



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

Vanessa Dutra Silva

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS α,β -
INSATURADOS MEDIADA POR MICROORGANISMOS**

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
Co-orientador: Prof. Dr. Boris Ugarte Stambuk

Florianópolis, fevereiro de 2009

Vanessa Dutra Silva

**Biotransformação de compostos carbonílicos α,β -insaturados
mediado por microorganismos**

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no
Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa
Catarina

Florianópolis, 18 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Química

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
Orientadora

Prof. Dr. Boris Ugarte Stambuk
Co-orientador

Prof. Dr. Ricardo J. Nunes

Prof. Dr. Antonio C. Joussef

Prof. Dr. Josiel B. Domingos

“Não haveria criatividade sem a curiosidade que nos move e que nos põe pacientemente impacientes diante do mundo que não fizemos, acrescentando a ele algo que fazemos.”

(Paulo Freire)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas que de algum modo me ajudaram em minha vida acadêmica, e minhas desculpas aqueles que por ventura minha memória não puder lembrar.

- ✓ A Deus, que está sempre presente em minha vida.
- ✓ À minha família por todo o amor e compreensão que recebi durante toda a minha vida.
- ✓ À professora Maria da Graça Nascimento pela amizade, paciência e orientação na realização deste trabalho.
- ✓ Ao professor Boris U. Stambuk pela orientação e contribuições indispensáveis para a realização deste trabalho;
- ✓ Aos colegas e amigos do laboratório 301/306, Damianni, Marcelo, Thiago, Cristiane, Isabel, Rosana, Flávia, Geovanni, André, Simone e Kamila.
- ✓ Aos meus amigos do curso (Aline, Silvane e Magda) e principalmente ao meu namorado Jeferson, por estar sempre ao meu lado apoiando e colaborando com amor e paciência.
- ✓ Aos professores do Departamento de Química que colaboraram para minha formação acadêmica.
- ✓ Ao professor Miguel Balparda Caro e aos funcionários da central de análise pela realização das análises de RMN-¹H.
- ✓ Aos Professores Faruk Nome e Eduardo Carasek da Rocha e os doutorandos Jacks Priebe e Edmar Martendal pelas análises de CG-EM.
- ✓ Aos professores Rosendo Yunes e Ricardo Nunes pela utilização dos equipamentos em seus laboratórios.
- ✓ À Ligia C. C. Rozenbrock pelo empréstimo do bico de Bunsen.
- ✓ À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.
- ✓ Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte na realização deste trabalho.
- ✓ Ao Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo do Laboratório Especial de Micologia Médica da Universidade Federal de São Paulo pela doação da levedura *Candida glabrata* (linhagem LEMI-8228).

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVEATURA E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Enzimas	1
1.3 Classificação das enzimas.....	4
1.4 Biotransformações mediadas por microorganismos	5
1.5 Microorganismos	11
1.6 Microorganismos em meio orgânico	12
1.6.1 Proteção celular por açúcares.....	13
1.6.2 Imobilização	14
1.7 Compostos carbonílicos α,β -insaturados.....	15
1.7.1 Chalconas	16
1.8 Cromatografia gasosa.....	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
3.1 Equipamentos.....	21

3.2 Reagentes, solventes e biocatalisadores.....	21
3.3 Microorganismos e condições de cultivo	22
3.4 Procedimentos para a preparação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados 15a-i e 16	23
3.4.1 Procedimento geral para a preparação das chalconas 15a-i	23
3.4.2 Preparação da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (16)	28
3.5 Procedimento geral para a redução dos compostos carbonílicos α,β -insaturados <i>via</i> química	29
3.6 Imobilização do FP em montmorilonita K10.....	35
3.7 Biotransformação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados mediados por microorganismos	35
3.8 Determinação da conversão	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Preparação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados 15a-i e 16	38
4.1.1 Preparação das chalconas 15a-i	38
4.1.2 Preparação da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (16)	44
4.2 Redução <i>via</i> química dos substratos 15a-i e 16	49
4.3 Biotransformação das chalconas 15a-i catalisada por leveduras <i>S. cerevisiae</i>	51
4.3.1 Biotransformação da (2 <i>E</i>)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (15a).....	51
4.3.2 Estudo dos sistemas biocatalíticos.....	58
4.3.3 Influência da concentração das leveduras	60
4.3.4 Influência da agitação	63
4.3.5 Influência da temperatura.....	64
4.3.6 Influência do pH do tampão	66

