5,1 - 71,6% entre 5 - 48h, com *e.d.* de **34a** (1*S*,2*S*,4*S*) de 6

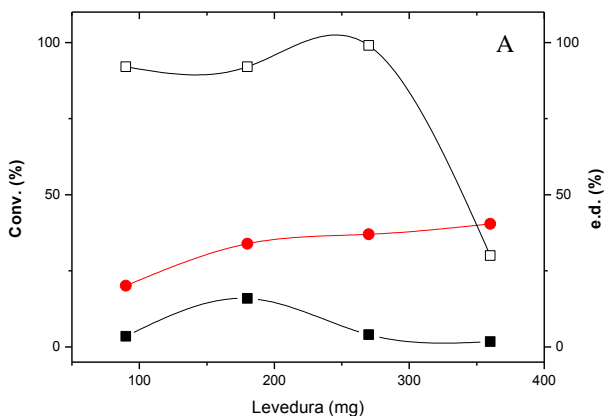
e 2% em 8 e 24h respectivamente, e *e.d.* de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 16% em 48h. Salienta-se que em 5h, as conversões em **33** e **34** foram baixas (4,0 e 5,1%, respectivamente) e não foi observada seletividade para a formação dos dihidrocarveóis (**34a-d**), não sendo possível obter valores de *e.d.*.

A partir dos resultados obtidos e apresentados na **Tabela 2**, decidiu-se monitorar a biotransformação somente em 24 e 48h nos estudos da variação da massa de levedura e do substrato.

4.1.4. Efeito da massa de levedura *Spathaspora roraimanensis* na biorredução de **32**

Além da seletividade dos produtos formados, tempo de reação e quantidade de enzimas menores são desejados quando se planeja uma futura aplicação industrial do biocatalisador. Está reportado na literatura recente que a quantidade de biocatalisador também pode influenciar a formação e seletividade dos produtos em uma reação de biotransformação.^{66,111}

Nas **Figuras 34** (A: 24h e B: 48h), estão apresentados os resultados de conversão obtidos na biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**) em função da variação da massa de levedura *S. roraimanensis*.



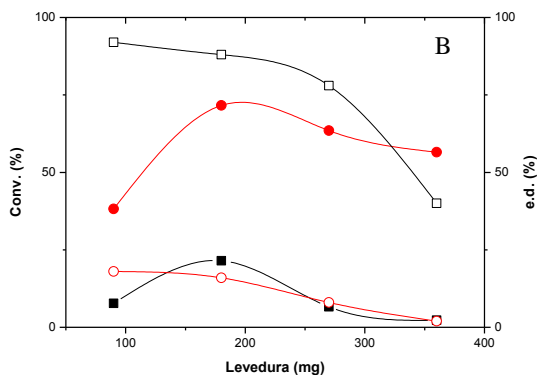


Figura 34. Valores de conversão e *e.d.* em dihidrocarvonas (**33a-b**) e dihidrocarveóis (**34a-d**) em função da massa de levedura (**A**: 24h e **B**: 48h). [Condições: 9,4 μ mol de **32**; 3 mL tampão pH 6,5; 25°C; agitação orbital (150 rpm); (conv.: ■ - **33a-b** e ● - **34a-d**; *e.d.*: □ - **33a-b** e ○ - **34a-d**)]

Em 24h de reação, observa-se que para as dihidrocarvonas (**33a-b**) a maior conversão foi de 15,9% e *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 92%, ao usar 180 mg de levedura. Utilizando quantidade de levedura menor ou maior foi verificada uma diminuição nas conversões em **33a-b**, sendo de 15,9 a 1,7%. Para os dihidrocarveóis (**34a-d**) as conversões aumentaram de 20,1 a 40,4% com o aumento da massa de levedura de 90 a 360 mg, não tendo seletividade em relação a formação preferencial de um dos produtos.

Em 48h, a maior conversão para as dihidrocarvonas (**33a-b**) foi de 21,5% e *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 88%, ao usar 180 mg da levedura. Foram observados valores menores de conversão em **33a-b** (21,5 – 2,3%) quando a massa foi menor ou maior que 180 mg. Para os dihidrocarveóis (**34a-d**), os melhores resultados foram obtidos com 180 mg de levedura, sendo a conversão de 71,6% e *e.d.* de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 16%. Ao usar massa do biocatalisador menor ou maior do que 180 mg, observou-se um decréscimo nos valores de conversão (71,6 – 38,2%).

O decréscimo nos valores de conversão do substrato a produtos com o aumento da massa de levedura em 48h de reação, condiz com estudo de *Surendhiran et al.* (2014), que utilizaram células livres de *Rhodotorula mucilaginosa* para a obtenção de biodiesel a partir de microalgas *Chlorella salina*. Foi observado um aumento na conversão a

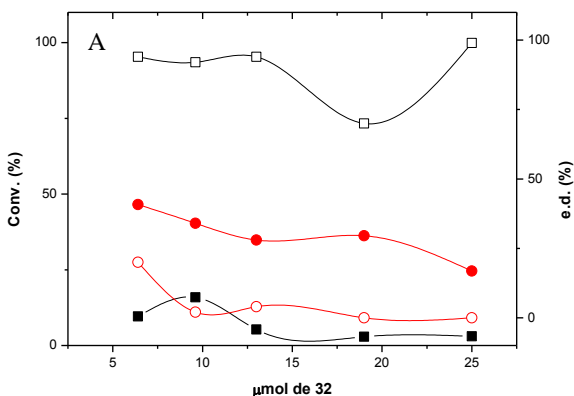
biodiesel (15 - 23%) com a massa de levedura (0,5 - 1,5 g), e posterior diminuição na conversão (23 - 17%) com quantidades maiores de levedura (1,5 - 2,5 g).

O decréscimo nos valores de conversão com o aumento da massa do biocatalisador é justificado pelos autores como sendo uma obstrução na transferência de massa, aumentando a dificuldade do biocatalisador entrar em contato com o substrato, acarretando em uma inibição por parte das próprias leveduras.¹¹¹

A partir destes resultados manteve-se à massa de 180 mg de levedura para os estudos subseqüentes, que se relacionam a massa de substrato, estocagem e reutilização da levedura.

4.1.5. Efeito da quantidade de (4S)- carvona (32)

Reações envolvendo a catálise enzimática em geral são sensíveis à presença de substratos (e solventes) orgânicos, existindo limitações para a aplicação das quantidades destes aos quais as enzimas podem ser expostas ou submetidas.²⁰ Para avaliar este efeito, variou-se a quantidade de **32** de 6,4 a 25 μmol e nas melhores condições experimentais obtidas nos outros estudos. Os valores de conversão em **33a-b** e **34a-d** em função da quantidade de **32** estão apresentados na **Figura 35** (A: 24h e B: 48h).



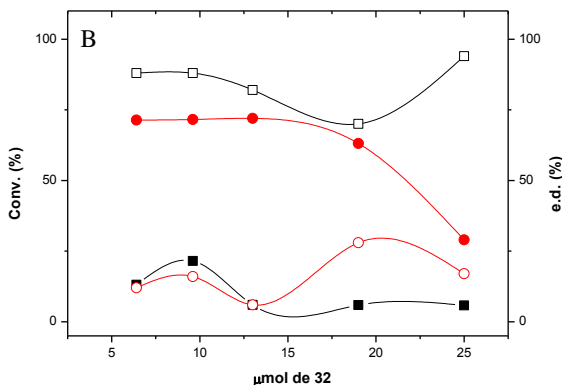


Figura 35. Valores de conversão e *e.d.* em **33a-b** e **34a-d** em função da adição da massa de substrato (**A**: 24h e **B**: 48h). [Condições: 6,4-25 μmol de **32**; 180mg de levedura; 3 mL tampão pH 6,5; agitação orbital (150 rpm); 25°C; (conv.: ■ - **33a-b** e ● - **34a-d**; *e.d.*: □ - **33a-b** e ○ - **34a-d**)]

Observa-se que em 24h a formação das dihidrocarvonas (**33a-b**) foi de 15,9% e o *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 92% ao usar 9,4 μmol de substrato. Utilizando quantidades menores ou maiores do substrato, ocorreu diminuição na formação de **33a-b** (15,9 - 2,9%). Para os dihidrocarveóis (**34a-d**) observou-se o maior valor de conversão de 40,8% e *e.d.* de **34a** (1*S*,2*S*,4*S*) de 20% com 6,4 μmol de substrato, sendo que estas decresceram (40,8 - 16,8%) em quantidades maiores do substrato (6,4 a 25 μmol).

Em 48h de reação, a maior conversão em dihidrocarvonas (**33a-b**) foi de 21,5% e *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 88% ao usar 9,4 μmol de substrato, tendo sido observados decréscimos na conversão ao usar quantidades menores ou maiores do substrato (21,5 - 5,8%). Na formação dos dihidrocarveóis (**34a-d**), a maior conversão foi de 72% e *e.d.* de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 6%, ao usar 12,8 μmol de **32**. Foram observados decréscimos (72 - 29%) ao utilizar quantidades maiores do substrato.

A diminuição nos valores de conversão de **32** em **33** (21,5 - 5,8%) e **34** (71,6 - 29,0%) com a quantidade do substrato (9,4 - 25 μmol) mostraram que uma maior quantidade do substrato inibiu a atividade das enzimas presentes na levedura influenciando na biotransformação deste a produtos. Estes resultados condizem com o

trabalho de Silva *et al* (2012) na biotransformação da (4*R*)-carvona com levedura *S. cerevisiae* em sistema aquoso, sendo observado um decréscimo na formação dos produtos de 61 a 6% com o aumento da concentração do substrato de 16,6 a 166,4 mM.⁶⁶

A quantidade de 9,4 µmol de **32** foi escolhida como sendo a mais adequada para sua biotransformação com a levedura *S. roraimanensis*, sendo esta utilizada para avaliar o efeito da estocagem e da reutilização do biocatalisador.

4.1.6. Efeito do tempo de estocagem do biocatalisador

As leveduras *S. roraimanensis* cultivadas em *D*-glicose foram colocadas em um tubo Falcon com água destilada e armazenadas na geladeira (4 - 8°C) para efetuar estudos sobre a resistência e a manutenção da capacidade de biotransformar a (4*S*)-carvona (**32**).

Na **Figura 36** estão apresentados os valores da conversão em **33** e **34** em função dos diferentes tempos de armazenamento da levedura.

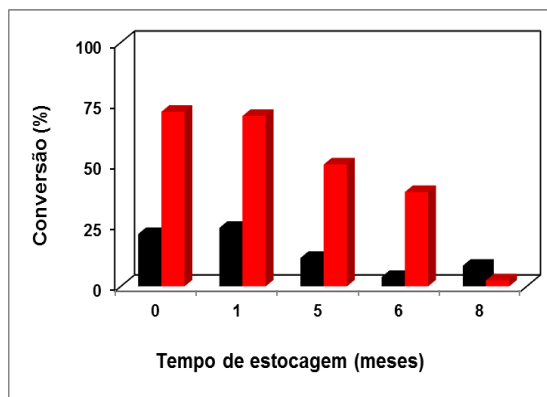


Figura 36. Valores de conversão em **33** e **34** em função do tempo de estocagem da levedura. [Condições: 9,4 µmol de **32**; 180mg de levedura; 3 mL tampão pH 6,5; 48h; 25°C; agitação orbital (150 rpm); (conv.: ■ - **33a-b** e ■ - **34a-d**)] *os valores de *e.d.* não estão apresentados na Figura.

É possível observar que após o primeiro mês de estocagem, a capacidade da levedura de biotransformar o substrato não sofreu alterações significativas. A conversão em **33** foi de 21,5% a 24% e *e.d.*

de **33a** (1*S*,4*S*) de 88 a 90%, e a conversão em **34** foi de 71,6% e 69,6% e *e.d.* de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 16 e 18%, respectivamente.

Após 5 meses de estocagem da levedura, as conversões em **33** foram de 11,7% com *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 28%, e diminuíram para 3,9% (*e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 62%) e 8,5% (*e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) >99%) em 6 e 8 meses de estocagem, respectivamente. A conversão em **34**, ao usar a levedura estocada por 5 meses foi de 50% com *e.d.* de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 6%, decrescendo para 38,7% e 2,5% com *e.d.* de **34a** (1*S*,2*S*,4*S*) de 24% após 6 e 8 meses, respectivamente.

Deve-se ressaltar que as leveduras apresentam boa resistência e capacidade de serem conservadas nas condições em que foram acondicionadas, tendo em vista que após 5 meses, estas ainda foram capazes de biotransformar 61,7% do substrato a produtos.

4.1.7. Influência da reutilização da levedura *S. roraimanensis*

As leveduras utilizadas foram lavadas três vezes com água destilada, centrifugadas e posteriormente reutilizadas na biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**). Os resultados deste estudo estão apresentados na **Figura 37**.

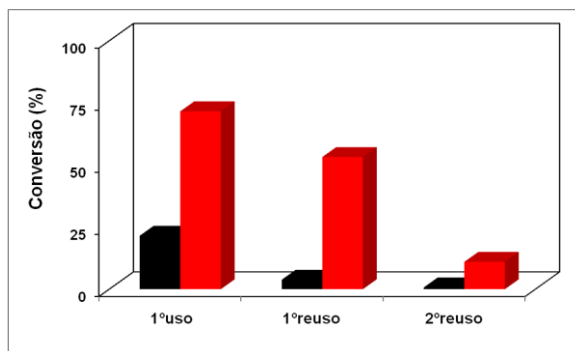


Figura 37. Conversão em **33** e **34** em função da reutilização da levedura *S. roraimanensis* na biotransformação de **32**. [Condições: 9,4 μ mol de **32**; 3 mL tampão pH 6,5; 25°C; 48h; agitação orbital (150 rpm); (■ - **33a-b**; ■ - **34a-d**)] *os valores de *e.d.* não foram apresentados na Figura.

Para fins comparativos, na **Figura 37** são também apresentados os valores de conversão em **33** e **34** da primeira utilização da levedura nas mesmas condições da reutilização. Observaram-se decréscimos nas

porcentagens da formação das dihidrocarvonas (**33a-b**), diminuindo de 21,5% na primeira utilização para 3,8% no primeiro reuso e para 0,7% no segundo. Os valores de *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) foram de 88, 25 e 53%, respectivamente. Para os dihidrocarveóis (**34a-d**) a porcentagem de formação diminuiu de 71,5% (*e.d.* de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 16%) da primeira utilização para 53,2% (*e.d.* igual a zero) no primeiro reuso, e 11% (*e.d.* de **34c** (1*S*,2*R*,4*S*) de 34%) no segundo reuso.

Notou-se um decréscimo na porcentagem de conversão de **32** em **33** e **34** de 93,1 - 57% da primeira utilização para a primeira reutilização, e de 11,7% na segunda reutilização.

O decréscimo na capacidade das enzimas presentes na levedura em biotransformar o substrato ocorreu, provavelmente, pela diminuição da atividade destas, que é possivelmente causado pelo tempo de exposição ao substrato e aos produtos e pela agitação mecânica excessiva ao qual foram submetidas durante a centrifugação. Porém, foi verificada a capacidade de biotransformação de **32** após a primeira reutilização, e este resultado sugere que esta levedura poderá ser imobilizada em algum suporte polimérico (ex.: alginato de cálcio), visando manter sua atividade.

4.1.8. Influência do tempo na biotransformação de **32** com *S. roraimanensis* cultivada em *D*-xilose

Na perspectiva de verificar se o meio no qual as leveduras foram cultivadas influencia na capacidade de conversão e seletividade dos produtos formados na biotransformação de **32**, as melhores condições obtidas nos estudos com a *S. roraimanensis* cultivada em *D*-glicose, foram estendidas para esta levedura cultivada em *D*-xilose. Os resultados das conversões e *e.d.* em **33** e **34** estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Conversão em **33** e **34** com a levedura cultivada em *D*-xilose.

Entrada	Tempo (h)	Conv. (%)	<i>e.d.</i> (%) (conf.)	Conv. (%)	<i>e.d.</i> (%)
		33		34	(conf.)
1	5	6	>99 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	2,2	0
2	8	13	>99 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	5,3	0
3	24	10	>99 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	50,4	0
4	48	8,2	78 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	87,1	42 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
5	60	1	77 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	98,7	44 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)

[Condições: 9,4 µmol de (4*S*)-carvona; 180 mg de levedura; 3 mL tampão pH 6,5; agitação orbital (150 rpm); 25°C]

Observa-se na **Tabela 3** que os valores de conversão em dihidrocarvonas (**33**) foram de 6, 13 e 10% com *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de >99% em 5, 8 e 24h respectivamente, e diminuindo para 8,2% e *e.d.* de **33b** de 78% em 48h, e 1% com *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 77% em 60h. Para os dihidrocarveóis (**34**), observaram-se conversões de 2,2 - 5,3 e 50,4% em 5, 8 e 24h, respectivamente com valores de *e.d.* igual a zero. Em 48h e 60h, as conversões em **34** foram de 87,1 e 98,7% e *e.d.* de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 42 e 44%, respectivamente. Ressalta-se que a biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**), foi acompanhada até 60h apenas com a levedura *S. roraimanensis* cultivada em *D*-xilose.

Destaca-se que as conversões em **33** aumentaram até 8h (6 - 13%) e diminuíram (10 - 8,2%) em 24 e 48h, respectivamente. As conversões em **34** aumentaram gradativamente de 2,2 a 87,1% entre 5 e 48h. No mesmo estudo utilizando à levedura cultivada em *D*-glicose, a conversão em **33** e em **34** aumentaram gradativamente de 4 - 21,5% e 5,1 a 71,6%, respectivamente entre 5 e 48h (**Tabela 2**).

Estes resultados mostram que a levedura cultivada em *D*-xilose atuou na redução tanto da ligação dupla C=C quanto na C=O em uma velocidade maior do que a levedura cultivada em *D*-glicose em até 48h de reação, formando **34** em maiores conversões.

4.1.9. Biotransformação de **32** em escala maior do sistema reacional

Sempre que são efetuadas transformações químicas é desejável avaliar em qual escala reacional estas são mais efetivas, tanto pela quantidade de resíduos gerados, pela eficiência de aproveitamento dos reagentes e também pela facilidade de recuperação dos produtos do meio reacional. De maneira particular, em processos biocatalisados estes fatores são relevantes para diminuir o custo reacional e apresentar uma viabilidade econômica em serem, por exemplo, incorporados na indústria química.

Na perspectiva de realizar a biotransformação de **32** em escalas maiores, aumentou-se o sistema reacional na proporção de 10 vezes, baseando-se nas melhores condições reacionais obtidas. Os estudos foram realizados com a levedura *S. roraimanensis* cultivada tanto em *D*-glicose como em *D*-xilose em 5 e 48h de reação. Os resultados destes estudos estão apresentados nas **Tabelas 4 e 5**.

Tabela 4. Biotransformação de **32** com levedura *S. roraimanensis* cultivada em *D*-glicose em função do tempo.^(a)

Entrada	Tempo (h)	Conv. (%)	<i>e.d.</i> (%)	Conv. (%)	<i>e.d.</i> (%) (conf.)
		33	(conf.)	34	
1	5	0,7	>99 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	2,2	28 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)
2	8	1,4	>99 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	2,4	0
3	24	0,7	60 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	11,1	0
4	48	11,9	92 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	15,4	70 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)

(a) Condições: 94 μ mol de **32**; 1,8g de levedura; 30 mL tampão pH 6,5; 25°C.

Observa-se na **Tabela 4** que a conversão em **33** foi de 0,7 e 1,4% com *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) >99% em 5 e 8h de reação (entradas 1 e 2, respectivamente). Em 24h a conversão decresceu para 0,7% (*e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 60%) e aumentou em 48h para 11,9% (*e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) de 92%) (entradas 3 e 4, respectivamente). A conversão em **34** foi de 2,2% com *e.d.* de **34b** (1*R*,2*S*,4*S*) de 28% em 5h (entrada 1), aumentando para 2,4% e 11,1% com *e.d.* igual a zero em 8h e 24h, respectivamente (entradas 2 e 3). Em 48h a conversão em **34** foi de 15,4% com *e.d.* de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) de 70% (entrada 4).

O aumento na escala do sistema reacional com a levedura cultivada em *D*-glicose levou a um decréscimo na conversão total do substrato em produtos de 93,1 para 27,3%, quando o volume da reação aumentou de 3 para 30 mL.

A seguir, foi realizada a biotransformação de **32** em 30 mL com a levedura cultivada em *D*-xilose. Os resultados estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Biotransformação de **32** com levedura *S. roraimanensis* cultivada em *D*-xilose em função do tempo.^(a)

Entrada	Tempo (h)	Conv. (%)	<i>e.d.</i> (%) (conf.)	Conv. (%)	<i>e.d.</i> (%) (conf.)
		33		34	
1	5	0,2	>99 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	2,3	68 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)
2	8	0,6	>99 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	2,6	64 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)
3	24	0,1	60 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	14,5	60 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)
4	48	0,2	92 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	24,8	40 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)

(a) Condições: 94 μ mol de **32**; 1,8g de levedura; 30 mL tampão pH 6,5; 25°C.