4.3.7	Influência da concentração do substrato.....	67
4.3.8	Estudo da influência do solvente orgânico	69
4.3.9	Influência da variação da fase aquosa e da fase orgânica (V_{aq}/V_{org})	70
4.3.10	Influência do grupo substituinte dos anéis aromáticos A e B das chalconas 15a-i na biotransformação mediada por leveduras <i>S. cerevisiae</i> ...	72
4.4	Biotransformação da (2 <i>E</i>)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (15a) mediada pela levedura <i>C. glabrata</i>	75
4.4.1	Curvas de crescimento em diversas fontes de carbono.....	75
4.4.2	Influência da concentração de <i>C. glabrata</i> na bio-hidrogenação de 15a ...	77
4.4.3	Influência da temperatura	78
4.4.4	Influência do pH do tampão	79
4.5	Comparação do desempenho das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. glabrata</i> na reação de bio-hidrogenação da chalcona 15a	81
4.6	Biotransformação da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediadas por FP	83
5.	CONCLUSÕES	90
6.	PERSPECTIVAS	92
7.	REFERÊNCIAS.....	93
8.	ANEXO.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura cristalina da lactato desidrogenase de <i>Cryptosporidium parvum</i> complexada com ácido láctico e cofator NADH.....	2
Figura 2 - Estrutura dos cofatores NADH (1) e NADPH (2).	5
Figura 3- Reação de redução do acetoacetato de etila com diferentes microorganismos...6	
Figura 4- Representação esquemática do possível mecanismo de ação da álcool desidrogenase (A) e lactato desidrogenase (B) na redução do piruvato.	7
Figura 5- Redução assimétrica do MOAP catalisada por células de <i>Rhodotorula</i> sp AS2.2241, em sistema bifásico.....	8
Figura 6- Redução de enonas α,β -dissubstituídas com FP	9
Figura 7- Biorredução do 2-etil-hexan-2-enal com fermento de pão	10
Figura 8- Síntese quimio-enantiosseletiva do (S)-2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ol com a levedura <i>Pichia stipitis</i> adsorvida em Amberlite	10
Figura 9- Representação esquemática da proposta mecanística da redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados mediada FP	11
Figura 10- Estrutura da trealose.	13
Figura 11- Biorredução do acetoacetato de etila mediada por células de <i>S. cerevisiae</i> W303-1A em meio orgânico.....	14
Figura 12- Possibilidades reacionais dos compostos carbonílicos α,β -insaturados.....	16
Figura 13- Estrutura de algumas chalconas.	17
Figura 14- Cromatograma obtido por CG-quiral para uma alíquota da reação de bio-hidrogenação da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por FP em sistema bifásico (<i>n</i> -hexano/tampão 30/30 mL, pH 4,5), 1 h, 25 °C. [(B) chalcona 15a , (A) produto da reação de bio-hidrogenação].....	37
Figura 15- Síntese das chalconas 15a-i , via condensação aldólica básica.	38
Figura 16- Espectro de infravermelho da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona.	40
Figura 17- Cromatograma de CG-Quiral da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona em CH ₃ CN..	41
Figura 18- Espectro de RMN- ¹ H da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona.....	41

Figura 19- Cromatograma e espectros de massas da (2 <i>E</i>)-1,3-difenil-2-propen-1-ona dissolvida em CH ₂ Cl ₂	43
Figura 20- Propostas dos fragmentos para os principais picos obtidos nos espectro de massas da (2 <i>E</i>)-1,3-difenil-2-propen-1-ona.....	44
Figura 21- Síntese da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona <i>via</i> condensação aldólica básica.....	45
Figura 22- Espectro de infravermelho de 16	45
Figura 23- Cromatograma de CG-quiral da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona em CH ₃ CN	46
Figura 24- Espectro de RMN- ¹ H da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona.	47
Figura 25- Cromatograma e espectros de massas da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona, em CHCl ₃	48
Figura 26- Propostas dos fragmentos para os principais picos obtidos no espectro de massas da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona.....	49
Figura 27- Reação de redução <i>via</i> química dos compostos carbonílicos α,β-insaturados 15a-i e 16 com NaBH ₄	50
Figura 28- Prováveis produtos obtidos na biotransformação das chalconas 15a-i mediada por leveduras.....	52
Figura 29- Sobreposição dos cromatogramas da (2 <i>E</i>)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (B), do (2 <i>E</i>)-(R,S)-1,3-difenil-2-propen-1-ol (C) e do produto da reação biocatalisada (A) em CH ₃ CN.....	52
Figura 30- Cromatograma e espectro de massas da uma alíquota da reação enzimática da chalcona 15a mediada por FP em sistema bifásico.....	54
Figura 31- Propostas dos fragmentos para os principais sinais obtidos no espectro de massas de uma alíquota da reação da (2 <i>E</i>)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por FP em sistema bifásico.....	55
Figura 32- Espectro de infravermelho do produto obtido na reação de bio-hidrogenação da (2 <i>E</i>)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por FP em sistema bifásico	56
Figura 33- Espectro de RMN- ¹ H do produto obtido na reação de bio-hidrogenação da (2 <i>E</i>)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por FP em sistema bifásico.	57