Observa-se na **Tabela 5**, que ao aumentar o volume reacional as conversões em **33** foram baixas entre 0,1 e 0,6% com *e.d.* de **33a** (1*S*,4*S*) entre 60 e >99%. Os baixos valores de conversão em **33** indicam que ocorreu simultaneamente a hidrogenação das ligações duplas C=C e

C=O com a formação de **34**. A conversão em **34** aumentou de 2,3 - 24,8% e o *e.d.* para **34b** (1*R*,2*S*,4*S*) decresceu de 68 - 40% entre 5 e 48h.

Comparando com o estudo efetuado em 3 mL (**Tabela 3**), ocorreu um decréscimo na conversão total do substrato a produtos de 95,3 para 25% em 48h de reação. Também foi observada a mudança na seletividade do produto majoritário, passando de **34d** (1*R*,2*R*,4*S*) com *e.d.* de 42% para **34b** (1*R*,2*S*,4*S*) com *e.d.* de 40%, em volumes de 3 e 30 mL, respectivamente.

Apesar de a relação entre a massa de substrato e da levedura (S/L) ser a mesma, o aumento do volume pode acarretar em uma menor homogeneização efetiva do meio reacional, dificultando a interação da levedura com o substrato e diminuindo a conversão deste em produtos.

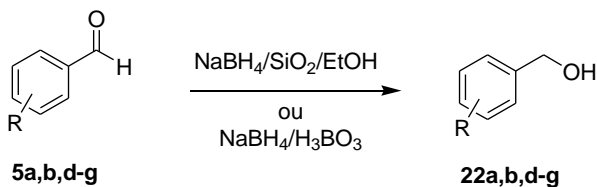
Pode-se concluir que a biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**) com a levedura *S. roraimanensis* não foi seletiva, formando as dihidrocarvonas (**33a,b**) e os dihidrocarveóis (**34a-d**). Os melhores resultados foram obtidos em pH=6,5, 25 °C, em volume de 3 mL e agitação orbital.

4.2. PREPARAÇÃO DOS ÁLCOOIS **22a,b,d-g** E **23a,e-g,j** VIA REDUÇÃO DE **5a,b,d-g** E **30a,e-g,j,k** COM BORO-HIDRETO DE SÓDIO (NaBH₄)

Foram preparados os álcoois **22a,b,d-g** e **23a,e-g,j,k**, pela redução com NaBH₄ dos aldeídos **5a,b,d-g** e das acetonas **30a,e-g,j,k**, respectivamente. Os álcoois preparados foram devidamente identificados e caracterizados pelas técnicas de RMN de ¹H e de IV, servindo de padrões para as análises de cromatografia gasosa das reações de biotransformação.

4.2.1. Preparação dos álcoois **22a,b,d-g** com NaBH₄

Os álcoois **22a,b,d-g** foram preparados através da redução dos aldeídos **5a,b,d-g** utilizando dois métodos com NaBH₄ como agente redutor, um utilizando SiO₂, etanol e agitação magnética (a), e outro utilizando H₃BO₃ e maceração (b), conforme **Esquema 5**



R: **a**=H; **b**= 4-OCH₃; **d**=4-CH₃; **e**=4-NO₂; **f**=2-NO₂ e **g**=3-NO₂

Esquema 5. Preparação dos alcoóis **22a,b,d-g** através da redução dos correspondentes aldeídos **5a,b,d-g** com NaBH₄.

Os dados referentes a obtenção dos álcoois **22a,b,d-g** com as duas técnicas de redução utilizadas estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Rendimentos e tempos de reação para a preparação dos derivados **22a,b,d-g** com os dois métodos.

Álcool	R	Rend. (%) (tempo) ^(a)	Rend. (%) (tempo) ^(b)	Aspecto	R _f ^(c)
22a	H	18 / (10 min)	47 (2min)	Líquido incolor	0,40
22b	4-OCH ₃	34 (120 min)	37 (60 min)	Líquido incolor	0,39
22d	4-CH ₃	25 (20 min)	84 (3min)	Sólido incolor (P.F.: 59-61)	0,51
22e	4-NO ₂	11 (20 min)	55 (20 min)	Sólido amarelo (P.F.: 88-90°C)	0,32
22f	2-NO ₂	63 (10 min)	67 (5 min)	Sólido marrom (P.F.: 57-58°C)	0,36
22g	3-NO ₂	43 (15 min)	76 (5 min)	Líquido amarelo	0,29

(a) 1 g de substrato, 0,6 g de NaBH₄, 1 g de SiO₂, 20 mL etanol absoluto, agitação magnética.

(b) Quantidades equimolares de substrato, de NaBH₄ e H₃BO₃, maceração.

(c) Eluente: *n*-hexano/acetato de etila (7/3)

Observa-se pelos dados apresentados na **Tabela 6** que utilizando o método da maceração (b) os rendimentos obtidos foram entre 37 - 84%, sendo estes valores maiores que os obtidos (11 - 63%) com o método (a). Além dos rendimentos serem maiores, destaca-se que os tempos de reação usados na técnica de maceração foram menores com todos os substratos.

Os pontos de fusão obtidos para os compostos sólidos **22d**, **22e** e **22f**, são compatíveis aos dos mesmos compostos comercialmente disponíveis.¹¹²

Nas **Figuras 38, 39 e 40**, estão apresentados respectivamente, os espectros de RMN de ^1H e de IV e a sobreposição dos cromatogramas das análises de CG-quiral de **22a**.

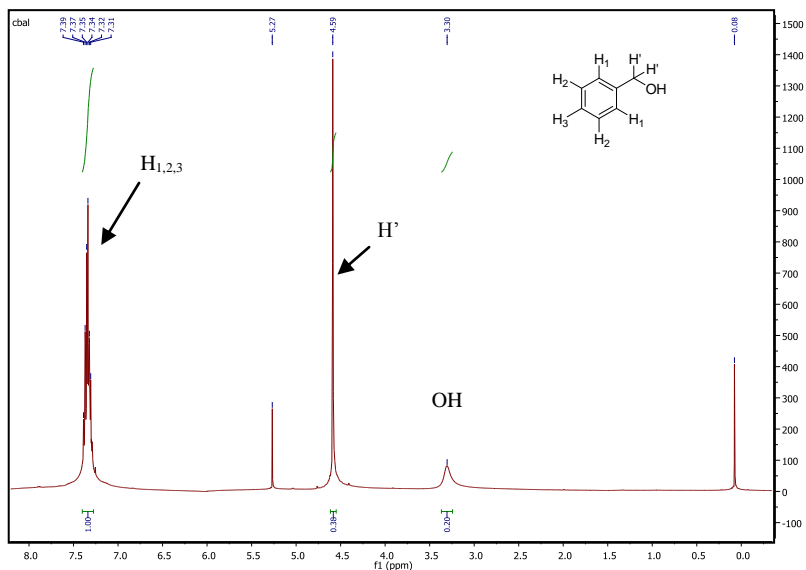


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H do álcool **22a**. [CDCl_3 ; 400MHz]

A partir do espectro de RMN de ^1H de **22a**, observa-se o pico característico da formação do álcool (singleto em 4,59 ppm correspondente aos dois H'). Além disso, destaca-se o multiplete entre 7,31 e 7,39 ppm correspondente aos H_{1-3} do anel aromático e o singleto em 3,30 ppm atribuído ao H da ligação O-H do álcool. Observa-se ainda o pico em 5,27 ppm, que é correspondente ao diclorometano não evaporado totalmente antes de efetuar as análises.

Para complementar a caracterização do produto **22a** na **Figura 39** é apresentada a análise de infravermelho (IV), onde destaca-se a banda em 3338 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação O-H do álcool formado. As bandas de menor intensidade em torno de 3030 cm^{-1} são referentes à deformação axial das ligações C-H do anel aromático e em torno de 2871 cm^{-1} as bandas de estiramento das ligações C-H do grupo metileno. Ainda pode-se destacar a ausência da banda referente a carbonila do aldeído de partida. Estes dados são concordantes com os relatados na literatura.¹¹³

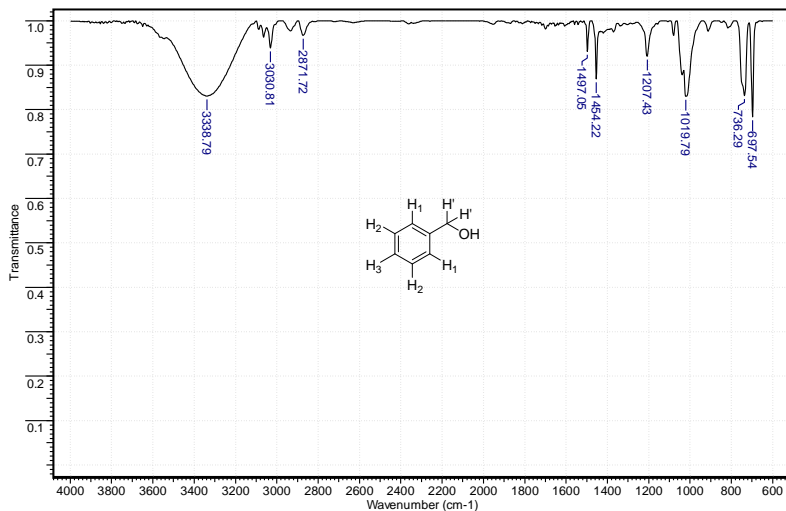


Figura 39. Espectro de IV de **22a**. [Filme sobre cela de ZnSe]

A seguir é apresentada a sobreposição dos cromatogramas de CG-quiral para benzaldeído (**5a**) e do álcool **22a** obtido através da redução de **5a** por maceração.

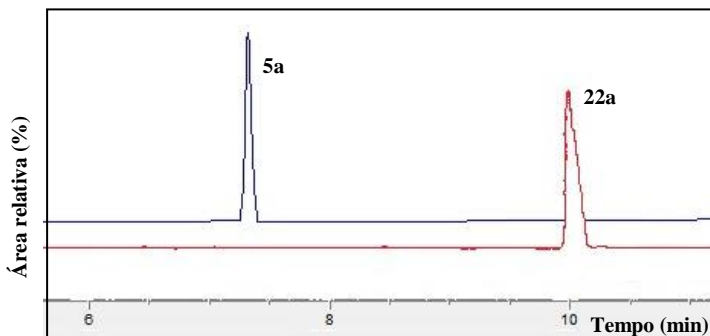


Figura 40. Sobreposição dos cromatogramas de **5a** e de **22a** (B). [Condições de programação para as análises de CG-quiral: descritas no item 3.3.6, página 36]

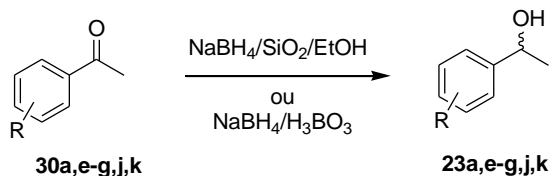
Pelo cromatogramas apresentados na **Figura 40**, observa-se o tempo de retenção para benzaldeído (**5a**) de 7,4 min e para o correspondente álcool (**22a**) de 10,1 min. Destaca-se a presença somente

do pico de **22a** na análise do produto das reações de redução, demonstrando que ocorreu a total redução de **5a** utilizando NaBH₄. Estas análises foram utilizadas posteriormente para acompanhar a formação ou não dos produtos da biotransformação de **5a**.

Os espectros de RMN de ¹H, IV e os cromatogramas para os álcoois **22b,d-g** estão apresentados no Anexo.

4.2.2. Preparação dos álcoois **23a,e-g,j,k** com NaBH₄

Os álcoois **23a,e-g,j,k** também foram preparados utilizando os dois métodos de redução com NaBH₄, conforme apresentado no **Esquema 6**.



R: **a**=H; **e**=4-CH₃; **f**= 4-OCH₃; **g**=4-NO₂; **j**=2-NO₂ e **k**=3-NO₂

Esquema 6. Preparação dos álcoois **23a,e-g,j,k** através da redução das correspondentes cetonas **30a,e-g,j,k** com NaBH₄.

Os dados referentes ao rendimento e tempo de reação da preparação de **23a,e-g,j,k** estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Rendimentos e tempos de reação da preparação de **23a,e-g,j,k** pelos dois métodos utilizados.

Álcool	R	Rend. (%) (tempo) ^(a)	Rend. (%) (tempo) ^(b)	Aspecto	R _f ^(c)
23a	H	69 (35min)	80 (75min)	Líquido incolor	0,37
23e	CH ₃	51 (10min)	67 (50min)	Líquido incolor	0,53
23f	OCH ₃	35 (120min)	58 (20min)	Líquido incolor	0,36
23g	4-NO ₂	52 (30min)	68 (10min)	Líquido amarelo	0,37
23j	2- NO ₂	50 (3 min)	74 (2 min)	Líquido amarelo	0,34
23k	3- NO ₂	46 (10 min)	70 (5 min)	Sólido branco (P.F.: 55-57°C)	0,36

(a) 1 g de substrato, 0,6 g de NaBH₄, 1 g de SiO₂, 20 mL etanol absoluto, agitação magnética.

(b) Quantidades equimolares de substrato, de NaBH₄ e H₃BO₃, maceração.

(c) Eluente: *n*-hexano/acetato de etila (7/3)

Os rendimentos utilizando a técnica de redução com maceração (b) foram 58 – 80%, sendo maiores que os obtidos pelo outro método (a) (35 – 69%). Na redução pelo método da maceração, os álcoois **23g**, **23j** e **23k** com a presença do grupo retirador nitro (NO₂) em diferentes posições, foram obtidos em tempos de reação menores (2-10min). Comparando os dois métodos, observou-se que a maior diferença tanto em rendimento quanto no tempo da reação foi verificado para a redução de **30f**, que contém um grupo doador (OCH₃). O rendimento em **23f** passou de 35 para 58% e o tempo da reação de 120 min para 20 min, utilizando a maceração. Na redução de **30a** e **30e**, os tempos de reação foram maiores utilizando a maceração.

A partir dos dados referentes aos rendimentos e aos tempos de reação para cada um dos métodos utilizados, é possível afirmar que para a série de compostos utilizados, tanto os derivados do benzaldeído como os da acetofenona, o método de redução com NaBH₄/H₃BO₃ mostrou-se mais eficiente. Esta eficiência pode ser considerada tanto pelos rendimentos maiores, bem como pelos tempos menores de reação em geral, e uma economia de solvente.

Nas **Figuras 41**, **42** e **43** estão apresentados a sobreposição dos cromatogramas das análises de CG-quiral e os espectros das análises de RMN de ¹H e IV, respectivamente, da preparação de **23e** a partir da redução de **30e** com NaBH₄.

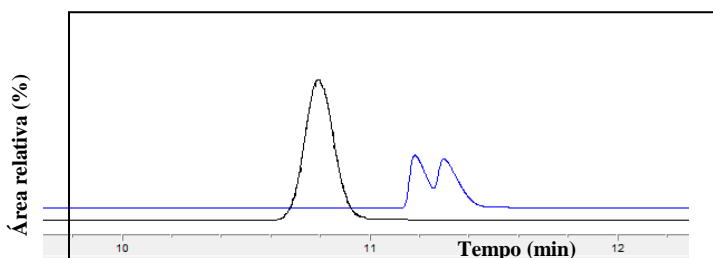


Figura 41. Sobreposição dos cromatogramas das análises de CG-quiral de **30e** (preto) e de **23e** (azul).

Pela sobreposição dos cromatogramas das análises de CG-quiral apresentados na **Figura 41**, observou-se a formação da mistura racêmica do álcool (**23e**), com tempos de retenção de 11,2 e 11,35 min. Ressalta-

se que o substrato **30e**, com tempo de retenção de 10,8 min, não é observado na análise do produto, mostrando que apesar de não ser seletiva a redução com NaBH₄ foi efetiva. A formação da mistura racêmica foi evidenciada nas análises de CG-quiral de todos os derivados da acetofenona reduzidos com NaBH₄.

Na **Figura 42** é apresentado o espectro de RMN¹H de **23e**.

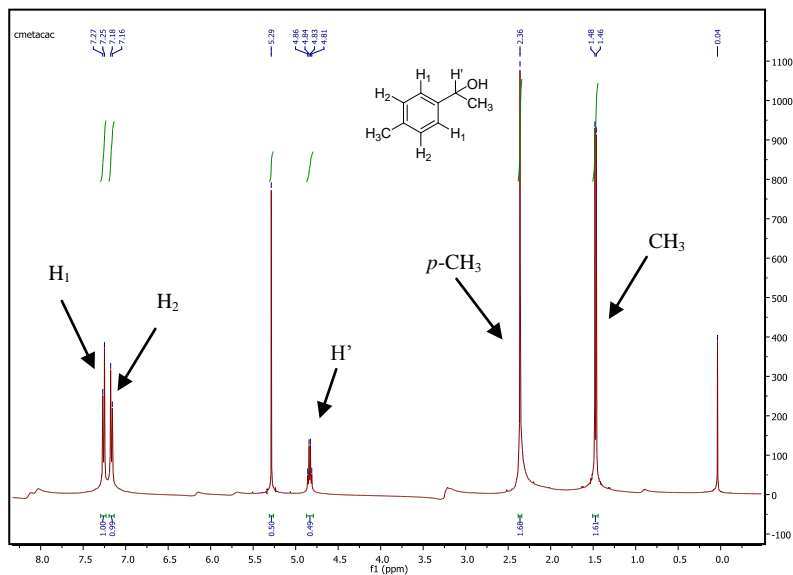


Figura 42. Espectro de RMN de ¹H do álcool **23e**. [CDCl₃; 400MHz]

No espectro de RMN¹H apresentado na **Figura 42**, pode-se destacar o dublete entre 7,25 e 7,27 ppm referente aos H₁ e o dublete entre 7,16 e 7,18 ppm referente aos H₂ do anel aromático. O singlete em 2,36 ppm é referente ao grupo metila ligado na posição *para* do anel. O quarteto entre 4,81 e 4,85 ppm é referente ao H' e o dublete entre 1,46 e 1,48 ppm é referente a metila ligada no mesmo carbono do grupo O-H. Destaca-se o singlete em 5,29 ppm referente a presença de diclorometano na amostra.

A seguir é apresentado o espectro de IV de **23e**.

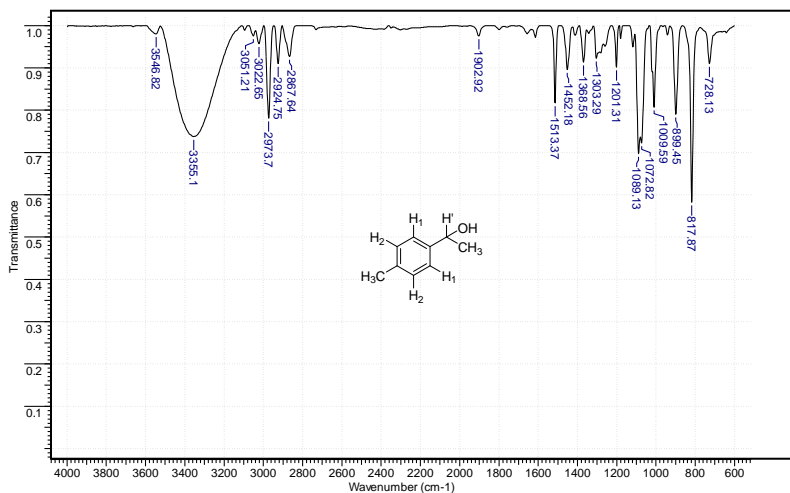


Figura 43. Espectro de IV de **23e**. [Filme sobre cela de ZnSe]

No espectro de IV destaca-se a banda em 3355 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação O-H do álcool. As bandas de menor intensidade entre 3051 e 3022 cm^{-1} são referentes à deformação axial das ligações C-H do anel aromático e entre 2924 e 2867 cm^{-1} aos estiramentos das ligações C-H do grupo metila. A banda de maior intensidade em 2973 cm^{-1} é referente à deformação axial das ligações C-H da metila ligada ao anel aromático. Também destaca-se a ausência da banda da carbonila da cetona de partida (**30e**).

Os cromatogramas de CG-quiral e os espectros de RMN de ^1H e de IV para os álcoois **23a,f-g,j,k** estão apresentados no Anexo.

4.3. BIOTRANSFORMAÇÕES MEDIADAS COM LEVEDURA *S. CEREVISIAE*

As reações de biotransformação com as levedura *S. cerevisiae* presentes no fermento de pão comercial (**FP**) foram iniciadas utilizando o benzaldeído (**5a**) e alguns de seus derivados (**5b,d-g**) e posteriormente a acetofenona e derivados (**30a,e-g,j,l**). Estas reações foram realizadas em sistema bifásico (**SB**), com condições experimentais iniciais adaptadas de trabalhos disponíveis na literatura.¹⁰⁷

4.3.1. Biotransformação de 5a,b,d-g com FP da marca Fleischmann

Os estudos de biotransformação do benzaldeído (**5a**) e de seus derivados (**5b,d-g**) foram efetuados utilizando o fermento de pão comercial da marca Fleischmann, sendo avaliados a influência do grupo substituinte e a concentração de substrato.