Figura 34- Efeito do sistema biocatalítico na reação de bio-hidrogenação da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por FP	59
Figura 35- Valores de conversões da reação de bio-hidrogenação de 15a mediada por FP (A), CAT-1 (B) e PE-2 (C) em função do tempo com diferentes concentrações dos biocatalisadores 100 gL ⁻¹ (—▲—), 66,7 gL ⁻¹ (—●—) e 33,3 gL ⁻¹ (—■—)	61
Figura 36- Velocidade inicial da reação de bio-hidrogenação de 15a em função da concentração da levedura PE-2 (—▲—), CAT-1 (—●—) e FP (—■—).....	62
Figura 37- Efeito da agitação na reação de bio-hidrogenação de 15a mediada por FP em sistema bifásico.	63
Figura 38- Efeito da temperatura na reação de bio-hidrogenação de 15a mediada pelas leveduras FP (□), CAT-1 (▣) e PE-2 (▢) em sistema bifásico.....	65
Figura 39- Efeito do pH da solução tampão na reação de bio-hidrogenação de 15a catalisada por FP (—■—), CAT-1 (—●—) e PE-2 (—▲—).	66
Figura 40- Efeito da concentração do substrato na reação de bio-hidrogenação de 15a catalisada pelas leveduras FP (▣) CAT-1 (□) e PE-2 (▢) em sistema bifásico.....	68
Figura 41- Efeito da variação das fases aquosa e orgânica na reação de bio-hidrogenação mediada por FP em sistema bifásico.	71
Figura 42- Influência da quantidade de diclorometano adicionada na reação de bio-hidrogenação de 15a mediada por FP em sistema bifásico	73
Figura 43- Variação da concentração das células em função do tempo para o crescimento da levedura <i>C. glabrata</i> em (—■—) glicerol/EtOH, (—●—) lactato, (—▲—) glicerol e (—▼—) glicose	76
Figura 44- Efeito da concentração do biocatalisador 4,2 gL ⁻¹ (—■—), 8,3 gL ⁻¹ (—●—), 12,5 gL ⁻¹ (—▲—), 16,7 gL ⁻¹ (—▼—) e 33,3 gL ⁻¹ (—►—) na reação de bio-hidrogenação de 15a	77
Figura 45- Efeito da temperatura na reação de bio-hidrogenação de 15a mediada pela levedura de <i>C. glabrata</i> em sistema bifásico.....	78
Figura 46- Efeito do pH da solução tampão na reação de bio-hidrogenação de 15a catalisada por <i>C. glabrata</i>	79

Figura 47- Efeito do sistema biocatalítico na reação de bio-hidrogenação da 1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada pela levedura <i>Candida glabrata</i>	80
Figura 48- Desempenho das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. glabrata</i> na reação de bio-hidrogenação da chalcona 15a em sistema bifásico.....	82
Figura 49- Prováveis produtos da biotransformação da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5 difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por FP	83
Figura 50- Sobreposição dos cromatogramas da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (C), do (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ol (D) e dos produtos da reação biocatalisada por FP (A e B) em CH ₃ CN	84
Figura 51- Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da reação de bio-hidrogenação de 16 mediada por FP em sistema bifásico.....	85
Figura 52- Cromatograma e espectros de massas da uma alíquota da reação da (1,4 <i>E</i>)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por FP em sistema bifásico, 25 °C, 24 h.	86
Figura 53- Propostas dos fragmentos para os principais sinais obtidos no espectro de massas da 1,5-difenil-3-pentanona (23) e da (1 <i>E</i>)-1,5-difenil-1-penten-3-ona (22).	87
Figura 54- Efeito do sistema biocatalítico na reação de bio-hidrogenação de 16 mediada por FP , em sistema bifásico (A), com adição de trealose (B) e com adição de sacarose (C), produto 22 (—▲—), produto 23 (—●—) e substrato 16 (—■—)	89
Figura 55- Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 15a	103
Figura 56- Espectro de IV da chalcona 15a	103
Figura 57- Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 15b	104
Figura 58- Espectro de IV da chalcona 15b	104
Figura 59- Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 15c	105
Figura 60- Espectro de IV da chalcona 15c	105
Figura 61- Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 15d	106
Figura 62- Espectro de IV da chalcona 15d	106
Figura 63- Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 15e	107
Figura 64- Espectro de IV da chalcona 15e	107
Figura 65- Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 15f	108

Figura 66- Espectro de IV da chalcona 15f	108
Figura 67- Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 15g	109
Figura 68- Espectro de IV da chalcona 15g	109
Figura 69- Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 15h	110
Figura 70- Espectro de IV da chalcona 15h	110
Figura 71- Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 15i	111
Figura 72- Espectro de IV da chalcona 15i	111
Figura 73- Espectro de RMN- ¹ H de 16	112
Figura 74- Espectro de IV de 16	112
Figura 75- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 17a	113
Figura 76- Espectro de IV do álcool 17a	113
Figura 77- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 17b	114
Figura 78- Espectro de IV do álcool 17b	114
Figura 79- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 17c	115
Figura 80- Espectro de IV do álcool 17c	115
Figura 81- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 17d	116
Figura 82- Espectro de IV do álcool 17d	116
Figura 83- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 17e	117
Figura 84- Espectro de IV do álcool 17e	117
Figura 85- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 17f	118
Figura 86- Espectro de IV do álcool 17f	118
Figura 87- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 17g	119
Figura 88- Espectro de IV do álcool 17g	119
Figura 89- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 17h	120
Figura 90- Espectro de IV do álcool 17h	120
Figura 91- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 17i	121