4.3.1.1. Influência do grupo substituinte

No primeiro estudo realizado com a levedura *S. cerevisiae*, foi avaliada a influência dos grupos substituintes na biotransformação de **5a,b,d-g** com FP em SB. Os resultados deste estudo são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Biotransformação do benzaldeído e derivados (**5a,b,d-g**) com FP.^(a)

Produto	R	Conversão (%)				
		15 min	30 min	45 min	1h	2h
22a	H	62	91	100	-	-
22b	4-OCH ₃	12	48	82	90	100
22d	4-CH ₃	14	51	84	95	100
22e	4-NO ₂	85	100	-	-	-
22f	2-NO ₂	92	100	-	-	-
22g	3-NO ₂	78	100	-	-	-

(a) 4 g FP, 0,5 mmol de **5a,b,d-g**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C.

Pode-se observar que utilizando o grupo nitro (NO₂), que é um grupo retirador de elétrons, como substituinte em diferentes posições nos substratos **5e-g**, os correspondentes alcoóis (**22e-f**) foram obtidos com 100% de conversão em 30 min de biotransformação. Utilizando como substituintes os grupos metóxi (OCH₃) e metila (CH₃), grupos doadores de elétrons na posição *para* da carbonila, foram necessárias 2 h para a conversão total dos aldeídos **5b** e **5d** nos alcoóis **22b** e **22d**. A biotransformação total do benzaldeído (**5a**) em seu correspondente álcool (**22a**) ocorreu em 45 min, nas condições experimentais utilizadas.

Os resultados indicaram que a presença do grupo retirador de elétrons (NO₂) facilitou a biotransformação dos substratos, não sendo observada grande influência da posição deste em relação a carbonila. A presença dos grupos doadores de elétrons (OCH₃ e CH₃), em geral,

deixa o carbono do grupo carbonílico menos eletrofílico, aumentando o tempo necessário para a biorredução dos substratos **5b** e **5d** com **FP**.

Na **Figura 44** é apresentada a sobreposição dos cromatogramas da análise de CG de **5a**, **22a** e de uma alíquota da biotransformação de **5a** com **FP**. Os cromatogramas obtidos na biotransformação dos demais substratos estão apresentados no Anexo A.

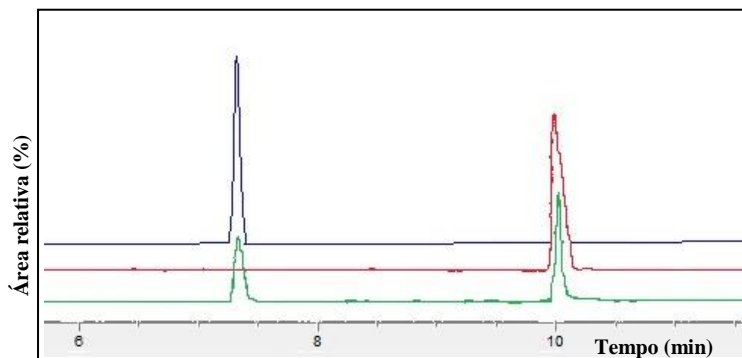


Figura 44. Sobreposição dos cromatogramas de **5a** (azul), **22a** (vermelho) e alíquota da biotransformação de **5a** com **FP** (verde).

Utilizando o 1-octanol como solvente extrator na técnica de microextração para acompanhar a biotransformação de **5a,b,d-g** com **FP**, os resultados encontrados nas análise de CG-quiral foram iguais aos da utilização da extração líquido-líquido tradicional com diclorometano. Estes resultados permitem confiar na técnica de microextração, gerando uma grande economia no solvente utilizado para acompanhar a biotransformação destes substratos.

A partir dos resultados obtidos escolheu-se o benzaldeído (**5a**) e posteriormente o 4-nitrobenzaldeído (**5e**) para verificar a influência da concentração do substrato na conversão ao produto.

4.3.1.2. *Influência da quantidade do substrato*

A quantidade de substrato pode influenciar na capacidade das enzimas em biotransformá-lo, sendo assim foi investigado como a quantidade de benzaldeído (**5a**) influencia na formação do produto. Primeiramente variou-se a quantidade de **5a** de 0,3 – 0,8 mmol,

acompanhando a reação com no **FP** entre 15 e 45 min. Os resultados estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Variação da quantidade de **5a** na biotransformação com **FP**.^a

5a [mmol]	Conversão em 22a (%)		
	15 min	30 min	45 min
0,3	95	100	-
0,4	74	100	-
0,5	64	95	100
0,6	50	91	100
0,7	40	75	95
0,8	26	48	80

(a) 4 g **FP**, 0,3 – 0,8 mmol de **5a**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C.

Observou-se que utilizando 0,3 e 0,4 mmol de **5a**, este é biotransformado totalmente em produto (**22a**) em 30 min de reação. Com 0,5 e 0,6 mmol o tempo para a reação total foi de 45 min, e utilizando 0,7 e 0,8 mmol de **5a**, a conversão em **22a** foi de 95 e 80% em 45 min, respectivamente.

Considerando estes resultados, e principalmente o tempo curto no qual ocorreu a biotransformação de **5a**, investigou-se a influência da quantidade deste entre 1 e 10 mmol entre 30 min e 1,5h de reação. Os resultados deste estudo estão apresentados na **Figura 45**.

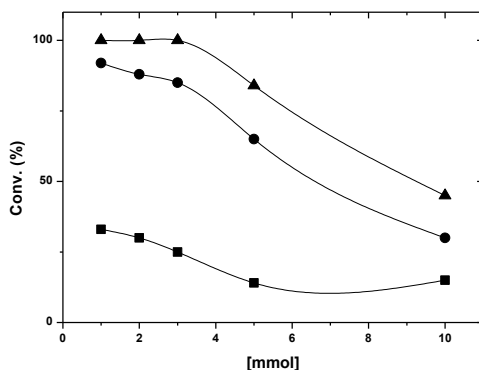


Figura 45. Variação da quantidade de **5a** entre 1-10 mmol. [4 g **FP**, 1 – 10 mmol de **5a**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C][conv.: ■- 30 min; ●- 1,0 h e ▲- 1,5 h]

Observa-se na **Figura 45** que utilizando entre 1-3 mmol de **5a**, este é biotransformado totalmente em **22a** em 1,5 h de reação. No mesmo tempo, com 5 e 10 mmol, os valores de conversão decresceram para 84 e 45%, respectivamente. O decréscimo nestes valores com o incremento da concentração de **5a** demonstram que ocorre a saturação da capacidade das enzimas presentes no **FP** em biotransformar o mesmo.

No intuito de também verificar a influência da quantidade do substrato e posteriormente isolar o produto do meio reacional, realizou-se a biotransformação de **5e** variando de 1 e 5 mmol. Este substrato foi escolhido pela facilidade que forma o seu correspondente álcool (**22e**) na biotransformação com **FP**, e **22e** ser sólido. Os resultados deste estudo estão apresentados na **Figura 46**.

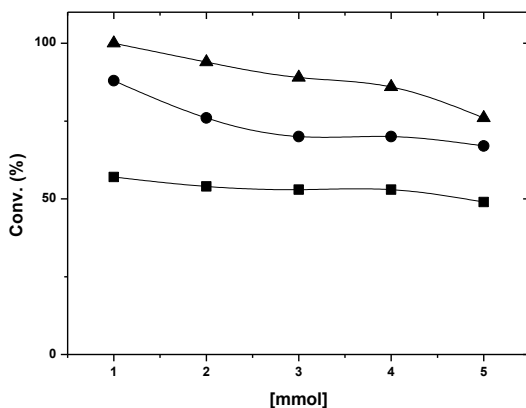


Figura 46. Efeito da variação da quantidade de **5e** na biotransformação com **FP**. [4 g **FP**, 1 – 5 mmol de **5e**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C] [conv.: ■- 30 min; ●- 1,0 h e ▲- 1,5 h]

Observa-se que em 1,5 h de reação, a conversão em **22e** decresceu de 100 para 76% a medida que a quantidade de substrato aumentou de 1 a 5 mmol. Ressalta-se que utilizando até 4 mmol de **5e**, este foi convertido totalmente em **22e** em 2 h e com 5 mmol a conversão foi de 81%, também em 2 h (dados não apresentados na **Figura 46**). O decréscimo na conversão em **22e** pode ser atribuído aos possíveis efeitos tóxicos da concentração do substrato e/ou produto sobre as enzimas presentes no **FP**, bem como a dificuldade de solubilização do substrato no sistema bifásico.

A partir da reação realizada utilizando 4 mmol de **5e**, foram isolados 0,33g de **22e**, com um rendimento de 54%. A diferença entre o valor de conversão a produto e o rendimento, é explicada pela formação de emulsão e conseqüentes perdas durante a extração do produto do sistema reacional por extração líquido-líquido, que são inerentes ao procedimento experimental.

4.3.2. Biotransformação da acetofenona e derivados (**30a,e-g,j,k**) com FP

Os estudos da biotransformação da acetofenona e de seus derivados **30a,e-g,j,k**, também foi iniciada utilizando o fermento de pão comercial da marca Fleischmann. Nestes estudos, foram avaliadas a influência do tempo, do grupo substituinte, massa do substrato e do biocatalisador, temperatura e pH. Posteriormente, foi avaliada a utilização de FP de diferentes marcas, a porcentagem do volume da fase aquosa e a adição de aditivos.

4.3.2.1. Influência do tempo e do grupo substituinte

A acetofenona e seus derivados substituídos **30a,e-g,j,k**, possuem como característica a presença de um centro pró-quiral no carbono carbonílico, permitindo a formação de dois produtos através da redução da carbonila ao álcool. A biotransformação destes substratos foi iniciada verificando a influência do grupo substituinte, e para uma melhor elucidação, as reações foram acompanhadas em 2, 5, 8, 24 e 48 h (**Tabela 10**).

Tabela 10. Biotransformação de **30a,e-g,j,k** com FP em SB.^a

Produto	R	Conversão (%)				
		2h	5h	8h	24h	48h
23a	H	2	5	12	31	41
23e	4-CH₃	0,5	2	4	12	21
23f	4-OCH₃	0	0	1	5	11
23g	4-NO₂	15	35	60	70	88
23j	2-NO₂	10	23	40	73	86
23k	3-NO₂	10	32	54	68	80

(a) 4 g FP, 0,5 mmol dos derivados da acetofenona, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C.

Observa-se que as conversões aos produtos **23a,e-g,j,k** foram entre 11 e 88% em 48h de reação. Para os produtos **23e** e **23f**, com grupos doadores de elétrons metila (CH₃) e metóxi (OCH₃), as conversões foram baixas, sendo de 21 e 11%, respectivamente. Para a acetofenona (**30a**), a conversão em produto em 48h foi de 41%, um valor considerado intermediário. Os álcoois **23g**, **23j** e **23k**, com o grupo retirador de elétrons (NO₂) nas posições *para*, *meta* e *orto* da carbonila, as conversões em 48h de reação foram de 88, 86 e 80%, respectivamente.

Com exceção de **23j**, com o grupo NO₂ na posição *orto*, onde foi observada a formação da mistura racêmica dos alcoóis nas configurações *S* e *R*, todos os demais produtos, **23a**, **23e**, **23f**, **23g** e **23k**, foram obtidos apenas em uma configuração.

Os resultados evidenciaram uma relação entre a identidade do grupo substituinte e os valores de conversão em produtos. Também notou-se que a posição do substituinte em relação a carbonila pode acarretar na perda da seletividade do produto de biotransformação, como observado na redução de **30j**.

Na **Figura 47**, está apresentada a sobreposição dos cromatogramas das análises de CG-quiral para o substrato **30a**, dos alcoóis *R* e *S* (**23a**) obtidos *via* redução com NaBH₄ e de uma alíquota do meio reacional da biotransformação de **30a** com **FP**.

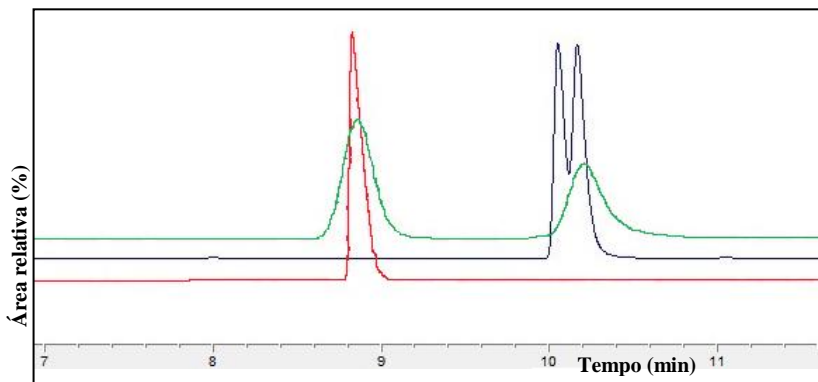


Figura 47. Cromatogramas de **30a** (vermelho), alcoóis *R* e *S*-**23a** (preto) e alíquota da biotransformação de **30a** com **FP** (verde).

Pode-se observar pela sobreposição dos cromatogramas que a biotransformação de **30a** com **FP** forma somente **23a** em uma das

configurações. O mesmo foi observado para os demais substratos nas quais houve seletividade (Cromatogramas apresentados no Anexo).

Para complementar as informações a respeito da formação seletiva dos alcoóis, foram realizadas análises de polarimetria para identificar pelo ângulo de rotação óptica obtido a configuração dos produtos formados. Os valores de rotação óptica estão apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Medidas de rotação óptica efetuadas com amostras obtidas nas reações de redução de **30a,e-g,j,l** com **FP**.

Produto	R	α observado ^(a)
23a	H	- 0,03
23e	4-CH ₃	- 0,01
23f	4-OCH ₃	- 0,01
23g	4-NO ₂	- 0,02
23j	2-NO ₂	0,00
23k	3-NO ₂	- 0,04

(a) clorofórmio (solvente), temperatura ambiente, l=10,3 cm.

Os valores de rotação óptica obtidos corroboraram com as análises de CG-quiral, pois para o álcool **23j** observou-se a formação de racemato pela biotransformação com **FP** e a rotação óptica lida foi nula. Os demais alcoóis, **23a**, **23e**, **23f**, **23g** e **23k**, foram obtidos seletivamente nesta reação e a rotação óptica foi negativa, deduzindo-se a partir destes valores que a formação dos enantiômeros é de configuração *S*.

As leituras ópticas foram efetuadas a partir de alíquotas do meio reacional, sem a devida purificação do produto obtido. Desta forma, e também considerando a concentração inexata dos produtos, os valores de rotação óptica observados não podem ser usados para calcular e comparar com os valores de $[\alpha]_D$ disponíveis na literatura. Por exemplo, para o (*S*)-1-feniletanol (**23a**) o valor de $[\alpha]_D$ citado na literatura é de -0,41¹¹⁴, valor maior do que o -0,03 encontrado.

Pelas análises de CG-quiral, observou-se que a técnica de microextração, com o 1-hexanol como solvente extrator, só foi compatível a extração líquido-líquido tradicional com diclorometano, para as reações de **30a,e-g,j,k** com **FP** realizadas em até 8h. Em tempos de reação superiores, ocorreu a formação de aglomerados em torno da levedura, dificultando a agitação e tornando a microextração inexata.

Na tentativa de melhorar a capacidade do sistema utilizado em biotransformar os substratos, escolheu-se a acetofenona (**30a**) para

otimizar algumas condições experimentais, tais como a massa do biocatalisador, massa do substrato, temperatura, aditivos e composição do sistema bifásico.

4.3.2.2. Variação da massa de **FP** na biotransformação de **30a**

A quantidade de biocatalisador pode influenciar na capacidade deste em biotransformar o substrato. Neste sentido, variou-se a massa de **FP** adicionada ao sistema entre 3 e 6 g. Na **Tabela 12** estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 12. Variação da massa de **FP** na biotransformação da acetofenona **30a**.^(a)

FP (g)	Conversão em 23a (%)				
	2h	5h	8h	24h	48h
3	1	2	3	15	27
4	2	5	12	31	41
5	2	7	13	34	46
6	2,6	8	15	25	30

(a) 3- 6 g **FP**, 0,5 mmol de acetofenona, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C.

Observa-se que em 48 h de reação a melhor conversão em **23a** foi de 46% utilizando 5 g de **FP**. Com 3 e 4g, as conversões foram de 27 e 41%, respectivamente, e utilizando 6 g de **FP** a conversão foi de 30%. Os valores menores de conversão ao utilizar 6 g podem ser explicados pela dificuldade em agitar o sistema reacional, o que impede a interação entre o substrato e a levedura.

Considerando que o aumento nos valores de conversão a **23a** em 48h de biotransformação não foram significativos, escolheu-se a quantidade de 4 g de **FP** para os estudos subsequentes.

4.3.2.3. Variação do pH

Na tentativa de aumentar os valores de conversão em **23a** e diminuir o tempo da reação, variou-se o pH do meio reacional entre 4,5 e 8,5, acompanhando a reação entre 2 e 8 h. Os resultados estão apresentados na **Figura 48**.

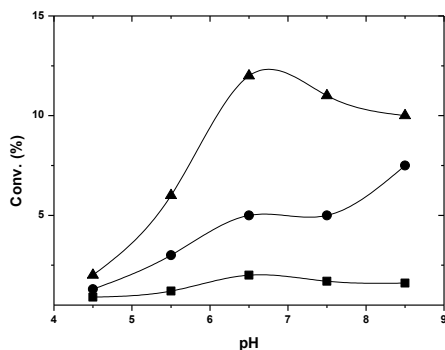


Figura 48. Conversão em **23a** em função do pH do meio reacional. [4 g FP, 0,5 mmol de **30a**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão, agitação magnética (150 rpm), 35 °C] [conv.: ■-2h; ●-5h e ▲-8h]

Pelos resultados apresentados, observa-se que o melhor foi obtido em pH=6,5 e 8 h de reação, sendo a conversão em (*S*)-1-feniletanol (**23a**) de 12 %. Em valores de pH maiores que 6,5 não ocorreram mudanças significativas nas conversões ao produto, mas em pH= 5,5 e 4,5 ocorreu decréscimo, com conversão em **23a** de 6 e 2%, respectivamente. Estes resultados indicam que o pH do meio reacional influenciou nesta reação, podendo diminuir a atividade enzimática.

Rauter *et al* (2014), utilizaram a levedura *Arxula adenivorans* na biotransformação da acetofenona, e também obtiveram os melhores resultados em pH = 6,5, com rendimento do (*S*)-1-feniletanol de 72%. Estes valores diminuíram para 66 e 65%, respectivamente em pH 5,5 e 7,5.²⁸

A partir dos resultados obtidos, o pH do meio reacional foi mantido em 6,5 para os demais estudos, que incluem o efeito da temperatura, massa do substrato e o uso de alguns fermentos comerciais e industriais.

4.3.2.4. Avaliação da influência da temperatura

De modo semelhante ao efeito do pH do meio reacional, a temperatura também pode influenciar no desempenho das reações enzimáticas. Neste sentido, buscando obter maiores valores de conversão para o (*S*)-1-feniletanol (**23a**) e em tempos menores de

reação, variou-se a temperatura entre 20 e 40 °C e a biotransformação foi monitorada em até 8 h (**Tabela 13**).

Tabela 13. Variação da temperatura na biotransformação de **30a** com **FP**.^a

°C	Conversão em 23a (%)		
	2h	5h	8h
20	<1	<1	1
25	<1	2	3
30	<1	2	4
35	2	5	12
40	1	5	8

- (a) 4 g **FP**, 0,5 mmol de **30a**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm).

Pelos dados apresentados, observa-se que a temperatura influenciou no desempenho das enzimas presentes no **FP**. Ocorreu um incremento nos valores de conversão a **23a**, sendo de 1 para 12% quando a temperatura do sistema reacional aumentou de 20 para 35°C, e diminuiu para 8% em 40 °C em 8 h de reação. O melhor resultado foi obtido a 35°C, temperatura até então utilizada nos estudos iniciais e escolhida para os subsequentes.

4.3.2.5. Avaliação da quantidade de substrato

A quantidade de substrato a ser biotransformada também pode influenciar no desempenho das enzimas que atuam neste processo, inibindo ou facilitando a ação enzimática. Neste sentido, variou-se a quantidade de **30a** entre 0,1 e 0,9 mmol, sendo a reação acompanhada em 24 e 48 h. Os resultados são apresentados na **Figura 49**.

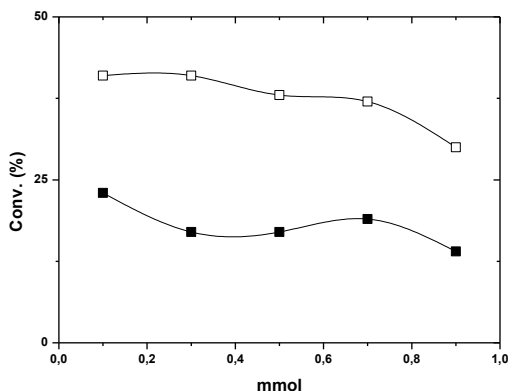


Figura 49. Estudo de variação da quantidade de **30a** na biotransformação com **FP**. [4 g **FP**, 0,1 – 0,9 mmol de **30a**, 18mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C] [conv.: ■- 24h e □- 48h]

Pode-se observar pelos resultados obtidos que a quantidade de substrato influenciou nas conversões em **23a**. Utilizando 0,1 mmol de **30a**, a conversão em **23a** foi de 41%, aumentando para 43% com 0,3 mmol e decrescendo a 30 % ao utilizar 0,9 mmol em 48 h de reação.

De modo análogo, Blanco e Livingston (2009) efetuaram a biotransformação da acetofenona **30a** com levedura *Rhodotorula glutinis*. Foi observado que a presença do (*R*)- ou (*S*)-1-feniletanol na concentração de 0,2 g L⁻¹ diminuiu a atividade enzimática de 6 mg h⁻¹g⁻¹ para 0,5 mg h⁻¹g⁻¹, e a atividade foi praticamente nula acima da concentração de 0,5 g L⁻¹.¹¹⁵

A partir dos resultados da variação da quantidade de substrato, utilizou-se 0,3 mmol de **30a** no próximo estudo.

4.3.2.6. Avaliação do biocatalisador na biotransformação de **30a**

Este estudo foi efetuado utilizando as leveduras *S. cerevisiae* presentes nos fermentos de pão comercial Fleischmann, Nordeste, Mauri, Emulzint e Dona Benta, além das industriais CAT-1 e PE-2. Os resultados estão apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Estudo de variação das leveduras na biotransformação de **30a**.^(a)

Entrada	Levedura	Conversão em 23a (%)		
		8h	24h	48h
1	Fleischmann	8	31	43
2	Nordeste	2,6	10	20
3	Mauri	1,5	10	27
4	Emulzint	4	7	11
5	Dona benta	1	4	8
6	CAT-1	0	0	1
7	PE-2	0,5	2	5*

(a) 4 g FP, 0,3 mmol de **30a**, 18 mL *n*-hexano, 42 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C.

*formou mistura racêmica.

Pelos dados apresentados, observa-se que o melhor resultado foi obtido exatamente com a levedura comercial Fleischmann, levedura até então utilizada. A conversão ao (*S*)-1-feniletanol (**23a**) foi de 43% em 48h. Ao usar as demais leveduras comerciais, os desempenhos foram inferiores, com conversões em **23a** entre 8 e 27% (48 h).

Utilizando a levedura industrial CAT-1, o (*S*)-1-feniletanol foi obtido com 1%. Ao usar a levedura industrial PE-2 a conversão em **23a** foi de 5%, sendo, entretanto observada a formação de mistura racêmica.

A diferença de desempenho na biotransformação da acetofenona utilizando as leveduras *S. cerevisiae* de diferentes fontes ou sob condições experimentais distintas, foi observada por Rodak *et al* (2006). Eles obtiveram o (*R*)-1-feniletanol com rendimento de 83% utilizando a levedura *S. cerevisiae* presente no fermento de pão fresco. Ao utilizar o fermento de pão fresco sob condições restritas de oxigênio e em 5% de glicose, e o fermento de pão permeabilizado, o (*S*)-1-feniletanol foi obtido com rendimento de 43% e de 3%, respectivamente. As reações foram feitas em 72h, utilizando 30 gramas de leveduras e 2 mmol de acetofenona.¹¹⁶

A partir dos resultados até então obtidos, utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* comercial de marca Fleischmann para avaliar a variação do volume da fase aquosa e a adição de aditivos ao meio reacional na biotransformação de **30a**.

4.3.2.7. Influência do volume da fase aquosa

Considerando que as reações envolvendo a utilização de enzimas ocorrem preferencialmente em água, variou-se a porcentagem da fase aquosa no sistema reacional utilizado entre 70 e 100%. Os resultados estão apresentados na **Figura 50**.

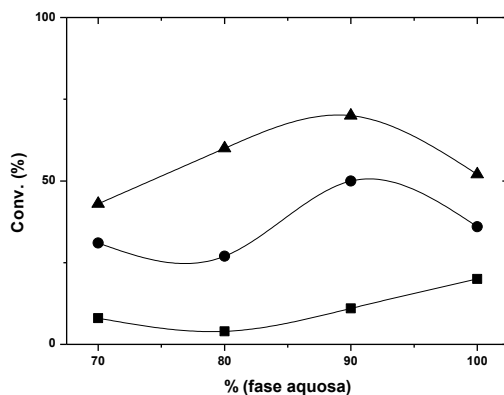


Figura 50. Conversão em **23a** em função da variação da porcentagem de fase aquosa na biotransformação da acetofenona. [4 g **FP**, 0,3 mmol de **30a**, 0-18 mL *n*-hexano, 42-60 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C] [conv.: ■- 8h; ●- 24h e ▲- 48h]

Observa-se que o incremento na porcentagem de fase aquosa de 70 a 90% melhorou consideravelmente a conversão de **30a** em **23a**, aumentando de 43 para 70%. Utilizando somente o meio aquoso, a conversão decresceu para 52%, indicando que possivelmente a solubilidade do substrato e do produto não é suficiente no meio aquoso, limitando a biotransformação.

Investigando a adição de solvente orgânico, Kato, Nakamura e Nakanishi (2014) efetuaram a biotransformação da trifluoroacetofenona (**30d**) com levedura *S. cerevisiae* livre e imobilizada em sílica gel, adicionando de 10 a 40% de metanol ao meio reacional. Utilizando a levedura livre os valores de conversão decresceram de 95 a 2% e os valores de *e.e.* do (*S*-1-fenil-2-trifluor-etanol) de 44 a 0%, e utilizando a levedura imobilizada a conversão passou de 78 a 5% e o *e.e.* do (*S*-1-fenil-2-trifluor-etanol) de 44 a 11%, quando a quantidade de metanol aumentou de 10 a 40%.⁵⁶

A partir dos resultados obtidos e dos estudos disponíveis na literatura, utilizou-se a porcentagem de 90% da fase aquosa para avaliar a adição de aditivos na biotransformação da acetofenona (**30a**).

4.3.2.8. Avaliação da adição de aditivos na biotransformação de **30a**

A utilização de determinados aditivos pode auxiliar na regeneração do cofator NADH, responsável pela catálise das reações de redução enzimática realizadas pela levedura *S. cerevisiae*, possivelmente melhorando seu desempenho na biotransformação. Neste sentido, foram utilizados alguns aditivos na fase aquosa, na tentativa de aumentar os valores de conversão em **23a**. Os resultados estão apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Influência da adição de aditivos na fase aquosa na biotransformação de **30a**.^(a)

Aditivos	Conversão em 23a (%)		
	8h	24h	48h
Sem	11	50	70
DMSO	3	13	33
Glicose (10%)	5	44	64
Trealose (10%)	16	50	67
Sacarose (10%)	3	50	65
Glicerol	8	45	65
L-cisteína	6	29	65

(a) 4 g **FP**, 0,3 mmol de **30a**, 6 mL *n*-hexano, 4 mL de aditivo, 50 mL tampão pH=6,5, agitação magnética (150 rpm), 35 °C.

Observa-se, que comparando a biotransformação sem aditivos, com a utilização de glicose, trealose, sacarose, glicerol ou L-cisteína, a conversão em **23a** decresceu de 70 a 64%. Ao utilizar DMSO, o resultado foi bem inferior, com conversão de 33% em 48 h de reação. Utilizando a trealose, apenas em 8h de reação, foi observado um acréscimo na conversão ao produto, sendo de 16%. Estes resultados evidenciaram que os aditivos utilizados não possuem efeito positivo na redução de **30a**.

Na obtenção do (*S*)-1-feniletanol (**23a**), Rauter *et al* (2014) obtiveram um rendimento de 40% na hidrogenação de 20 mM da acetofenona (**30a**) com a levedura *Arxula adenivorans*, utilizando 500mM de isopropanol como aditivo para regenerar o cofator NADH. Na ausência deste aditivo o rendimento foi de 72%.

Como não foram observados aumentos nas conversões ao produto com o uso de aditivos, a biotransformação dos derivados **30a**, **30e**, **30f**, **30g**, **30j** e **30k** foi realizada utilizando apenas o sistema bifásico com solução tampão e *n*-hexano.

4.3.2.9. Biotransformação de **30a**, **30e**, **30f**, **30g**, **30j** e **30k**

A partir das diversas condições experimentais otimizadas na biotransformação de **30a**, realizou-se a redução dos derivados **30e**, **30f**, **30g**, **30j** e **30k** utilizando o volume da fase aquosa de 90%.

Os resultados estão apresentados na **Tabela 16**, sendo também apresentados os dados de conversão do estudo efetuado com volume da fase aquosa de 70% (**Tabela 10**).

Tabela 16. Influência da variação dos substituintes na biotransformação dos derivados da acetofenona.^(a)

Entrada	R	Conversão (%)			
		24 h	48 h	24 h*	48 h*
1	H	50	70	31	41
2	4-CH ₃	17	26	12	21
3	4-OCH ₃	9	17	5	11
4	4-NO ₂	54	82	70	88
5 **	2-NO ₂	54	81	73	86
6	3-NO ₂	47	73	68	80

(a) 4 g FP, 0,3 mmol dos derivados de acetofenona, 6 mL *n*-hexano (10%), 54 mL tampão pH=6,5 (90%), agitação magnética (150 rpm), 35 °C.

*Valores de conversão para os estudos apresentados no item 4.3.2.1 (pg. 65).

**Ocorreu à formação do *R*- e *S*-álcool.

Pelos dados apresentados, observaram-se decréscimos nos valores de conversão ao utilizar os derivados nitro substituídos, sendo de 88 para 82 %, de 86 para 81% e de 80 para 73% em 48h de reação (Entradas 4, 5 e 6, respectivamente), comparado com o estudo inicial utilizando 70% de fase aquosa. Ao usar os derivados metil e metóxi, ocorreu um acréscimo de 21 para 26% e 11 para 17% em 48 h de reação (Entradas 2 e 3).

Os acréscimos ou decréscimos nos valores de conversão aos produtos, não possuem relação direta com a identidade do grupo doador ou retirador de elétrons dos substituintes, mas possivelmente está relacionada com a solubilidade dos substratos e produtos no meio reacional.

Pode-se concluir que a biotransformação da acetofenona e derivados **30a, e-g,j,k** com **FP** foi seletiva, formando os álcoois na configuração *S* e *e.e*>99%, com exceção de **23j** que formou mistura racêmica. Para **30a**, obteve-se os melhores resultados em 90% de volume da fase aquosa com conversão em **23a** de 71%.

4.4. ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO VEGETAIS COMO FONTE DE ENZIMAS

A partir dos resultados obtidos com **FP**, e considerando a avaliação de outras fontes de enzimas, utilizou-se cenoura (*Daucus carota*), e posteriormente outros vegetais e a maçã na biotransformação de **5a,b,d-g** e **30a**.

A cenoura, maçã e os outros vegetais foram adquiridos em uma feira de produtos agroecológicos (Comércio local), produtos produzidos sem a utilização de agrotóxicos no município de São Bonifácio/SC.

Primeiramente serão apresentados os resultados utilizando como substrato o benzaldeído e derivados (**5a,b,d-g**), e posteriormente os dados obtidos para a acetofenona (**30a**).

4.4.1. Biotransformação do benzaldeído e derivados (5a,b,d-g) utilizando vegetais como biocatalisadores

Iniciaram-se as reações com vegetais como fontes de enzimas, utilizando a cenoura para a biotransformação do benzaldeído (**5a**). Foram avaliados diversos parâmetros reacionais, tais como o pH, agitação, temperatura, adição de solvente orgânico, massa do substrato e o efeito dos grupos substituintes. Posteriormente, as melhores condições reacionais obtidas com o uso da cenoura, foram estendidas a outros vegetais e para a maçã.

4.4.1.1. Variação do pH na biotransformação do benzaldeído (5a) com pedaços de cenoura.

Baseando-se em trabalhos disponíveis na literatura utilizando esta fonte de enzimas na redução de compostos carbonílicos, utilizou-se a cenoura na biotransformação do benzaldeído em sistema aquoso, variando o pH do meio reacional entre 6 e 9.^{54,90} Os resultados estão apresentados na **Figura 51**.

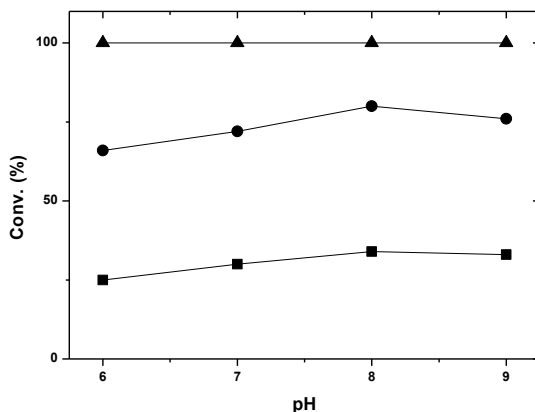


Figura 51. Influência do pH na biotransformação do benzaldeído (**5a**) com cenoura. [0,2 mmol de **5a**, 10g cenoura, 50mL tampão, agitação orbital (150 rpm), 30°C] [conv.: ■- 1h; ●- 2h e ▲- 5h]

Os resultados mostram que o benzaldeído (**5a**) é biotransformado ao respectivo álcool **22a** em 5 h de reação em todos os valores de pH utilizados. Não foi observada influência do pH do meio reacional sobre a capacidade de biotransformação das enzimas presentes nos pedaços de cenoura. Em 2 h, a conversão em **22a** variou de 66 a 80%, sendo o maior valor obtido em pH=8.

Vandenberghé *et al* (2014), efetuaram a hidrólise do fenilacetato utilizando pedaços de cenoura e as cascas separadamente em pH=9. O (*R*)-1-feniletanol foi obtido com conversão de 54 e 37% e *e.e.* de 63 e 71%, respectivamente utilizando as cascas e os pedaços em 5 h de reação.⁵⁴

Foram realizadas tentativas de biotransformar **5a** com cenouras adquiridas em diferentes supermercados, sem a comprovação de terem sido cultivadas sem agrotóxicos. Para tal, também foi realizada a variação do pH do meio reacional. Entretanto, não foi observada a formação do produto após 48h. Estes resultados indicam que possivelmente as cenouras foram cultivadas com o uso de defensivos agrícolas, que inibiu a atividade das enzimas oxidoredutases responsáveis pela biotransformação.

A partir dos resultados obtidos e das considerações acima descritas, escolheu-se o pH=8 para os estudos subsequentes.

4.4.1.2. Variação da agitação do sistema reacional

A agitação do sistema reacional pode influenciar na interação entre o substrato e o biocatalisador. Neste sentido, foram exploradas as diferentes formas de agitação disponíveis e a possível influência na biotransformação de **5a** com pedaços de cenoura. Foram utilizadas a agitação magnética, pendular e orbital, todas a 150 rpm, e os resultados estão apresentados na **Tabela 17**.

Tabela 17. Influência da agitação na biotransformação do benzaldeído com cenoura.^(a)

Agitação	Conversão em 22a (%)		
	1h	2h	5h
orbital	34	80	100
pendular	23	49	94
magnética	20	47	90

(a) 0,2mmol de benzaldeído; 10g cenoura, 50mL tampão pH= 8; agitação (150 rpm); 30°C

Observa-se que a agitação orbital foi mais eficiente para a biotransformação do benzaldeído com pedaços de cenoura, onde em 2h **22a** foi obtido com 80% de conversão, e 47% com a agitação magnética e 49% com a pendular. Deve-se considerar que a barra magnética em contato com os pedaços de cenoura pode provocar a desnaturação das enzimas presentes na superfície do vegetal, inibindo a capacidade de biotransformar o substrato. Ao usar a agitação tipo pendular, pode ocorrer pouca interação entre o substrato e as enzimas devido à homogeneização irregular do sistema.

Os resultados evidenciaram que a agitação do meio reacional influenciou na biotransformação de **5a**, sendo escolhida a orbital para os estudos subsequentes.

4.4.1.3. Adição de solvente orgânico

Neste estudo, a biotransformação de **5a** utilizando cenoura como fonte de enzimas, foi efetuada com a adição de solvente orgânico

ao meio reacional, visando melhorar a solubilização do substrato e do produto. Para tal utilizou-se o sistema bifásico, com *n*-hexano como o componente da fase orgânica. Na **Figura 52** estão apresentados os valores de conversão em **22a** em relação a adição de 0-30% de *n*-hexano ao sistema reacional.

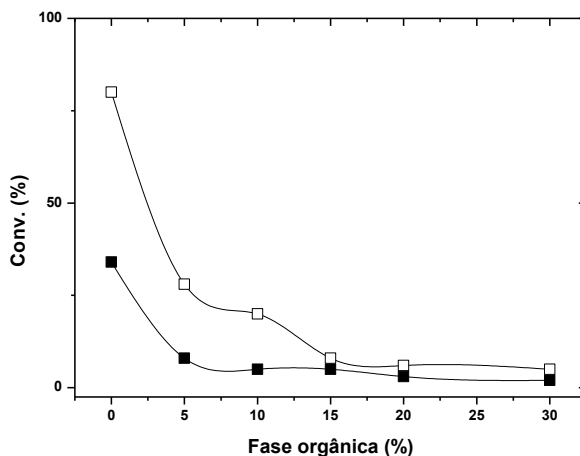


Figura 52. Influência da variação de *n*-hexano na biotransformação de **5a** com cenoura. [0,2mmol de **5a**; 10g cenoura, 35 - 47,5 mL tampão pH=8; 2,5 - 15mL *n*-hexano; agitação orbital (150 rpm); 30°C] [conv.: ■- 1h e □- 2h]

Pode-se observar que a presença do solvente orgânico no meio reacional influenciou na formação de **22a**, e os valores de conversão diminuíram de 80 para 5% ao aumentar a porcentagem de *n*-hexano de 0 a 30% em 2 h. Este decréscimo nos valores de conversão na presença da fase orgânica e também com o aumento da porcentagem desta no meio reacional, pode ser explicada possivelmente pela inativação das enzimas presentes na cenoura.

Majewska e Kosłowska (2013) efetuaram a biotransformação da trans-4-fenilbut-3-en-2-ona (**48**) com células inteiras de cenoura (*Daucus carota*), salsão (*Apium Graveolens*) e beterraba (*Beta vulgaris*) em *iso*-octano, obtendo o (*S*)-trans-4-fenilbut-3-en-2-ol (**49**) com conversões entre 71-96% e *e.e.* entre 72 e >99%, em três dias de reação.⁹¹

Considerando estes resultados, propõe-se que a biotransformação de **5a** com pedaços de cenoura, pode ser feita com

outros solventes orgânicos para verificar se diferenças na polaridade destes poderia melhorar os resultados obtidos em sistema aquoso. Nos estudos subseqüentes utilizou-se apenas o sistema aquoso.

4.4.1.4. Efeito da quantidade do substrato

Da mesma forma como a adição de solventes orgânicos, a concentração do substrato e/ou produtos pode influenciar na biotransformação com cenoura. Para avaliar este fator, realizou-se a variação da quantidade de **5a** entre 0,1 e 1,0 mmol. Os resultados estão apresentados na **Tabela 18**.

Tabela 18. Influência da variação da quantidade de benzaldeído na biotransformação com cenoura.^(a)

5a (mmol)	Conversão (%)		
	1h	2h	5h
0,1	37	83	100
0,2	34	80	100
0,3	22	66	100
0,4	10	33	97
0,5	6	21	85
1,0	2	3	4

(a) 0,1-1,0 mmol de **5a**, 10g cenoura, 50mL tampão pH= 8, agitação orbital (150 rpm), 30°C.

Observou-se que entre 0,1 e 0,3 mmol de **5a**, este foi totalmente reduzido em 5 h. Utilizando 0,4 e 0,5 mmol de **5a** notou-se um pequeno decréscimo na conversão em **22a**, sendo de 97 e 85%, respectivamente. Ao aumentar-se para 1,0 mmol de **5a**, a conversão foi de 4% em 5 h de reação. Estes resultados são proporcionais aos da adição de solvente orgânico no estudo anterior, mostrando realmente que a presença do solvente ou do substrato orgânico causa a diminuição na atividade ou a inativação das enzimas presentes na cenoura. Além disso, deve-se considerar a grande quantidade de substrato em relação a de enzimas.

Paralelamente, realizou-se também a biotransformação utilizando um volume reacional de 30 mL, não havendo mudanças nos valores de conversão em **22a** quando comparado com o volume de 50 mL, até então utilizado. Considerando que é interessante gerar uma quantidade menor de resíduos, o volume de 30 mL foi escolhido para os estudos subsequentes. Foi também selecionada a quantidade de 0,4

mmol do benzaldeído em virtude da boa conversão em produto (97%) obtida com esta concentração de substrato em 5h.

4.4.1.5. Efeito da temperatura

A seguir, foi investigado o efeito da variação da temperatura entre 20 e 45°C para a biotransformação de **5a** com pedaços de cenoura. Os resultados obtidos em 2 e 4 h estão apresentados na **Figura 53**.