Figura 92- Espectro de IV do álcool 17i	121
Figura 93- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 18	122
Figura 94- Espectro de IV do álcool 18	122
Figura 95- Espectro de RMN- ¹ H da dehidrochalcona 19a	123
Figura 96- Espectro de IV da dehidrochalcona 19a	123
Figura 97- Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da biotransformação de 15b	124
Figura 98- Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da biotransformação de 15c	124
Figura 99- Espectro de RMN- ¹ H da de uma alíquota da biotransformação de 15d	125
Figura 100- Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da biotransformação de 15e	125
Figura 101- Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da biotransformação de 15f	126
Figura 102- Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da biotransformação de 15g	126
Figura 103- Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da biotransformação de 15h	127
Figura 104- Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da biotransformação de 15i	127
Figura 105- Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da biotransformação de 16	128

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Condições de programação do CG-quiral e CG-EM.....	36
Tabela 2- Dados analíticos das chalconas 15a-i	39
Tabela 3- Dados analíticos para os álcoois 17a-i e 18	50
Tabela 4- Efeito do solvente orgânico na reação de bio-hidrogenação da chalcona 15a mediada por FP em sistema bifásico.....	69
Tabela 5- Bio-hidrogenação das chalconas 15a-i mediada por leveduras <i>S. cerevisiae</i> em sistema bifásico.....	74

LISTA DE ABREVEATURA E SÍMBOLOS

- α = Alfa
- β = Beta
- γ = Gama
- $[\alpha]_D$ = Rotação ótica específica
- C. glabrata** = Candida glabrata
- CAT-1** = Levedura de Saccharomyces cerevisiae modificada
- CCD** = Cromatografia de camada delgada
- CD** = Ciclodextrina
- CDCl₃** = Clorofórmio deuterado
- CG** = Cromatografia gasosa
- CG-EM** = Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa
- Cgl** = Candida glabrata
- CG-quiral** = Cromatografia gasosa de fase quiral
- Da** = Dalton
- E.C.1.1.1.1** = Classificação da L-(S)-lactato desidrogenase
- E.C.1.1.1.27** = Classificação da álcool desidrogenase
- ee.** = Excesso enantiomérico
- FP** = Fermento de pão comercial
- IV** = Infravermelho
- K10** = montmorilonita K10
- log P** = Logaritmo do coeficiente de partição
- MHz** = Mega Hertz (10⁶ Hertz)
- NADH** = Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADPH** = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- PE-2** = Levedura de Saccharomyces cerevisiae modificada
- pf** = Ponto de fusão
- R_f** = Fator de retenção
- RMN-¹H** = Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- S. cerevisiae** = Saccharomyces cerevisiae
- TMS** = Tetrametilsilano
- t_R** = Tempo de retenção
- UIBBM** = União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
- YP** = Meio de cultura
- β -CD** = Beta-ciclodextrinas
- δ = Deslocamento ou delta

RESUMO

Neste trabalho foi sintetizada uma série de chalconas (**15a-i**) e a (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (**16**), por condensação aldólica catalisada por base. Estes compostos foram utilizados como substratos nas reações de biotransformação mediadas pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão, **FP**, e linhagens industriais **CAT-1** e **PE-2**) e *Candida glabrata*, em meio orgânico ou em sistema bifásico. Os compostos carbonílicos α,β -insaturados foram obtidos com bons rendimentos (50-94%) e foram totalmente caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN-¹H, IV e ponto de fusão. Estes, foram reduzidos com NABH₄ para a obtenção dos álcoois racêmicos, que foram utilizados como padrões nas análises cromatográficas. A biotransformação destes compostos catalisada pelas leveduras foi quimiosseletiva, formando apenas a correspondente cetona saturada. Utilizando as leveduras *S. cerevisiae* na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a**, foram avaliados diversos parâmetros reacionais tais como o sistema biocatalítico, concentração de levedura, agitação, temperatura, pH, concentração do substrato, solvente orgânico e volumes das fases aquosa e orgânica. Avaliou-se também o efeito de grupos substituintes dos anéis A e B das chalconas **15a-i**. Com a levedura *C. glabrata*, estudou-se a influência da concentração celular, temperatura, pH e do sistema biocatalítico. As maiores conversões em produto (**19a**), foram obtidas nas reações mediadas pelas leveduras *S. cerevisiae* em sistema bifásico, com agitação magnética, na faixa de 30-45 °C e em pH acima de 5,5. As concentrações celulares e do substrato influenciaram significativamente nas conversões. Os solventes orgânicos com log P > 3,2 (hexano, heptano) foram os mais adequados e o aumento do volume da fase aquosa foi importante para manter as atividades catalíticas das enzimas. Utilizando a levedura *C. glabrata*, as condições ótimas para a bio-hidrogenação da chalcona **15a** foram a 25 °C, pH 5,5, concentração celular de 16,7 gL⁻¹, sendo o sistema bifásico o método de proteção e/ou imobilização mais eficiente. Os efeitos dos substituintes dos anéis A e B das chalconas **15a-i** são, em geral, pequenos e não foi observado correlação dos grupos doadores e retiradores de elétrons. Usando as mesmas condições experimentais, as quatro leveduras formaram a dehidrochalcona **19a** quimiosseletivamente em 24 h de reação (~50%). Portanto, estas as leveduras apresentaram um grande potencial para serem utilizadas como biocatalisadores na hidrogenação de ligações duplas carbono-carbono ativadas. O produto da biotransformação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por **FP** foi dependente do sistema biocatalítico. Em sistema bifásico, o produto majoritário foi a 1,5-difenil-3-pentanona (**23**) em 24 h (> 99%). Com a adição de trealose e sacarose no meio reacional, obteve-se a formação de dois produtos, sendo estes a (1*E*)-1,5-difenil-1-penten-3-ona (**22**) e a **23**. Concluindo, o uso de microorganismos como biocatalisadores na biotransformação de compostos carbonílicos α,β -insaturados em sistema bifásico mostra-se uma alternativa viável para a obtenção de cetonas saturadas, sendo usadas condições brandas de reação, reagentes de custo relativamente baixo além de ser um método menos poluente para o meio ambiente.