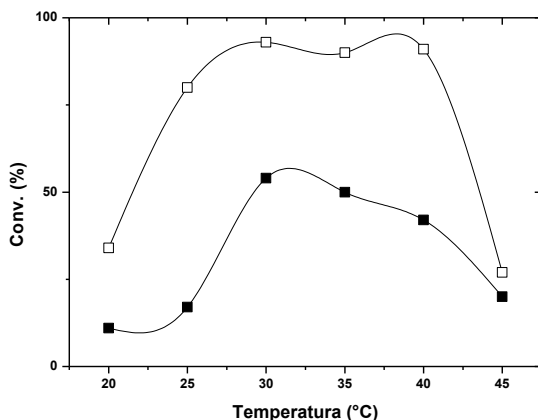


Figura 53. Influência da variação da temperatura na biotransformação de **5a** com cenoura. [Condições: 0,4 mmol de **5a**, 10g cenoura, 30mL tampão, agitação orbital (150 rpm)] [conv.: ■- 2h e □- 4h]

Em 30°C, a conversão em **22a** foi de 93% em 4h de reação, sendo este o melhor resultado. Não foi observada uma grande variação na conversão ao aumentar a temperatura para 35 e 40°C, sendo de 90 e 91%, respectivamente. Nas temperaturas de 25 e 20°C, bem como em 45°C, foram observados decréscimos nos valores de conversão em **22a**, sendo de 80, 34 e 27%, respectivamente.

Estes resultados evidenciaram que a temperatura influenciou nos valores de conversão em **22a**, mas que a cenoura possui boa capacidade de oferecer proteção às enzimas presentes nelas, permitindo-as atuar sem perda da atividade em uma ampla faixa de temperatura (25-40°C).

4.4.1.6. Influência da variação dos grupos substituintes

Completando os estudos de biotransformação com cenoura, as melhores condições obtidas para o benzaldeído (**5a**) foram estendidas aos demais derivados (**5b,d-g**). Entretanto devido a pouca solubilidade de alguns dos substratos no meio reacional, utilizou-se a quantidade de 0,2 mmol. As conversões em produtos estão apresentadas na **Tabela 19**.

Tabela 19. Biotransformação dos derivados de benzaldeído com cenouras.^(a)

Produto	R	Conversão (%)		
		1h	2h	5h
22a	H	34	80	100
22b	4-OCH₃	6	13	82
22d	4-CH₃	12	39	98
22e	4-NO₂	23	33	82
22f	2-NO₂	18	50	93
22g	3-NO₂	20	36	85

(a) 0,2mmol de (**5a,b,d-g**), 10g cenoura, 30 mL tampão pH=8, agitação orbital (150 rpm), 30°C.

Observa-se que as conversões foram boas, com valores entre 82 e 100% em 5h. Não foi observada uma relação entre a natureza do grupo substituinte e os valores de conversão aos produtos. Os substratos **5b,e-g** são sólidos e apresentaram certa dificuldade de solubilização no meio reacional, apresentando valores de conversão em **22b,e-g** entre 82-93%, enquanto que **5a** e **5d** são líquidos e apresentaram conversão em **22a** e **22d** de 100 e 98% respectivamente.

4.4.1.7. Uso de diversos vegetais e maçã na biotransformação de **5a**

A partir dos bons resultados obtidos na biotransformação do benzaldeído (**5a**) utilizando pedaços de cenoura, e da utilização de outros vegetais em reações de biotransformação reportados na literatura, utilizou-se maçã (*Malus domestica*), lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), batata inglesa (*Solanum tuberosum*), batata aipo (*Arracacia xanthorrhiza*), mandioca (*Manihot esculenta*), e açafrão-da-terra (*Curcuma longa*) na redução do benzaldeído. Foram usadas as melhores condições experimentais obtidas para as reações mediadas com cenoura (*Daucus carota*). Os resultados estão apresentados na **Tabela 20**.

Tabela 20. Variação da conversão em **22a** em função dos diferentes vegetais utilizados para a biotransformação de **5a**.^(a)

Entrada	Vegetal	Conversão em 22a (%)		
		1h	2h	4h
1	Cenoura	13	54	93
2	Maçã	0	0,5	4
3	Lírio do brejo	5	23	67
4	Batata doce	9	37	89
5	Batata inglesa	3	14	49
6	Batata aipo	13	45	91
7	Mandioca	11	41	92
8	Açafrão	3	13	44

(a) 0,4 mmol de **5a**, 10g de vegetal, 30mL tampão pH= 8, agitação orbital (150 rpm), 30°C.

Observou-se que utilizando a batata doce, batata aipo e mandioca como fontes de enzimas, as conversões em produto foram de 89, 91 e 92% (Entradas 4, 6 e 7, respectivamente), similares ao valor obtido utilizando cenoura (93%) em 4h de reação. Utilizando maçã, a conversão foi de 4% (Entrada 2), e ao usar os demais vegetais as conversões foram moderadas, sendo de 67% com o lírio do brejo, 49% com a batata inglesa e 44% com açafrão (Entradas 3, 5 e 8, respectivamente).

Os resultados podem ser considerados bons e, uma vez que as enzimas presentes em cada tipo de vegetal são diferentes, outros estudos da otimização das condições experimentais para cada fonte vegetal são necessários e interessantes na tentativa de melhorar o desempenho destes como biocatalisadores.

4.4.2. Biotransformação da acetofenona utilizando vegetais como biocatalisadores

A partir dos resultados anteriores obtidos para o benzaldeído e de alguns de seus derivados com pedaços de cenoura, algumas das melhores condições experimentais foram usadas para realizar a biotransformação da acetofenona (**30a**).

4.4.2.1. Avaliação do tempo e pH na biotransformação da acetofenona com cenoura

De maneira semelhante ao benzaldeído e derivados, iniciou-se a biotransformação da acetofenona (**30a**) com cenoura variando o pH do meio reacional. Também foi avaliado o tempo de reação ideal para a redução deste substrato. Os resultados estão apresentados na **Tabela 21**.

Tabela 21. Variação da conversão em **23a** em função do pH e do tempo na biotransformação de **30a** com cenoura.^(a)

pH	Conversão em 23a (%)						
	1h	2h	5h	8h	24h	32h	48h
9	1	4	14	29	55	55	55
8	1	4	17	30	57	60	60
7	2	6	21	38	67	67	67
6	1,6	5	17	31	60	64	64

(a) Condições: 2 mmol de **30a**, 10g cenoura, 50mL tampão, agitação orbital (150 rpm), 30°C.

Pelas análises de cromatografia gasosa (CG) foi possível verificar que a biotransformação da acetofenona foi seletiva, formando somente o (*S*)-1-feniletanol (**23a**), de modo análogo ao resultado obtido com **FP**.

A mudança do pH do meio reacional não resultou em grandes variações nas conversões, sendo o melhor resultado em pH= 7 e 24h de reação, com conversão de 67 %. Os dados mostraram que a partir de 24h, as conversões em **23a** foram similares e pouco dependentes do pH. Por exemplo, em pH=6, a conversão em **23a** aumentou de 60 para 64%, entre 24 e 48h.

Blanco e Livingston (2009), utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* na biotransformação da acetofenona (**30a**) na concentração de 0,2 g L⁻¹, observaram que um incremento na concentração do (*S*)-1-feniletanol (**23a**) de 0,05 a 0,1 g L⁻¹ até 6 h após o início da reação. Em tempos maiores, a concentração de **23a** manteve-se constante.¹¹⁵

A partir dos resultados obtidos, os próximos estudos foram realizados em 24h e com o pH=7 para o sistema aquoso.

4.4.2.2. Quantidade do substrato

O estudo subsequente foi da variação da quantidade de acetofenona no meio reacional, variando de 0,1 a 0,5 mmol. Os resultados estão apresentados na **Figura 54**.

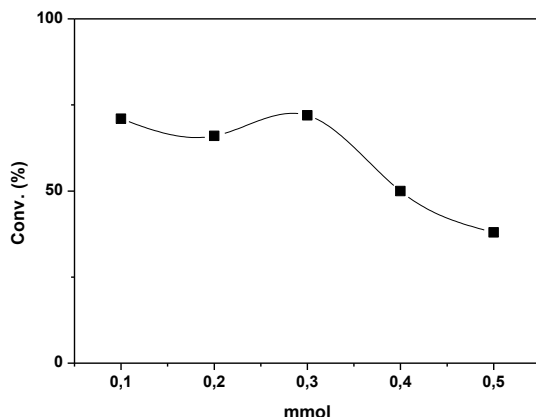


Figura 54. Variação da conversão em **23a** em função da quantidade de acetofenona na biotransformação com cenoura. [Condições: 0,1 – 0,5 mmol de **30a**, 10 g cenoura, 30 mL tampão, agitação orbital (150 rpm), 24h, 30°C]

Observa-se que utilizando entre 0,1 e 0,3 mmol de **30a**, os valores de conversão em **23a** foram entre 67 e 70%, sem variação significativa. O aumento na quantidade de substrato acima de 0,3 mmol acarretou em um decréscimo nos valores de conversão, diminuindo para 50 e 38% ao usar 0,4 e 0,5 mmol de **30a**, respectivamente.

A partir destes resultados, utilizou-se 0,3 mmol de **30a** para a biotransformação com diferentes vegetais.

4.4.2.3. Uso de diversos vegetais e maçã na biotransformação de **30a**

Da mesma forma como realizado para a biotransformação do benzaldeído (**5a**), estudou-se a redução da acetofenona (**30a**) utilizando maçã, batata doce, batata inglesa, lírio-do-brejo, batata aipo, mandioca e açafraão como biocatalisadores. Os dados estão apresentados na **Tabela 22**, onde também é apresentado o resultado obtido com a cenoura.

Tabela 22. Variação na conversão em **23a** em função da utilização de diferentes vegetais e maçã na biotransformação da acetofenona.^(a)

Entrada	Vegetal	2h		8h		24h	
		conv. (%)	<i>e.e.</i> (%) (conf.)	conv. (%)	<i>e.e.</i> (%) (conf.)	conv. (%)	<i>e.e.</i> (%) (conf.)
1	cenoura	5	>99 (S)	32	>99 (S)	70	>99 (S)
2	maçã	-	-	1	>99 (S)	3,1	95 (S)
3	lírio do brejo	0,2	>99 (R)	1,7	95 (R)	8	70 (R)
4	batata doce	0,1	>99 (S)	3,1	92 (S)	56	85 (S)
5	batata inglesa	0,2	-	2	-	6	-
6	batata aipo	3	>99 (R)	10	>99 (R)	14	>99 (R)
7	mandioca	0	-	0	-	6	27 (S)
8	açafrão	0	-	3,1	87 (R)	14	70 (R)

(a) Condições: 0,3 mmol de **30a**, 10 g vegetal, 30 mL tampão, agitação orbital (150 rpm), 24h, 30°C

Os melhores resultados foram obtidos utilizando a batata doce como fonte de enzimas, com valores de conversão de 56% e *e.e.* do (*S*)-1-feniletanol de 85% (Entrada 4). Utilizando maçã (conversão de 3,1%) e mandioca (conversão de 6%) também ocorreu a formação preferencial do (*S*)-álcool, com *e.e.* de 95 e 27% (Entradas 2 e 7 respectivamente).

A formação do (*R*)-álcool foi observada utilizando o bulbo do lírio do brejo (conversão de 8% e *e.e.* de 70%) (Entrada 3), a batata aipo com conversão de 14% e *e.e.* de 99% (Entrada 6), e o açafrão com conversão de 14% e *e.e.* de 70% (Entrada 8), em 24h de reação.

Embora, as conversões ao álcool **23a** não tenham sido muito altas, foram observados valores altos de *e.e.* (70 a >99%) ao utilizar a maioria dos vegetais como biocatalisadores, tornando estes resultados bastante interessantes e promissores. Outros vegetais, condições experimentais, bem como diferentes substratos poderão ser estudados.

A obtenção de compostos opticamente puros, é certamente uma área de grande interesse dentro da química orgânica e da biocatálise. O uso de catalisadores baratos e de fonte renovável é certamente outro aspecto relevante destes estudos, estando em concordância com os princípios de uma Química ambientalmente mais amigável.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e apresentados para a biotransformação da (4*S*)-carvona (**32**) com a levedura *S. roraimanensis*, pode-se concluir que:

→ A biotransformação de **32** com esta levedura não foi seletiva, levando tanto a formação das dihidrocarvonas (**33a,b**) e dos dihidrocarveóis (**34a-d**).

→ A temperatura e o pH ótimo para a biotransformação de **32** foram de 25 °C e 6,5, respectivamente.

→ A concentração da levedura e do substrato não apresentou influência significativa na conversão e seletividade dos produtos.

→ Utilizando a levedura cultivada em *D*-xilose, obtiveram-se as maiores conversões dos dihidrocarveóis (**34a-d**).

→ Ao aumentar o volume do sistema reacional, as conversões em produtos decresceram significativamente, tanto utilizando a levedura cultivada em *D*-glicose bem como em *D*-xilose.

Pelos resultados obtidos na biotransformação do benzaldeído e de seus derivados (**5a,b,d-g**) com **FP**, conclui-se que:

→ O tempo de biotransformação dos derivados **5a,b,d-g** nos correspondentes álcoois **22a,b,d-g** foi dependente do grupo funcional.

→ Foi possível biotransformar 3mmol de **5a** e 4mmol de **5e** em até 2h de reação com o sistema reacional utilizado.

Para a biotransformação da acetofenona e derivados (**30a, e-g,j,k**) com **FP**, conclui-se que:

→ As reações foram seletivas e os correspondentes álcoois foram obtidos com configuração *S* e *e.e.*>99%, com exceção de **23j** que formou mistura racêmica.

→ A adição de aditivos não aumentou a conversão em produto na biotransformação de **30a**.

→ Utilizando 90% de volume da fase aquosa obteve-se, a maior conversão de **30a** em **23a** (71%).

Ao usar os vegetais na biotransformação do benzaldeído e seus derivados (**5a,b,d-g**) e da acetofenona (**30a**), pode-se concluir que:

→ A busca por novas fontes de enzimas para a redução de compostos carbonílicos mostrou-se eficiente.

→ Os melhores resultados foram obtidos utilizando a agitação orbital.

→ A biotransformação de **5a** não sofreu decréscimos significativos na faixa de temperatura entre 30 e 40°C, mostrando-se a cenoura mais resistente que o **FP**.

→ A adição de *n*-hexano ao meio reacional acarretou em decréscimos na conversão em **22a**, limitando a quantidade de substrato a ser reduzido.

→ Na biotransformação da acetofenona **30a**, utilizando cenoura, obteve-se **23a** com a mesma seletividade obtida com **FP**, mas o tempo de reação foi menor (24h).

→ Ao usar os demais vegetais, os resultados foram promissores na biotransformação de **5a**.

→ Finalizando, salienta-se que o uso de células inteiras provenientes de microrganismos e/ou fontes vegetais, apresenta-se como uma alternativa viável, renovável e de baixo custo para a obtenção de compostos de interesse, tais como álcoois opticamente puros.

6. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, têm-se com perspectivas:

→ Imobilizar a levedura *S. roraimanensis* em suportes poliméricos (ex.alginato de sódio, resinas, K-10), visando melhorar a seletividade dos produtos formados e possibilitar a biotransformação de **32** em escala maior, bem como o reuso do sistema.

→ Imobilizar o fermento de pão comercial em suportes poliméricos (ex.alginato de sódio, resinas, K-10), com o objetivo de obter maiores conversões na biotransformação de **30a** e também possibilitar a reutilização do biocatalisador.

→ Estender a biotransformação com cenoura para os demais derivados da acetofenona (**30e-g,j,k**).

→ Buscar e testar outras fontes vegetais (ex.rabanete) para utilizar como biocatalisadores na biotransformação dos compostos carbonílicos estudados neste trabalho.

→ Utilizar separadamente a casca e a parte interna dos vegetais ou frutas, bem como variar o formato do corte dos mesmos e verificar se há diferença no desempenho destes como biocatalisadores nas reações de redução dos compostos carbonílicos.

→ Verificar se o tempo e a modo de estocagem dos vegetais ou frutas resultam em modificações na sua atuação nas reações a serem realizadas.

6. REFERÊNCIAS

1. Marsaioli, A.J., Porto, A.L. M., *Biocatálise e Biotransformação – Fundamentos e Aplicações*; vol. 1, Schoba Editora, SP, 11-14, 250-271, **2010**.
2. Liese, An., Seelbach, K., Wandrey, C., *Industrial Biotransformations*, Copyright © WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2ª ed., 1-36, **2006**.
3. Leresche, J.E., Meyer, H.P., Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist, *Org. Process Res. Dev.*, 10 (3), **2006**, 572-580.
4. Oliveira, L. G., Mantovani, S. M., Transformações biológicas: contribuições e perspectivas, *Quim. Nova*, 32(3), **2009**, 742-756.
5. Beatriz, A., Araújo, Y. J. K., Lima, D. P., Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas, *Quim. Nova*, 34(2), **2011**, 306-319.
6. Prado, A. G. S., Química verde, os desafios da química do novo milênio, *Quim. Nova*, 26 (5), **2003**, 738-744.
7. Busto, E., Fernández, V.G., Gotor, V., Hydrolases in the stereoselective synthesis of N-heterocyclic amines and amino acid derivatives, *Chem. Rev.* 111, **2011**, 3998-4035.
8. Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F.G., Serra, S., Biocatalytic methods for the synthesis of enantioenriched odor active compounds, *Chem. Rev.* 111, **2011**, 4036-4072.
9. Yadav, G.D., Mewada, R.K., Selective hydrogenation of acetophenone to 1-phenyl ethanol over nanofibrous Ag-OMS-2 catalysts, *Catal.Today*, 198, **2012**, 330-337.
10. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6th Edition, Springer, **2011**.
11. Cordell, G.A., Sustainable Drugs And Global Health Care, *Quim. Nova*, 32 (5), **2009**, 1356-1364.
12. Cordell, G.A., Lemos, T.L.G., Monte, F.J.Q., Mattos, M.C., Vegetals as Chemical Reagents, *J. Nat. Prod.*, 70, **2007**, 478-492.
13. Perles, C.E., Moran, P.J.S., Volpe, P.L.O., Bioreduction of ethyl 3-oxobutyrate by *Saccharomyces cerevisiae*: A metabolic *in vivo* study, *J. Mol.Catal. B: Enzym.*, 52-53, **2008**, 82-87.

14. Sun, J., Shao, Z., Zhao, H., Nair, N., Wen, F., Xu, J.H., Zhao, H., Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, 109, **2012**, 2082-2092.
15. Bruice, P. Y., *Organic Chemistry*, Prentice-Hall International (UK) Limited, London, 3rd ed., cap. 17, 18, 22 e 23, pg. 735-826 e 958-1032, **2001**.
16. Solomons, T. W. G., Fryhle, C. B., *Química Orgânica*, vol. 2, 8ª Ed., LTC Editora, RJ cap. 24, pg. 471-472, **2006**
17. Campbell, M. K.; Farrell, S. O., *Bioquímica*, 5ª Ed., Thomson, SP, cap. 4, 6 e 7, **2006**.
18. Nelson, D. L., Cox, M. M., Lehninger: *Principles of Biochemistry*, 3ª Ed., Worth Publishers: New York, cap. 8, **2000**.
19. Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Gama, M.; *Engenharia Enzimática*; Lidel Edições Técnicas Ltda; cap. 5, 121-138, 210-221, **2003**
20. Drauz, K., Gröger, H., May, O., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, volume 1, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pg. 1-63 e 1035-1153, **2012**.
21. Matsuda, T., Yamanaka, R., Nakamura, K., Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction, *Tetrahedron: Asymm.*, 20, **2009**, 513-557.
22. Ribeiro, J. B., Ramos, A. S.; Fiaux, S. B., Leite, S. G. F., Ramos, M. K. V.; F. Neto, R. A., Antunes, O. A. C., Immobilized microorganisms in the reduction of ethyl 4-chloroacetate, *Tetrahedron: Asymm.*, 20, **2009**, 2263-2265.
23. Kolodiazny, O.I., Kukhar, V.P., Kolodiazna, A.O., Asymmetric catalysis as a method for the synthesis of chiral organophosphorus compounds, *Tetrahedron: Asymm.*, 25, **2014**, 865-922.
24. Baraldi, P. T., Corrêa, A. G., O emprego de fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de feromônios, *Quim. Nova*, 27 (3), **2004**, 421-431.
25. Vajjyanthi, T., Chadha, A., Asymmetric reduction of arylimines using *Candida parapsilosis* ATCC 7330, *Tetrahedron: Asymm.*, 19, **2008**, 93-96.

26. Pratap, U.R., Jawale, D.V., Londhe, B.S., Mane, R.A., Baker's yeast catalyzed synthesis of 1,4-benzothiazines, performed under ultrasonication, *J. Mol.Catal. B: Enzym.*, 68, **2011**, 94-97.