Palavras-chave: compostos carbonílicos α,β -insaturados; microorganismos; sistema bifásico.

ABSTRACT

In this study, a series of chalcones (**15a–j**) and (1*E*,4*E*)-1,5-diphenyl-1,4-pentadien-3-one (**16**) were synthesized by base catalyzed aldol condensation. These compounds were used as substrates in biotransformation reactions mediated by *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast, **BY**, and industrial strains **CAT-1** and **PE-2**) and *Candida glabrata* yeasts, in organic media or in biphasic systems. The α,β -unsaturated carbonyl compounds were obtained with good yield (50-94%) and were fully characterized by ^1H NMR and IR spectroscopy and melting point. The compounds were reduced with NaBH_4 to obtain racemic alcohols, used as standards in chromatography analysis. The biotransformation of these compounds, catalyzed by yeasts, was chemoselective, and formed only the corresponding saturated ketones. Using *S. cerevisiae* in the bio-hydrogenation of the chalcone **15a**, several reaction parameters were evaluated: biocatalytic system, yeast concentration, shaking rate, temperature, pH, substrate concentration, organic solvent and volume of aqueous and organic phases. The influence of substituent groups on rings A and B of chalcones **15a–i** was also considered. The highest values for percent conversion to product (**19a**) were obtained in the reactions mediated by *S. cerevisiae* yeast in biphasic systems, with magnetic stirring, at 30-45 °C and pH above 5.5. The cellular and substrate concentrations strongly influenced the conversion rates. The organic solvents with $\log P > 3.2$ (hexane, heptane) were the most appropriate, and an increase in the aqueous phase was important to retain the enzymes catalytically active. Using the *C. glabrata* yeast, the best conditions for the reduction of chalcone **15a** were 25 °C, pH 5.5, and cellular concentration of 16.7 gL^{-1} , and the most efficient protection and/or the immobilization was obtained using the biphasic system. The influence of substituents on rings A and B of chalcones **15a–i** was, in general, low and no correlation between the donor and withdrawing electrons groups was observed. Using the same experimental conditions, the four yeasts formed the dehydrochalcone **19a** in a chemoselective process in 24 h of reactions (~50%). Thus, the *S. cerevisiae* and *C. glabrata* yeasts presented a great potential to be used as biocatalysts in the hydrogenation of activated carbon-carbon double bonds. The biotransformation product of (1*E*,4*E*)-1,5-diphenyl-1,4-pentadien-3-one mediated by **BY** was also dependent on the catalytic system. In a biphasic system, the major product obtained was 1,5-diphenyl-3-pentanone (**23**) after 24 h (>99%). With addition of trehalose or sucrose to the reaction medium, two products were obtained, these being (1*E*)-1,5-diphenyl-1-penten-3-one (**22**) and **23**. In conclusion, the use of microorganisms as biocatalysts in the biotransformation of α,β -unsaturated carbonyl compounds is a viable alternative to obtain saturated ketones, with mild reaction conditions, low cost reagents and low environmental pollution.

Keywords: α,β -unsaturated carbonyl compounds; microorganism; biphasic system.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

As transformações microbianas e em particular aquelas mediadas por fermentos, tem sido largamente empregadas desde os primórdios da humanidade para a produção de pão, laticínios e de bebidas alcoólicas. Todas as aplicações deste o início usavam culturas de microorganismos mistos, e dirigidas para operações biotecnológicas em áreas da agricultura e nutrição humana. Foi L. Pasteur em 1862 quem estabeleceu a base científica destas antigas aplicações, principalmente com relação à oxidação do álcool etílico ao ácido acético usando uma cultura pura de *Bacterium xylinum*. A redução do furfural ao álcool furfurílico em condições anaeróbicas de fermentação na presença de fermento vivo foi a primeira “redução fitoquímica” de uma molécula orgânica. Uma condensação aciloínica envolvendo benzaldeído realizada na década 1910-1920, teve aplicação industrial na síntese da (-)-efedrina, constituindo-se no primeiro processo industrial combinando síntese microbiológica e química.¹

Apesar da extraordinária especificidade da catálise enzimática ter sido reconhecida há muito tempo, apenas recentemente tem sido aplicada na transformação seletiva de substratos não naturais, principalmente na produção de compostos quirais enantiomericamente puros. Atualmente, é amplamente reconhecido que compostos biologicamente ativos usados como medicamentos não devem ser empregados como racematos. Além disso, cada vez com mais intensidade, há uma absoluta necessidade de se desenvolver reagentes e processos ambientalmente compatíveis, uma das razões pelas quais os biocatalisadores tiveram este notável desenvolvimento nos últimos anos.¹

1.2. Enzimas

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária

especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem.²

Toda a enzima possui um sítio ativo, o qual constitui somente uma pequena porção do volume total e que está usualmente próximo ou na superfície, de forma a estar acessível às moléculas de substratos. O sítio ativo contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato. Em certos casos, estudos de difração de raios X têm revelado na enzima uma pequena área ou fissura claramente definida, na qual o substrato, ou mesmo parte dele, pode se fixar.^{2,3}

A **Figura 1** mostra uma representação esquemática da estrutura cristalina da lactato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum* complexada com ácido láctico e cofator **NADH**.⁴

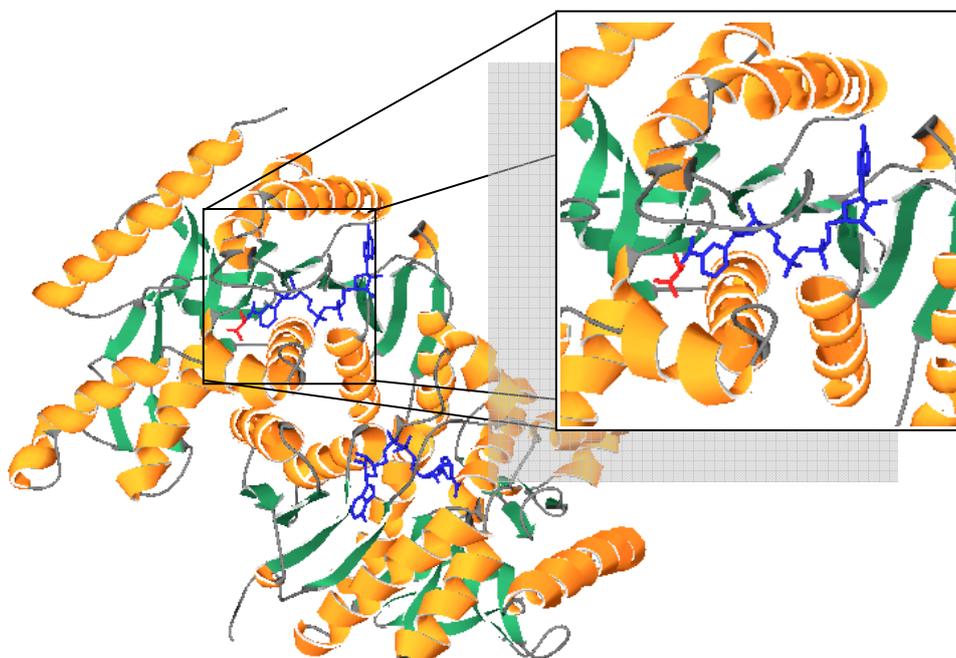


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura cristalina da lactato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum* complexada com ácido láctico e cofator **NADH**.⁴

Diferentemente de outras proteínas, as enzimas possuem atividade catalítica. Isto significa que simplesmente com a sua presença, e sem serem consumidas durante o processo, elas conseguem acelerar os processos químicos

que de outra maneira ocorreriam muito lentamente ou não totalmente. Ao contrário de catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais e óxidos metálicos as enzimas são muito específicas. Por apresentarem tais propriedades, elas têm sido amplamente utilizadas em síntese orgânica.^{5,6,7,8,9} As vantagens de se utilizá-las como catalisadores são:

- As velocidades das reações catalisadas por enzimas são maiores por fatores de 10^6 a 10^{18} vezes do que as correspondentes não catalisadas. Para organismos vivos, aumentos de velocidade desta ordem de grandeza são importantes, pois permite que as reações ocorram com velocidades razoáveis mesmo nas condições normais que existem nas células vivas (isto é, pH aproximadamente neutro e temperatura na ordem de 20-35 °C).^{2,5}

- As reações enzimáticas, ao contrário das catalisadas por catalisadores químicos, ocorrem em condições relativamente suaves: pressão atmosférica, temperaturas abaixo de 100 °C e pH neutro.^{2,7}

- São quirais e podem apresentar alta enantiosseletividade.^{9,10,11}

Porém, o uso destes biocatalisadores ainda apresenta algumas desvantagens, tais como:

- São encontrados na natureza somente em uma forma enantiomérica, a forma L.

- Requerem controle dos parâmetros reacionais, tais como de temperatura e pH.

- Apresentam uma maior atividade catalítica em água;

- São propensos a sofrerem inibição por agentes químicos e físicos.

- Podem causar alergias.

Nos últimos anos tais desvantagens têm sido bastante amenizadas pelo aperfeiçoamento e desenvolvimento de diversas técnicas para reações biocatalíticas. Quando o processo não for satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem influenciar tanto a estereoquímica quanto a enantiosseletividade.