27. Avalani, J.R., Patel, D.S., Raval, D.K., *Saccharomyces cerevisiae* catalyzed one pot synthesis of isoindolo[2,1- α]quinazoline performed under ultrasonication, *J. Mol.Catal. B: Enzym.*, 90, **2013**, 70-75.

28. Rauter, M., Kasprzak, J., Becker, K., Baronian, K., Bode, R., Kunze, G., Vorbrodth, H.M., ADH from *Rhodococcus ruber* expressed in *Arxula adenivorans* for the synthesis of 1-(S)-phenylethanol, *J. Mol.Catal. B: Enzym.*, 104, **2014**, 8-16.

29. Wang, N., Huang, J., Luo, H., Wang, P., Li, J., Purification and characterization of a new carbonyl reductase from *Leifsonia xyli* HS0904 involved in stereoselective reduction of 3,5-bis(trifluoromethyl)acetophenone, *J. Mol.Catal. B: Enzym.*, 92, **2013**, 1-6.

30. Janeczko, T., Susłow, E.K., Enantioselective reduction of propiophenone formed from 3-chloropropiophenone and stereoinversion of the resulting alcohols in selected yeast cultures, *Tetrahedron: Asymm.*, 25, **2014**, 1264-1269.

31. Gallardo, Y.M., Soriano, M.P.C., Santos, L.S., Stereoselective bioreduction of β -carboline imines through cell-free extracts from earthworms (*Eisenia foetida*), *Tetrahedron: Asymm.*, 24, **2013**, 440-443.

32. Goretti, M., Turchetti, B., Cramarossa, M. R., Forti, L., Buzzini, P., Production of flavours and fragrances via bioreduction of (4R)-(-)-carvone and (1R)-(-)-yrtanal by non-conventional yeast whole-cells, *Molecules*, 18, **2013**, 5736-5748.

33. Silva, V. D., Stambuck, B. U., Nascimento, M. G., Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propene-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in water/organic solvent biphasic system, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 63, **2010**, 157-163.

34. Hu, Q., Xu, Y., Nie, Y., Highly enantioselective reduction of 2-hydroxy-1-phenylethanone to enantiopure (R)-phenyl-1,2-ethanediol using *Saccharomyces cerevisiae* of remarkable reaction stability, *Bioresour. Technol.*, 101, **2010**, 8502-8508.

35. Ou, Z.M., Shi, H.B., Sun, X.Y., Shen, W.H., Synthesis of S-licarbezapine by asymmetric reduction of oxcarbazepine with

Saccharomyces cerevisiae CGMCC No. 2266, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 72 (3-4), **2011**, 294-297.

36. Hoegl, A., Darabi, H., Tran, E., Awuah, E., Kerdo, E.S.C., Habib, E., Saliba, K.J., Auclair, K., Stereochemical modification of germinal dialkyl substituents on pantothenamides alters antimicrobial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, **2014**, 3274-3277.

37. Villiers, M., Macuamule, C., Spry, C., Hyun, Y.M., Strauss, E., Saliba, K.J., Structural modification of pantothenamides counteracts degradation by *Pantetheinase* and improves antiplasmodial Activity, *ACS Med. Chem. Lett.*, 4, **2013**, 784-789.

38. Costa, P., Pilli, R., Pinheiro, S., Vasconcellos, M., *Substâncias Carboniladas e Derivados*, Porto Alegre: Brookman, cap.3, 311-364, **2003**.

39. Mc Murry, J., *Química Orgânica*, Editora Thomson, São Paulo, Combo, 6^a ed., cap.19, pg. 676-728, **2006**

40. Oliveira, C.S., Andrade, K.T., Omori, A.T., One-pot chemoenzymatic synthesis of chiral disubstituted 1,2,3-triazoles in aqueous media, *J. Mol.Catal. B: Enzym.*, 91, **2013**, 93-97.

41. Franco, G.S., Quiroz, T.H., Ocaña, A.N., Ros, R.M.O., Alfaro, G.V., Plants as a green alternative for alcohol preparation from aromatic aldehydes, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 15, **2010**, 441-445.

42. Xu, W., Guo, H., Zhang, J., Zhu, Q., Hu, X., Asymmetric reduction of acetophenone using α,α -disubstituted aziridinemethanols and borane, *J. Mol.Catal. A: Chem.*, 300, **2009**, 25-28.

43. Joshi, B.U., Singh, P., Saini, H.S., Optimization of culture conditions for enhanced asymmetric bioreduction of acetophenone and its derivatives by growing cells of *Pseudomonas sp.* AP1, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 3 (4), **2014**, 142-148.

44. Yadav, G.D., Mewada, R.K., Selective hydrogenation of acetophenone to 1-phenyl ethanol over nanofibrous Ag-OMS-2 catalysts, *Catal. Today*, 198, **2012**, 330-337.

45. Fessenden, R.J., Fessenden, J.S., *Techniques and Experiments for Organic Chemistry*, PWS Publishers, cap. 15, pg. 278-291, **1983**.

46. Cho, B.T., Kang, S.K., Kim, M.S., Ryu, S.R., An, D.K., Solvent-free reduction of aldehydes and ketones using solid acid-activated sodium borohydride, *Tetrahedron*, 62, **2006**, 8164-8168.

47. Zeynizadeh, B., Behyar, T., Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with NaBH₄/wetSiO₂ under solvent free condition, *J. Braz. Chem. Soc.*, 16 (6A), **2005**, 1200-1209.

48. Vogel, A.I., Química Orgânica-Análise Organica Qualitativa, Rio de Janeiro, Editora Ao Livro Técnico S.A., Vol. 3, cap. 5, pg. 923-932, **1971**.

49. Wijata, K.N., Strohmeier, G.A., Sonavane, Manoj N., Avi, M., Robins, K., Winkler, M., Enantiocomplementary *Yarrowia lipolytica* oxidoreductases: alcohol dehydrogenase 2 and short chain dehydrogenase/reductase, *Biomolecules*, 3, **2013**, 449-460.

50. Katakya, R., Murphy, L., Lancon, A.D., Kalakuntla, S., Lopes, P., Chiral resolution of *R* and *S* 1-phenylethanol on glassy carbon electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 633, **2009**, 57-62.

51. Yıldız, T., Canta, N., Yusufoglu, A., Synthesis of new chiral keto alcohols by baker's yeast, *Tetrahedron: Asymm.*, 25, **2014**, 340-347.

52. He, S., Wang, Z., Zou, Y., Chen, S., Xu, X., Purification and characterization of a novel carbonyl reductase involved in oxidoreduction of aromatic β-amino ketones/alcohols, *Process Biochem.*, 49, **2014**, 1107-1112.

53. Halling, P.J., Gupta, M.N., Measurement and reporting of data in applied biocatalysis, *Perspect. Science*, 1, **2014**, 98-109.

54. Vandenberghe, A., Markó, I.E., Lucaccioni, F., Lutts, S., Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables, *Ind. Crop. Prod.*, 42, **2013**, 380-385.

55. Li, G., Ren, J., Wu, Q., Feng, J., Zhu, D., Ma, Y., Identification of a marine NADPH-dependent aldehyde reductase for chemoselective reduction of aldehydes, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 90, **2013**, 17-22.

56. Kato, K., Nakamura, H., Nakanishi, K., Asymmetric bioreduction of acetophenones by Baker's yeast and its cell-free extract encapsulated in sol-gel silica materials, *Appl. Surf. Sci.*, 293, **2014**, 312-317.

57. Zampieri, D.S., Paula, B.R.S., Zampieri, L.A., Vale, J.A., Rodrigues, J.A.R., Moran, P. J.S., Enhancements of enantio and diastereoselectivities in reduction of (*Z*)-3-halo-4-phenyl-3-buten-2-one

mediated by microorganisms in ionic liquid/water biphasic system, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 85-86, **2013**, 61-64.

58. Russo, A.T., Amezcua, K.L., Huynh, V.A., Rousslang, Z.M., Cordes, D.B., A simple borohydride-based method for selective 1,4-conjugate reduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds, *Tetrahedron Lett.*, 52, **2011**, 6823-6826.

59. Luo, F., Wang, P., Gong, Y., Highly enantioselective bioreduction of 2-fluorocinnamyl alcohols mediated by *Saccharomyces cerevisiae*, *Tetrahedron Lett.*, 51, **2010**, 1693-1695.

60. Luo, F., Wang, P., Gong, Y., Enantioselective bioreduction of 2-fluoro-2-alken-1-ols mediated by *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 70, **2011**, 101-107.

61. Souza, F.V.M., Rocha, M.B., Souza, D.P., Marçal, R.M., (-)-Carvone: Antispasmodic effect and mode of action, *Fitoterapia*, 85, **2013**, 20-24.

62. Ni, Y., Yu, H.L., Lin, G.Q., Xu, J.H., An ene reductase from *Clavispora lusitaniae* for asymmetric reduction of activated alkenes, *Enzyme Microb. Technol.*, 56, **2014**, 40-45.

63. Chen, X., Gao, X., Wu, Q., Zhu, D., Synthesis of optically active dihydrocarveol via a stepwise or one-pot enzymatic reduction of (R)- and (S)-carvone, *Tetrahedron: Asymmetry*, 23, **2012**, 734-738.

64. Hook, I.L., Ryan, S., Sheridan, H., Biotransformation of aliphatic and aromatic ketones, including several monoterpenoid ketones and their derivatives by five species of marine microalgae, *Phytochemistry*, 63, **2003**, 31-36.

65. Iqbal, N., Rudroff, F., Brigé, A., Beeumen, J.V., Mihovilovic, M.D., Asymmetric bioreduction of activated carbonyl-carbon double bonds using *Shewanella* yellow enzyme (SYE-4) as novel enoate reductase, *Tetrahedron*, 68, **2012**, 7619-7623.

66. Silva, V.D., Stambuck, B.U., Nascimento, M.G., Asymmetric reduction of (4R)-(-)-carvone catalyzed by Baker's yeast in aqueous mono- and biphasic systems, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 77, **2012**, 98-104.

67. Silva, V.D., Carletto, J.S., Carasek, E., Stambuk, B.U., Nascimento, M.G. Asymmetric reduction of (4S)-(+)-carvone catalyzed by baker's yeast: A green method for monitoring the conversion based

on liquid–liquid–liquid microextraction with polypropylene hollow fiber membranes. *Process Biochem.*, 48, **2013**, 1159-1165.

68. Goretti, M., Ponzoni, C., Caselli, E., Marchigiani, E., Cramarossa, M.R., Turchetti, B., Buzzini, P., Forti, L., Biotransformation of electron-poor alkenes by yeasts: Asymmetric reduction of (4S)-(+)-carvone by yeast enoate reductases, *Enzyme Microb. Technol.*, 45, **2009**, 463-468.

69. Winkler, C.K., Tasnádi, G., Clay, D., Hall, M., Faber, K., Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds, *J. Biotechnol.*, 162, **2012**, 381-389.

70. Bhatia, S.P., McGinty, D., Letizia, C.S., Api, A.M., Fragrance material review on dihydrocarveol, *Food Chem.Toxicol.*, 46, **2008**, S123-S125.

71. Kartal, F., Janssen, M.H.A., Hollmann, F., Sheldon, R.A., Kılınc, A., Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 71, **2011**, 85-89.

72. Akdemir, Z.S., Demir, S., Kahraman, M.V., Apohan, N.K., Preparation and characterization of UV-curable polymeric support for covalent immobilization of *xylanase* enzyme, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 68, **2011**, 104-108.

73. Mateo, C., Palomo, J.M., Lorente, G.F., Guisan, J.M., Lafuente, R.F., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity *via* immobilization techniques, *Enzym. Microb. Technol.*, 40, **2007**, 1451-1463.

74. Milner, S.E., Maguire, R.A., Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis, *Arkivoc*, **2012**, 321-382.

75. Sheldon, R.A., Pelt, S., Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how†, *Chem. Soc. Rev.*, 42, **2013**, 6223-6235.

76. Spie, A.C., Eberhard, W., Peters, M., Eckstein, M.F., Greiner, L., Buchs, J., Prediction of partition coefficients using COSMO-RS: solvent screening for maximum conversion in biocatalytic two-phase reaction systems, *Chem. Eng. Process.*, 47, **2008**, 1034-1041.

77. Monti, D., Ottolina, G., Carrea, G., Riva, S., Redox reactions catalyzed by isolated enzymes, *Chem. Rev.*, 111, **2011**, 4111-4140.

78. Zou, S.P., Zheng, Y.G., Du, E.H., Hu, Z.C., Enhancement of (S)-2,3-dichloro-1-propanol production by recombinant whole-cell

biocatalyst in *n*-heptane–aqueous biphasic system, *J. Biotechnol.*, 188, **2014**, 42-47.

79. Liu, Y., Chen, D., Yan, Y., Effect of ionic liquids, organic solvents and supercritical CO₂ pretreatment on the conformation and catalytic properties of *Candida rugosa* lipase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 90, **2013**, 123-127.

80. Zou, B., Song, C., Xu, X., Xia, J., Huo, S., Cui, F., Enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials, *Appl. Surf. Sci.*, 311, **2014**, 62-67.

81. Vitale, P., D'Introno, C., Perna, F.M., Perrone, M.G., Scilimati, A., *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 growing cells as a new biocatalyst in the asymmetric reduction of substituted acetophenones, *Tetrahedron: Asymmetry*, 24, **2013**, 389-394.

82. Pal, M., Srivastava, G., Moon, L.S., Jolly, R.S., Bioreduction of methyl heteroaryl and aryl heteroaryl ketones in high enantiomeric excess with newly isolated fungal strains, *Bioresour. Technol.*, 118, **2012**, 306-314.

83. Morais, C.G., Cadete, R.M., Uetanabaro, A.P.T., Rosa, L.H., Lachance, M.A., Rosa, C.A., D-xylose-fermenting and xylanase-reducing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil, *Fung. Genet. Biol.*, 60, **2013**, 19-28.

84. Teixeira, M.F.S., Silva, T.A., Palheta, R.A., Carneiro, A.L.B., Atayde, H.M., *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada*, Editora: EDUA, Manaus-Am, cap. 1, pg. 9-45, **2011**.

85. Cadete, R.M., Melo, M.A., Zilli, J.E., Vital, M.J.S., Mouro, A., Prompt, A.H., Gomes, F.C.O., Stambuk, B.U., Lachance, M.A., Rosa, C.A., *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian Forest. *ANTONIE VAN LEEUWENHOEK*, 103, **2013**, 421-431.

86. Nguyen, N.H., Suh, S.O., Marshall, C.J., Lackwell, M., Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov., *Mycol. Res.*, 110, **2006**, 1232-1241.

87. Cadete, R.M., Santos, R.O., Melo, M.A., Mouro, A., Gonçalves, D.L., Stambuk, B.U., Gomes, F.C.O., Lachance, M.A., Rosa, C.A., *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil, *Yeast Res*, 9, **2009**, 1338-1342.

88. Lobo, F.P., Gonçalves, D.L., Alves, S.L., Gerber, A.L., Vasconcelos, A.T.R., Basso, L.C., Franco, G.R., Soares, M.A., Cadete, R.M., Rosa, C.A., Stambuk, B.U., Draft Genome Sequence of the D-Xylose-Fermenting Yeast *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A^T, *GenomeA.*, 2 (1), **2014**, e01163-13.

89. Zilinskas, A., Sereikaite, J., Stereoselective bioreduction for the resolution of racemic mixtures of bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione using vegetables, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 90, **2013**, 66–69.

90. Omori, A. T., Portas, V. B., Oliveira, C.S., Redução enzimática do 4-(dimetilamino)benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): Um experimento simples na compreensão da biocatálise, *Quim. Nova*, 35 (2), **2012**, 435-437.

91. Majewska, E., Kozłowska, M., Regio- and stereoselective reduction of trans-4-phenylbut-3-en-2-one using carrot, celeriac, and beetroot enzyme systems in an organic solvent, *Tetrahedron Lett.*, 54, **2013**, 6331-6332.

92. Noguera, C.M., Ferrari, M.M., Sanz, M.K., Orden, A.A., Deracemization of secondary alcohols by chemo-enzymatic sequence with plant cells, *J. Biotechnol.*, 160, **2012**, 189–19.

93. Comasseto, J.V., Omori, A.T., Porto, A.L.M., Andrade, L.H., Preparation of chiral organochalcogeno- α -methylbenzyl alcohols via biocatalysis. The role of *Daucus carota* root, *Tetrahedron Lett.*, 45, **2004**, 473-476.

94. Fonseca, A.M., Monte, F.J.Q., Oliveira, M.C.F., Mattos, M.C., Cordell, G.A., Filho, R.B., Lemos, T.L.G., Coconut water (*Cocos nucifera* L.) - A new biocatalyst system for organic synthesis, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 57, **2009**, 78-82.

95. Akakabe, Y., Naoshima, Y., Biotransformation of acetophenone with immobilized cells of *Carrot*, *Tobacco* and *Gardenia*, *Phytochemistry*, 35 (3), **1994**, 661-644.

96. Luna, H., Vázquez, L.H., Rey, A., Arias, L., Manjarrez, N., Ocaña, A.N., Banana and maize leaf wastes as a green alternative for the preparation of benzyl alcohols used as starting materials for fragrances, *Ind. Crop. Prod.*, 59, **2014**, 105-108.

97. Giri, A., Dhingra, V., Giri, C.C., Singh, A., Ward, O.P., Narasu, M.L., Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects, *Biotechnol. Adv.*, 19, **2001**, 175-199.

98. Bruni, R., Fantin, G., Medici, A., Pedrini, P., Sacchetti, G., Plants in organic synthesis: an alternative to baker's yeast, *Tetrahedron Lett.*, 43, **2002**, 3377-3379.

99. Hickert, L. R., Cruz, M.M., Dillon, A.J.P., Fontana, R.C., Rosa, C.A., Ayub, M.A.Z., Fermentation kinetics of acid-enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations, *Biochem. Eng. J.*, 88, **2014**, 61-67.

100. Rodríguez, P., Barton, M., Aldabalde, V., Onetto, S., Panizza, P., Menéndez, P., Gonzalez, D., Rodríguez, S., Are endophytic microorganisms involved in the stereoselective reduction of ketones by *Daucus carota* root?, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 49, **2007**, 8-11.

101. Engel, R.G., Kritz, G.S., Lampamn, G.M., Pavia, D.L., *Química Orgânica Experimental: Técnicas de escala pequena*, 3ª ed, Cengage Learning, São Paulo, pg. 268-296 e 602-605, **2013**.

102. Carletto, J.S., Carasek, E., Welz, B., Hollow-fiber liquid-liquid-solid micro-extraction of lead in soft drinks and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 84, **2011**, 989-994.

103. Schurig, V., Chiral separations using gas chromatography, *Trends Anal. Chem.*, 21 (9-10), **2002**, 647-661.

104. Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S., *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas-SP, Editora: Unicamp, pg. 203-270, **2006**.

105. Porte, A., Porte, L.H.M., Oliveira, L.M., Cromatografia gasosa quiral na resolução de enantiômeros envolvidos em flavours de frutas, *Quim. Nova*, 37 (10), **2014**, 1670-1679.

106. Ward, T.J.; Ward, K.D. Chiral Separations: Fundamental review 2010. *Analytical Chemistry*, 82 (12), **2010**, 4712-4722.

107. Schaefer, C.A., Silva, V.D., Stambuk, B.U., Nascimento, M.G., Use of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in the chemoselective bioreduction of (1*E*,4*E*)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)-1,4-

pentadien-3-one in biphasic system, *J. Braz. Chem. Soc.*, 24 (7), **2013**, 1116-1122.

108. SILVA, Vanessa Dutra, Biorredução de olefinas ativadas catalisada por leveduras e fungos em meio aquoso ou sistema bifásico, Florianópolis, **2013**, p. 90-92, (Tese de Doutorado)-Programa de Pós Graduação em Química-PPGQ, Universidade Federal de Santa Catarina.

109. Gao, S., Hemar, Y., Ashokkumar, M., Paturel, S., Lewis, G. D., Inactivation of bacteria and yeast using high frequency ultrasound treatment, *Water Res.*, 60, **2014**, 93-104.

110. Colombié, S., Gaunand, A., Lindet, B., Lysozyme inactivation under mechanical stirring: effect of physical and molecular interfaces, *Enzyme Microb. Technol.*, 28, **2001**, 820-826.

111. Surendhiran, D., Vijay, M., Sirajunnisa, A. R., Biodiesel production from marine microalga *Chlorella salina* using whole cell yeast immobilized on sugarcane bagasse, *J. Environ. Chem. Eng.*, 2, **2014**, 1294-1300.

112. Handbook of Fine Chemicals, Aldrich Advancing Science, 2007-2008.

113. Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, LTC Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 7ª. ed., cap. 2 e 3, **2007**.

114. Pedrini, P., Giovannini, P.P, Mantovani, M., Andreotti, E., Colalongo, C., Reduction screening with endophytic fungi: Synthesis of homochiral secondary alcohols, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 60 (3-4), **2009**, 145-150.