As modificações mais comuns envolvem o uso de solventes orgânicos, adição de inibidores, técnicas de imobilização, utilização de enzimas mais resistentes (extremoenzimas) e/ou uso de líquidos iônicos.^{7,11,12,13,14}

1.3. Classificação das enzimas

No Banco de Dados de Proteínas (**PDB**), encontram-se catalogados 55419 tipos de macromoléculas (entre proteínas, peptídeos, vírus, carboidratos, ácidos nucleicos e complexos proteína/ácido nucleico). Várias enzimas têm sua seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional determinada através de cristalografia de raios-X e RMN-²D.^{2,3,4}

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (**IUBMB**) divide as enzimas em seis grandes classes, de acordo com o tipo de reação que catalisa, são elas as oxidorreduções, transferases, hidrolases, isomerases, liases e ligases.^{2,11}

Neste trabalho, serão utilizadas as oxidorreduções como biocatalisadores na biotransformação de compostos carbonílicos α,β -insaturados. A seguir serão apresentadas as propriedades destas enzimas e os tipos de reações que catalisam.

As oxidorreduções são classificadas dentro de três categorias: desidrogenases (ou redutases), oxigenases e oxidases.^{11,15} Elas formam um grupo de enzimas que tem sido muito usado na redução de grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas (C=O),^{16,17} da ligação dupla carbono-carbono (C=C)^{18,19,20,21,22}, e mais recentemente na redução assimétrica de aril iminas (C=N).²³ Devido a capacidade de converter substratos pró-quirais em produtos quirais opticamente puros, as oxidorreduções tem sido valiosas ferramentas para a síntese orgânica.^{11,24,25}

As enzimas da classe das desidrogenases são as que substituem o borohidreto de sódio nas reações de redução da carbonila e da ligação dupla carbono-carbono. Para tal, elas requerem como cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma reduzida (**NADH, Figura 2**) ou nicotinamida adenina

dinucleotídeo fosfato - forma reduzida (**NADPH**, **Figura 2**), que tem um alto custo. Para contornar este problema o uso de microorganismos vivos íntegros tem sido utilizado para catalisar estas reações em química orgânica.²⁶

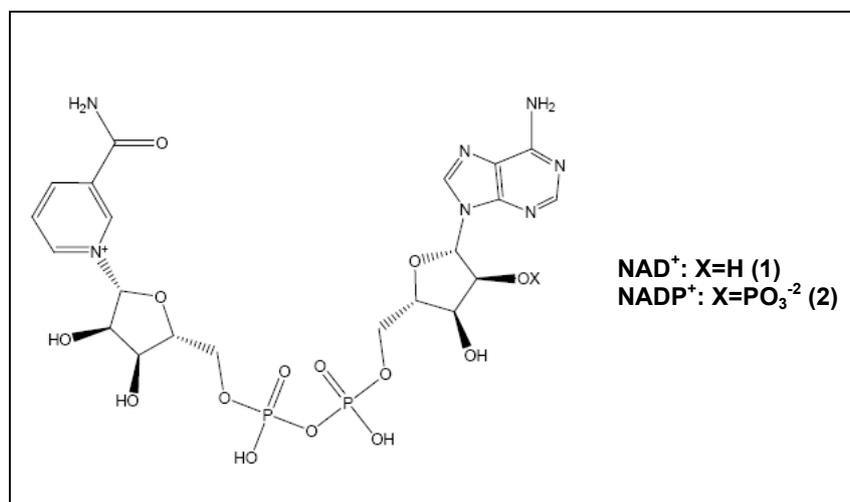


Figura 2 - Estrutura dos cofatores **NADH** (1) e **NADPH** (2).

As células íntegras de microorganismo vem sendo muito utilizadas na produção de sintons quirais, devido a capacidade de catalisar reações com alta quimio, regio e enantiosseletividade. As vantagens das reações catalisadas por microorganismos são principalmente a alta estereosseletividade e o uso de condições reacionais brandas, tais como temperatura ambiente e pressão atmosférica, as quais minimizam os problemas de isomerização, racemização, epimerização e rearranjos que podem ocorrer durante os processos químicos.^{11,24}

1.4 Biotransformações mediadas por microorganismos

Como citado anteriormente os microorganismos tem a capacidade de reduzir grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas e da ligação dupla carbono-carbono. Cada uma das reações será exemplificada a seguir com os respectivos mecanismos das enzimas que as catalisam.

Como exemplo de redução de grupos carbonílicos, pode-se citar o trabalho desenvolvido por Ribeiro e col., onde eles realizaram a redução enantiosseletiva

do acetoacetato de etila (**3**) mediada por cinco diferentes microorganismos (**Figura 3**). Eles observaram que dependendo do microorganismo utilizado o álcool obtido apresentava configuração absoluta *R* ou *S*. Por exemplo, a *Hansenula* sp e *Aspergillus niger* formaram os enantiômeros *S*-(**4**) e *R*-(**4**) com 81 e 30% de excesso enantiomérico, respectivamente.¹⁶