115. Blanco, R.V., Livingston, A.G., Enantioselective whole-cell biotransformation of acetophenone to *S*-phenylethanol by *Rhodotorula glutinis* Part I. Product formation kinetics and feeding strategies in aqueous media, *Biochem. Eng. J.*, 46, 2009, 44-53.

116. Rodak, M. B., Duda, E.Z., Ochab, M. K., Kafarski, P., Lejczak, B., A simple and green procedure for the microbial effective synthesis of 1-phenylethyl alcohol in both enantiomeric forms, *Biotechnol. Lett.*, 28, 2006, 511-513.

ANEXO-ESPECTROS E CROMATOGRAMAS

A.1. PREPARAÇÃO DOS ÁLCOOIS **22b,d-g**

A.1.1. 4-metóxfenilmetanol (**22b**)

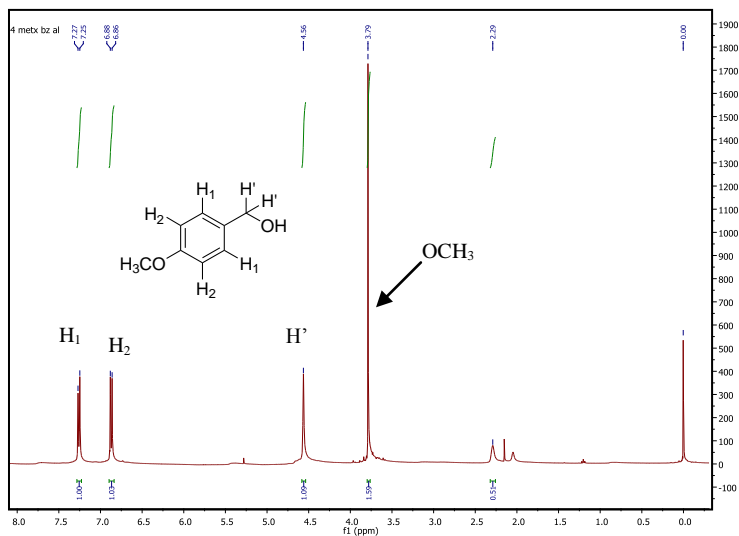


Figura 55. Espectro de RMN-1H de **22b**. [CDCl₃, 400 MHz]

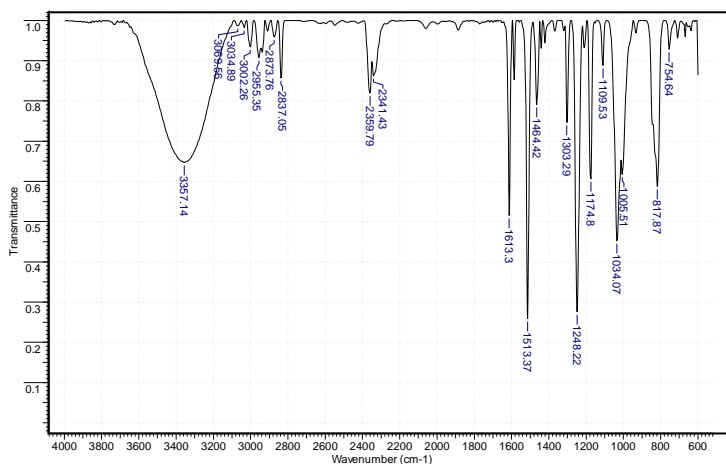


Figura 56. Espectro de IV de **22b**. [Filme sobre cela de ZnSe]

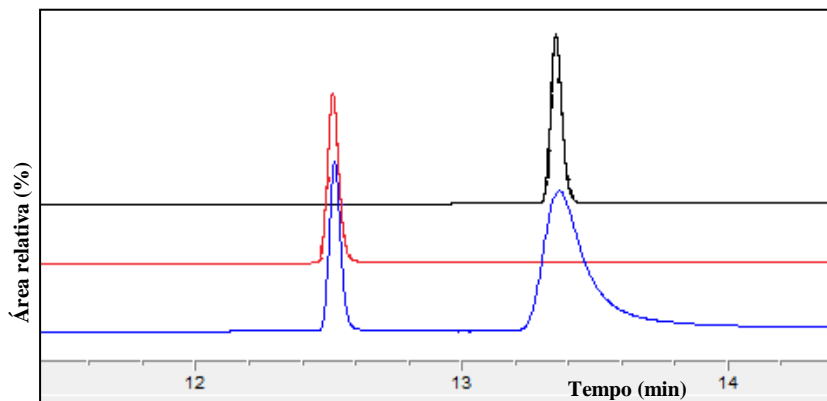


Figura 57. Sobreposição dos cromatogramas de **5b** (vermelho), **22b** (preto) e alíquota da biotransformação de **5b** com **FP** (azul). [Condições de análise de CG-quiral descritas no item 3.3.6, pg. 36-37]

A.1.2. 4-metilfenilmetanol (**22d**)

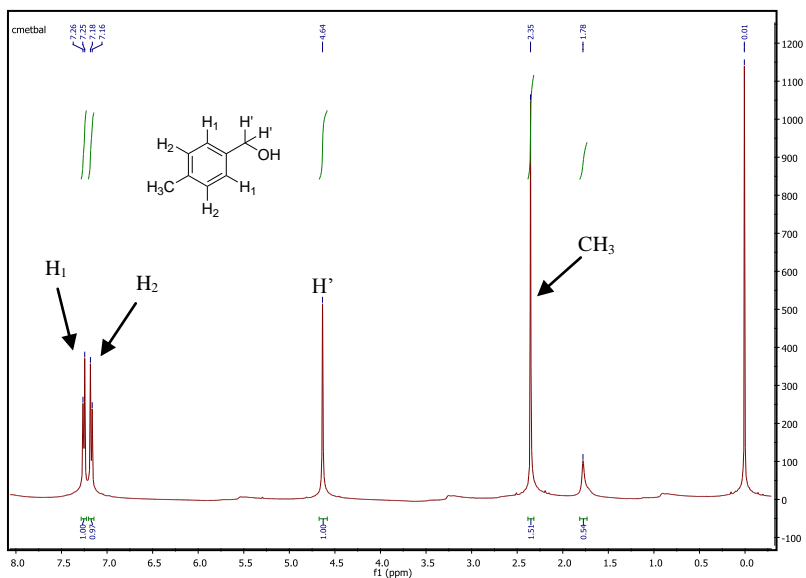


Figura 58. Espectro de RMN-¹H de **22d**. [CDCl₃, 400 MHz]

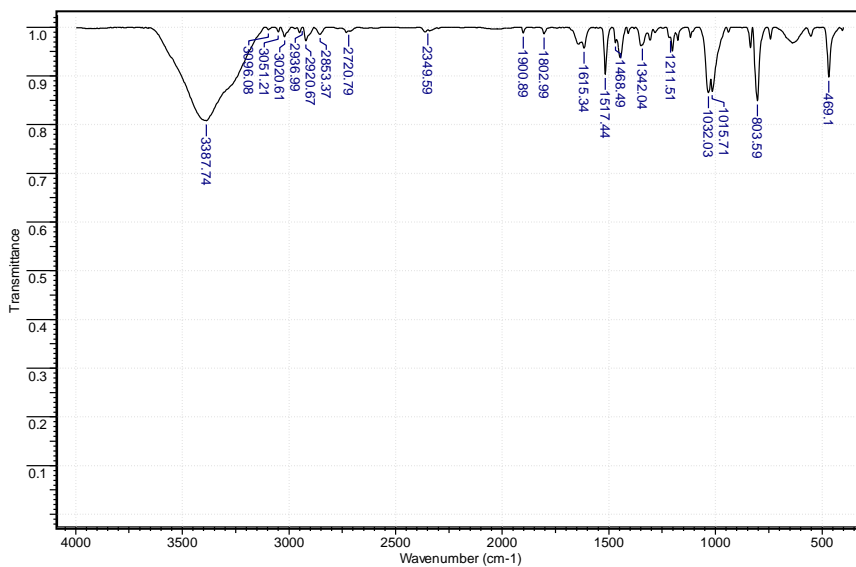


Figura 59. Espectro de IV de **22d**. [Pastilha de KBr]

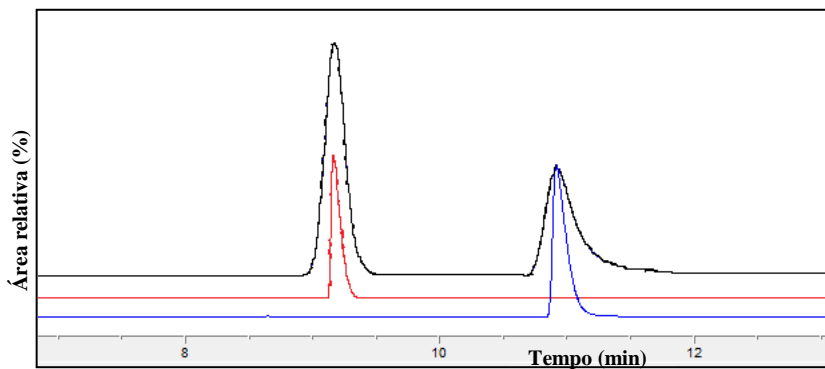


Figura 60. Sobreposição dos cromatogramas de **5d** (vermelho), **22d** (azul) e alíquota da biotransformação de **5d** com **FP** (preto). [Condições de análise de CG-quiral descritas no item 3.3.6, pg. 36-37]

A.1.2. 4-nitrofenilmetanol (**22e**)

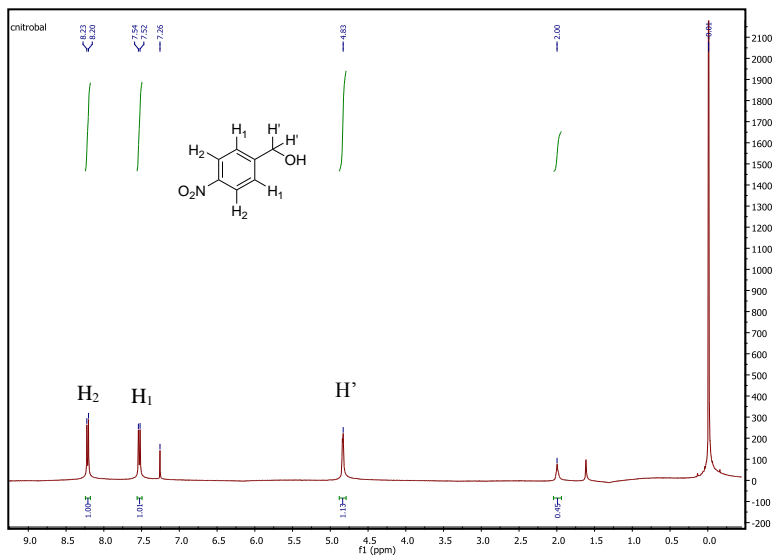


Figura 61. Espectro de RMN-¹H de **22e**. [CDCl₃, 400 MHz]

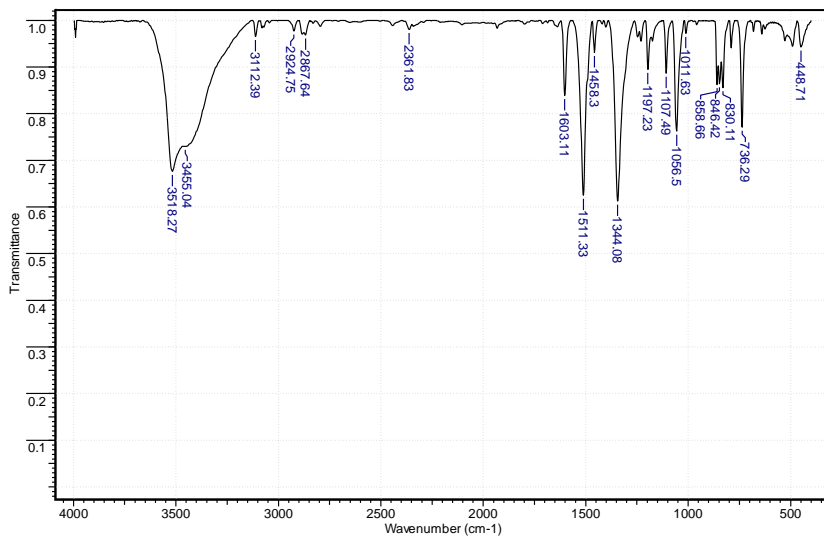


Figura 62. Espectro de IV de **22e**. [Pastilha de KBr]

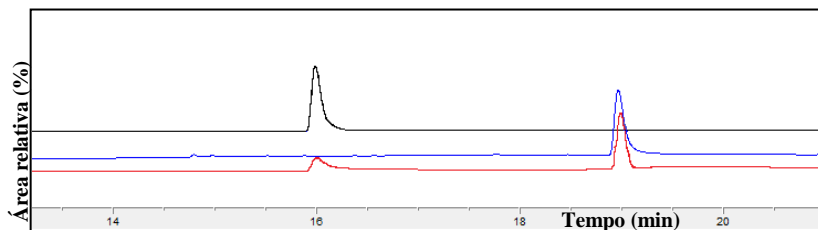


Figura 63. Sobreposição dos cromatogramas de **5e** (preto), **22e** (azul) e alíquota da biotransformação de **5e** com **FP** (vermelho). [Condições de análise de CG-quiral descritas no item 3.3.6, pg. 36-37]

A.1.2. 2-nitrofenilmetanol (**22f**)

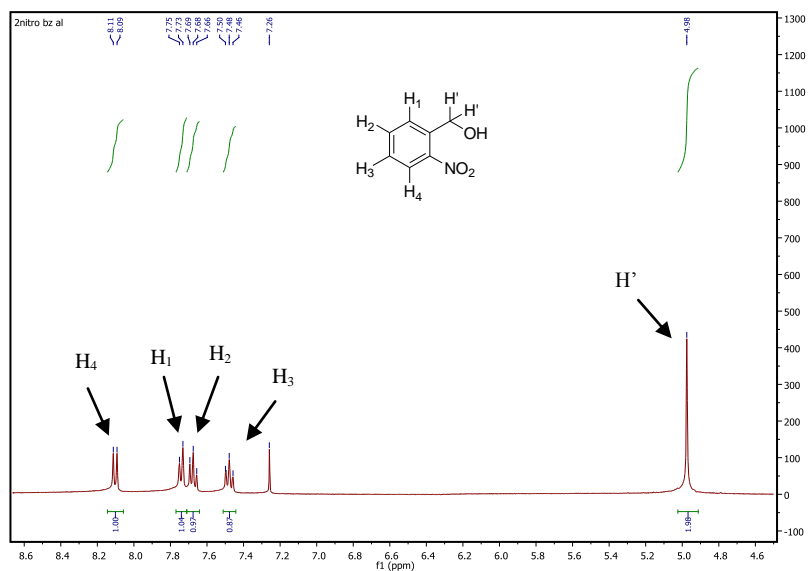


Figura 64. Espectro de RMN- ^1H de **22f** entre 4,6 e 8,6 ppm. [CDCl_3 , 400 MHz]

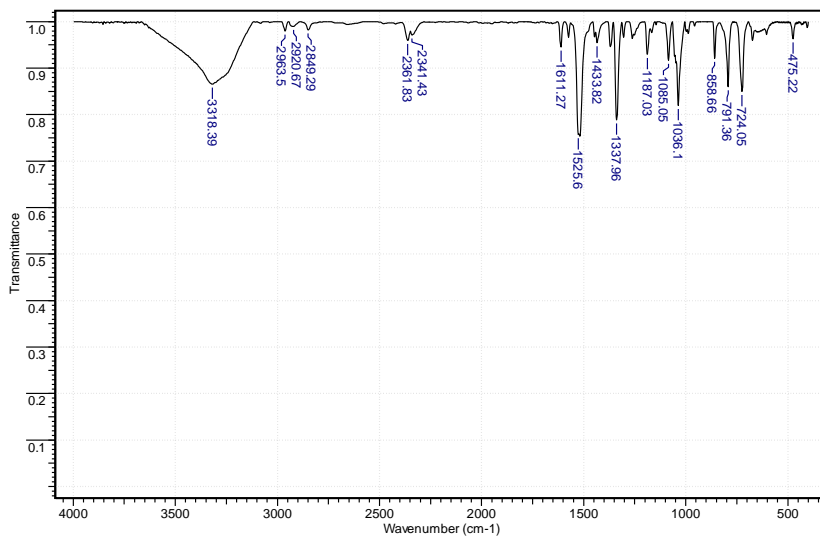


Figura 65. Espectro de IV de **22f**. [Pastilha de KBr]

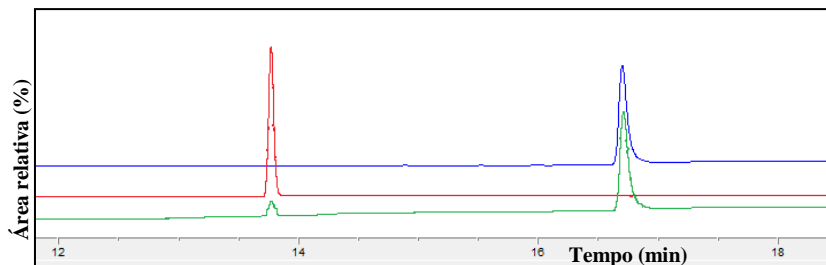


Figura 66. Sobreposição dos cromatogramas de **5f** (vermelho), **22f** (azul) e alíquota da biotransformação de **5f** com **FP** (verde). [Condições de análise de CG-quiral descritas no item 3.3.6, pg. 36-37]

A.1.2. 3-nitrofenilmetanol (**22g**)

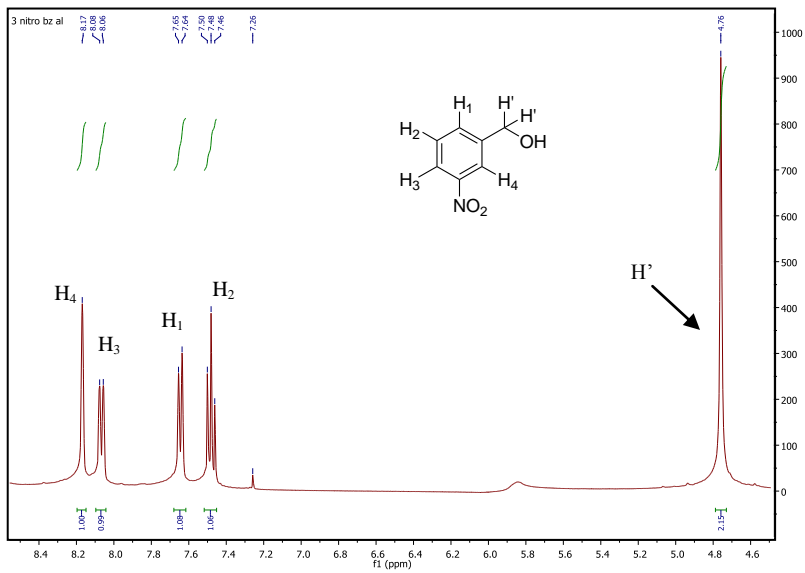


Figura 67. Espectro de RMN-¹H de **22g** entre 4,6 e 8,4 ppm. [CDCl₃, 400 MHz]

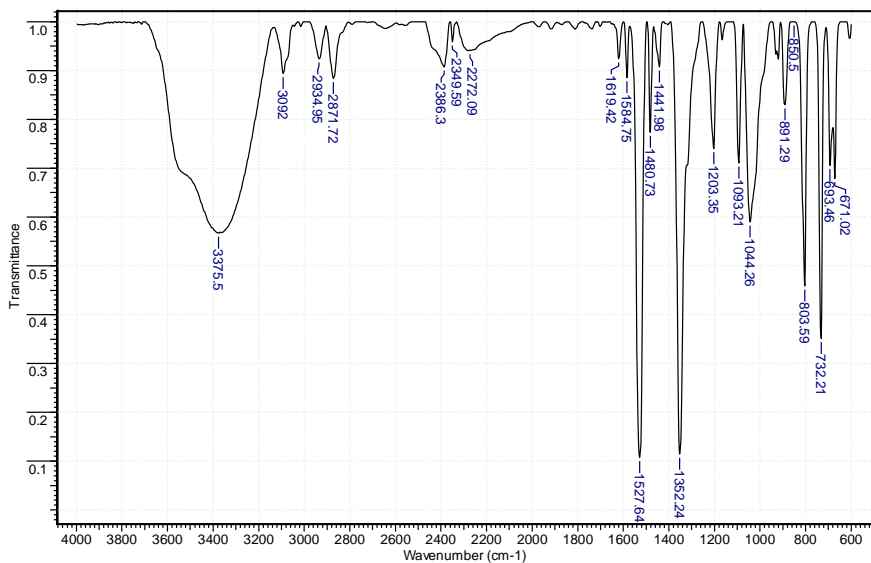


Figura 68. Espectro de IV de **22g**. [Filme sobre cela de ZnSe]

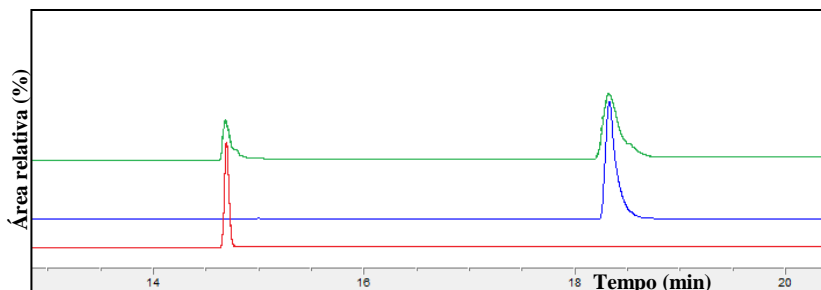


Figura 69. Sobreposição dos cromatogramas de **5g** (vermelho), **22g** (azul) e alíquota da biotransformação de **5g** com **FP** (verde). [Condições de análise de CG-quiral descritas no item 3.3.6, pg. 36-37]

A.2. PREPARAÇÃO DOS ÁLCOOIS **23a,f,g,j,k**

A.2.1. (1)-feniletanol (**23a**)

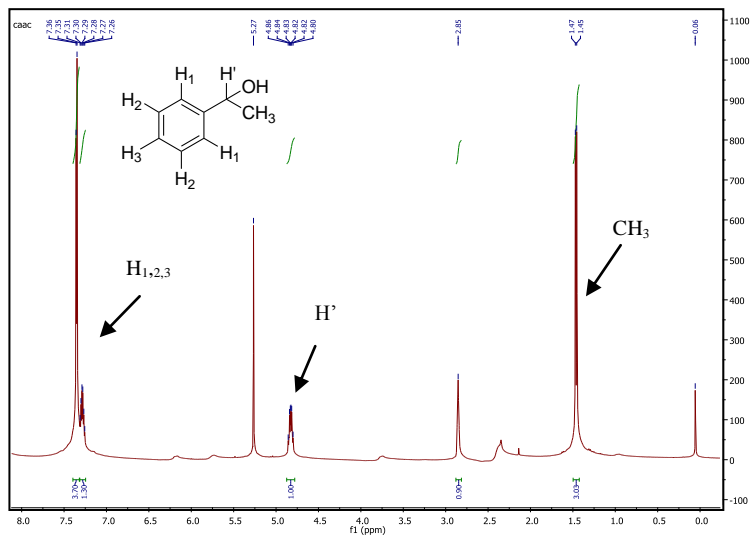


Figura 70. Espectro de RMN-¹H de **23a**. [CDCl₃, 400 MHz]

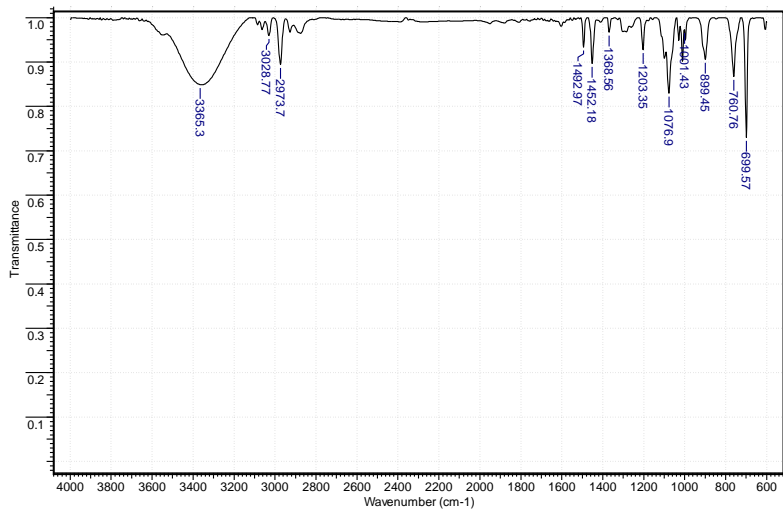


Figura 71. Espectro de IV de **23a**. [Filme sobre ceta de ZnSe]

A.2.1. 4-metóxfenil-1-etanol (**23f**)

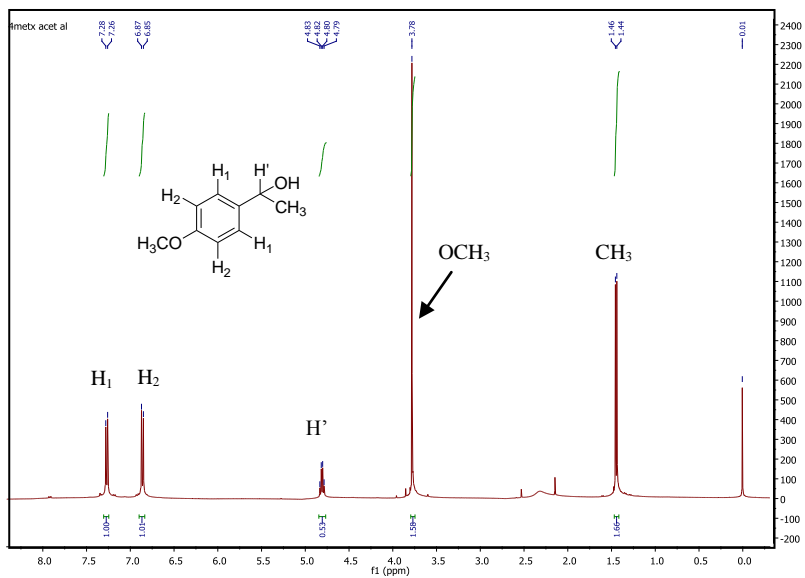


Figura 72. Espectro de RMN-¹H de **23f**. [CDCl₃, 400 MHz]

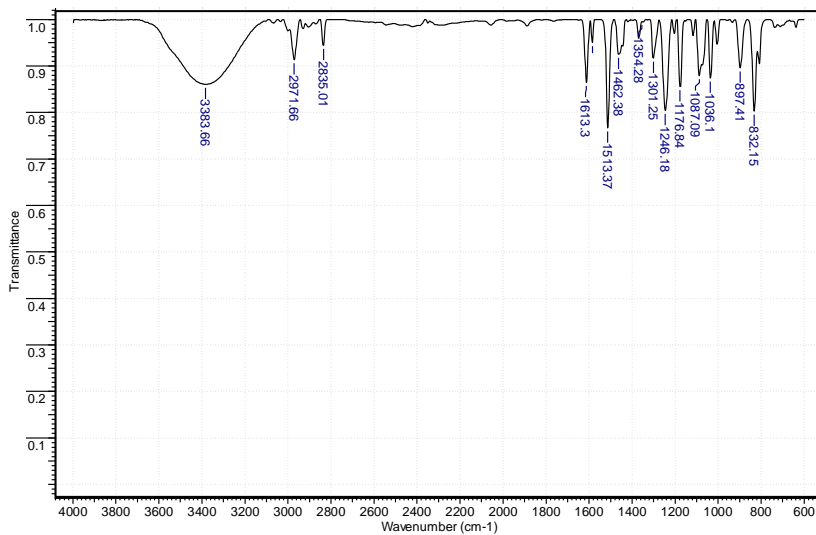


Figura 73. Espectro de IV de **23f**. [Filme sobre cela de ZnSe]

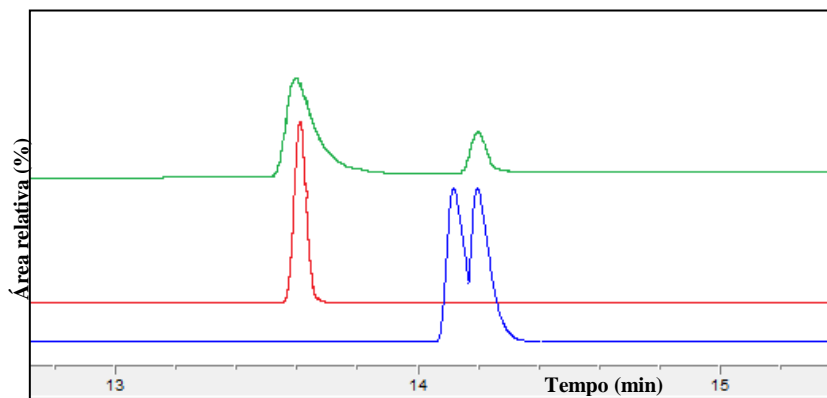


Figura 74. Sobreposição dos cromatogramas de **30f** (vermelho), **23f** (azul) e alíquota da biotransformação de **30f** com **FP** (verde). [Condições de análise de CG-quiral descritas no item 3.3.6, pg. 36-37]

A.2.1. 4-nitrofenil-1-etanol (**23g**)

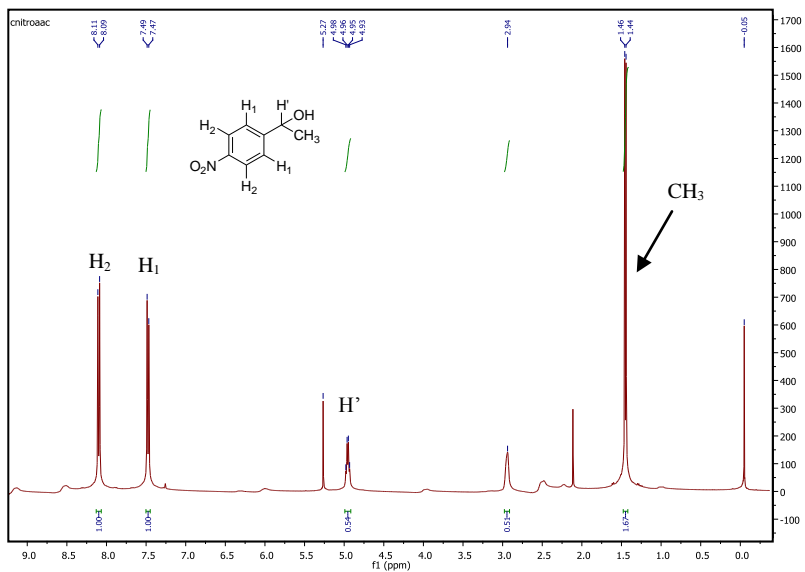


Figura 75. Espectro de RMN-¹H de **23g**. [CDCl₃, 400 MHz]

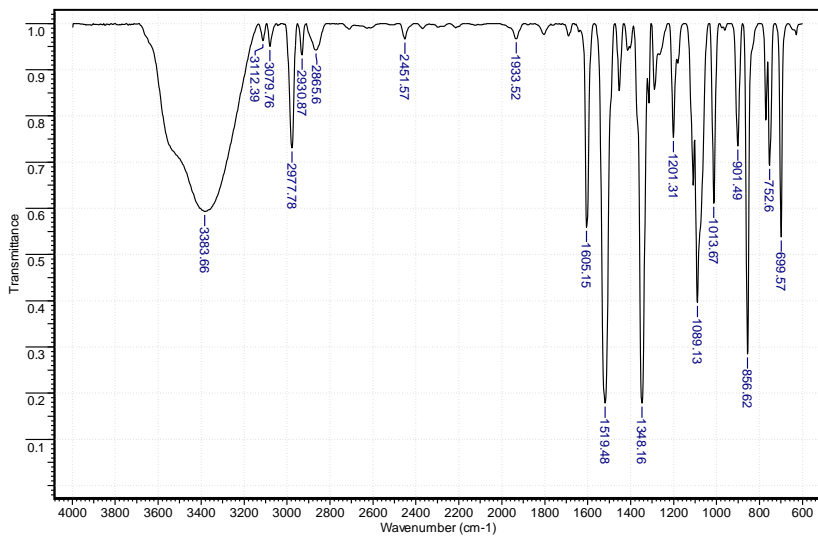


Figura 76. Espectro de IV de **23g**. [Filme sobre cela de ZnSe]

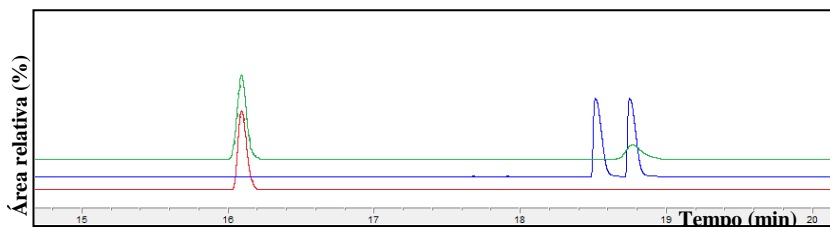


Figura 77. Sobreposição dos cromatogramas de **30g** (vermelho), **23g** (azul) e alíquota da biotransformação de **30g** com **FP** (verde). [Condições de análise de CG-quiral descritas no item 3.3.6, pg. 36-37]

A.2.1. 2-nitrofenil-1-etanol (**23j**)

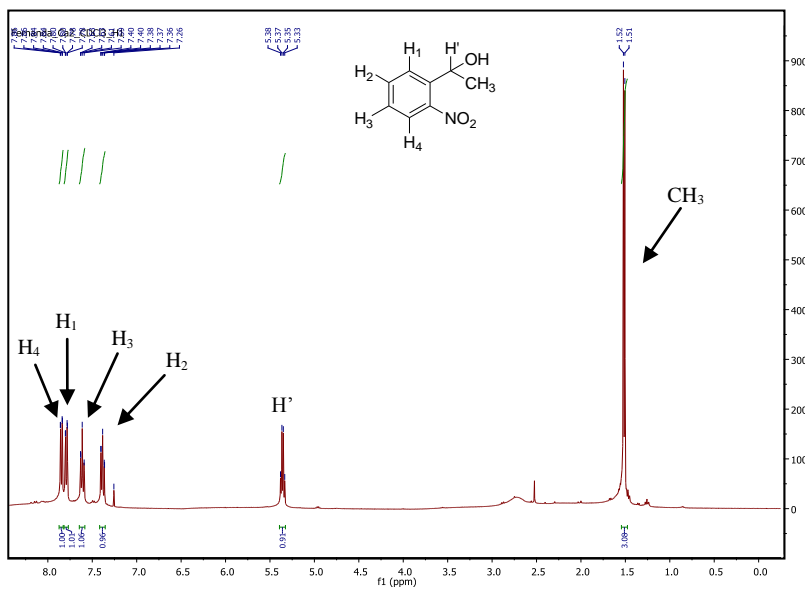


Figura 78. Espectro de RMN-¹H de **23j**. [CDCl₃, 400 MHz]

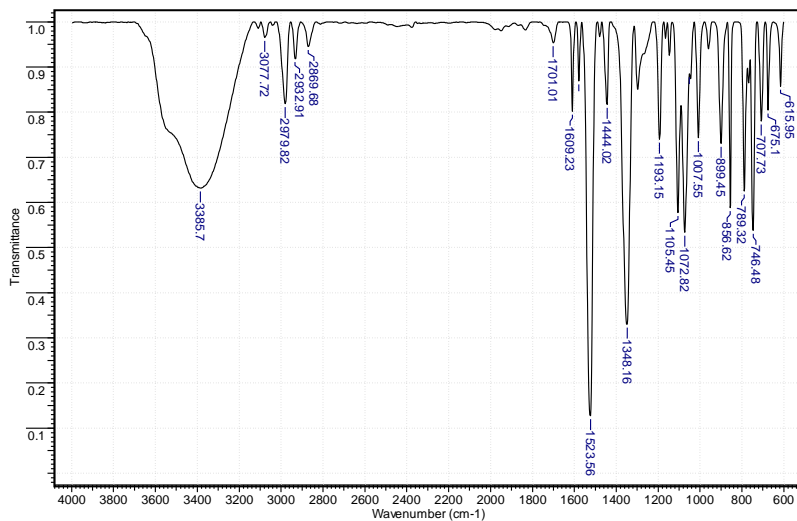


Figura 79. Espectro de IV de **23j**. [Filme sobre cela de ZnSe]

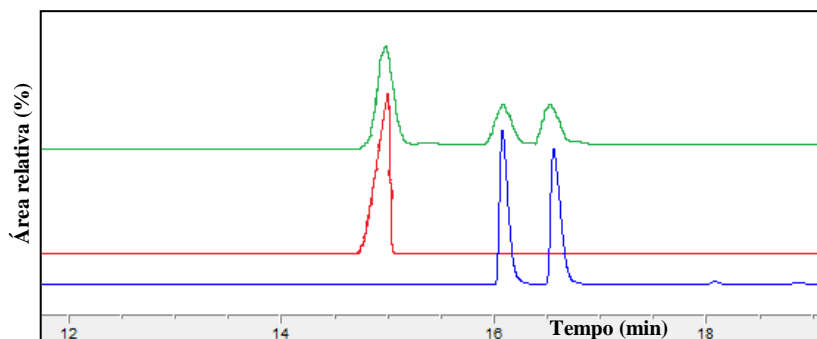


Figura 80. Sobreposição dos cromatogramas de **30j** (vermelho), **23j** (azul) e alíquota da biotransformação de **30j** com **FP** (verde). [Condições de análise de CG-quiral descritas no item 3.3.6, pg. 36-37]

A.2.1. 3-nitrofenil-1-etanol (**23k**)

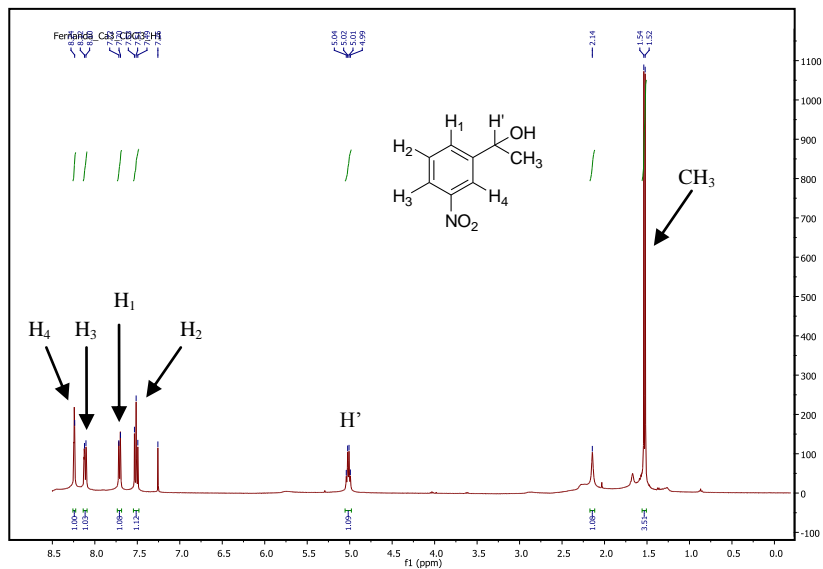


Figura 81. Espectro de RMN^{-1}H de **23k**. [CDCl_3 , 400 MHz]

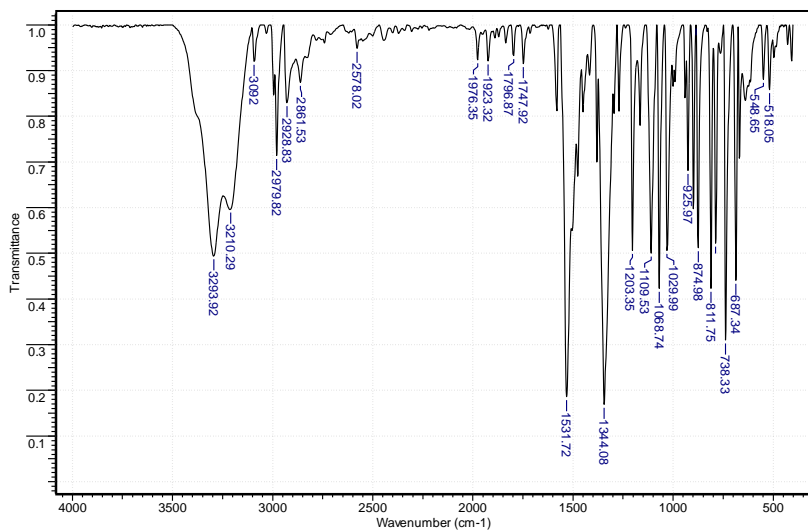


Figura 82. Espectro de IV de **23k**. [Pastilha de KBr]

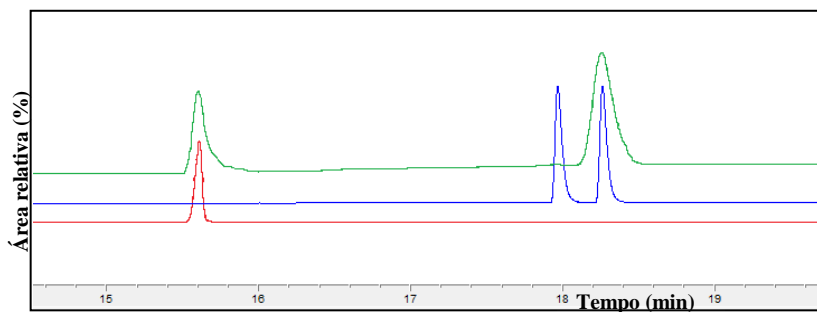


Figura 83. Sobreposição dos cromatogramas de **30k** (vermelho), **23k** (azul) e alíquota da biotransformação de **30k** com **FP** (verde). [Condições de análise de CG-quiral descritas no item 3.3.6, pg. 36-37]