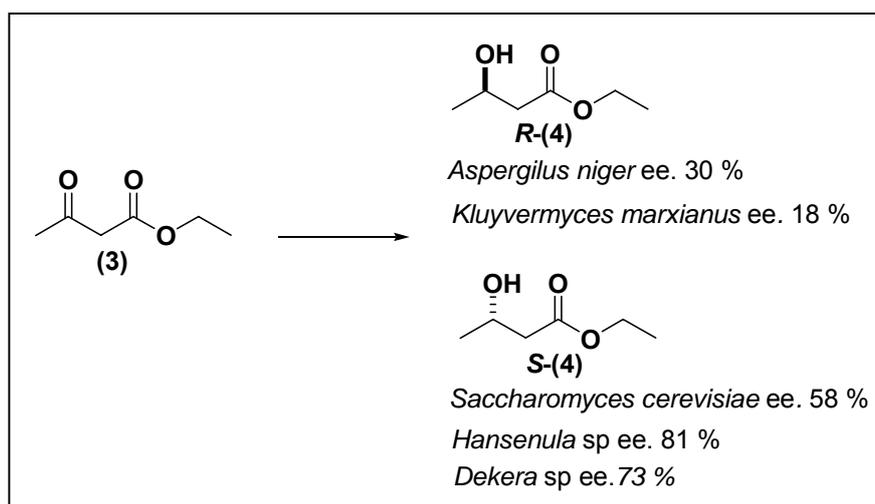


Figura 3- Reação de redução do acetoacetato de etila com diferentes microorganismos.¹⁶

Estas reações são catalisadas por enzimas (no interior do microorganismo) pertencentes à classe das desidrogenases, e são a L-(*S*)-lactato desidrogenase (E.C. = 1.1.1.27) e a álcool desidrogenase (E.C. = 1.1.1.1). As enzimas reduzem o substrato utilizando como cofator **NADH**, onde este entrega os equivalentes redutores para o substrato e sai na forma oxidada (**NAD⁺**), como é demonstrado no mecanismo a seguir quando estas enzimas reduzem os substratos naturais (estão mostrados apenas os aminoácidos que participam do sítio ativo da enzima) (**Figura 4**).^{11,26}

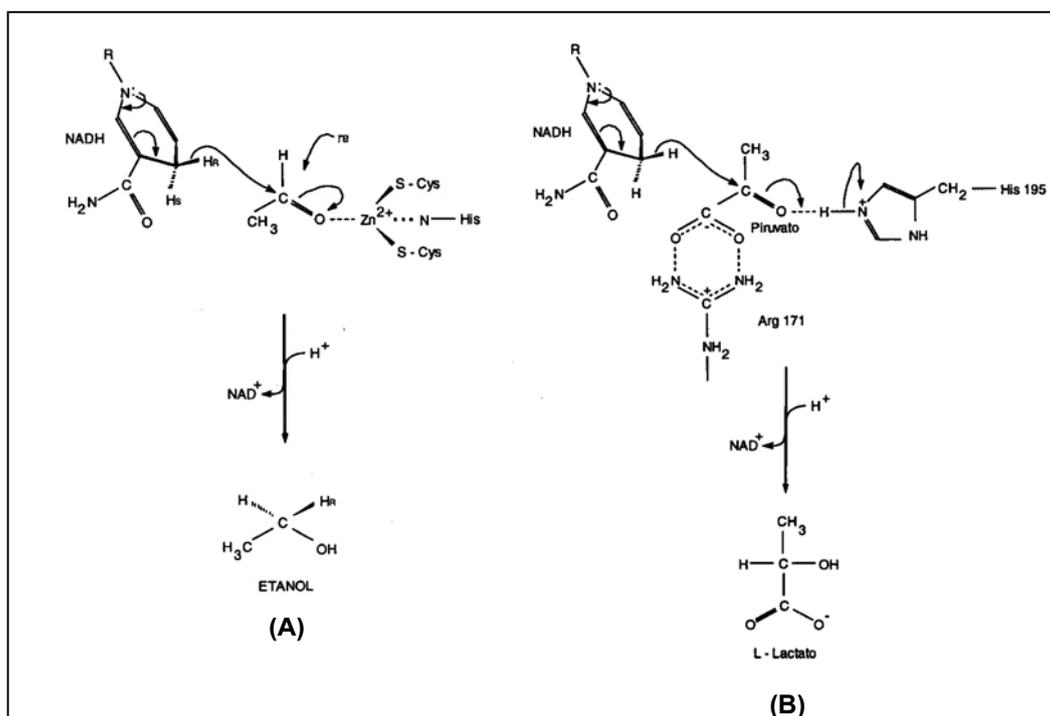


Figura 4- Representação esquemática do possível mecanismo de ação da álcool desidrogenase (A) e lactato desidrogenase (B) na redução do piruvato.

Além de redução de β -cetoésteres que são substratos muito semelhantes ao piruvato e que é um substrato natural das desidrogenases, os microorganismos também apresentam a capacidade de reduzir outros compostos carbonílicos tais como as acetofenonas e seus derivados.^{27,28}

Recentemente Wang e col. estudaram a redução assimétrica da 4'-metoxiacetofenona (**MOAP**) catalisada por células de *Rhodotorula* sp. AS2.2241 imobilizada em alginato de sódio em sistema bifásico contendo líquido iônico/solvente orgânico (**Figura 5**). Foi verificado que as células imobilizadas converteram o produto com mais eficiência quando comparadas com as livres, e que em sistema bifásico tampão/líquido iônico os problemas de inibição foram bem menores quando comparados com o monofásico aquoso.²⁸

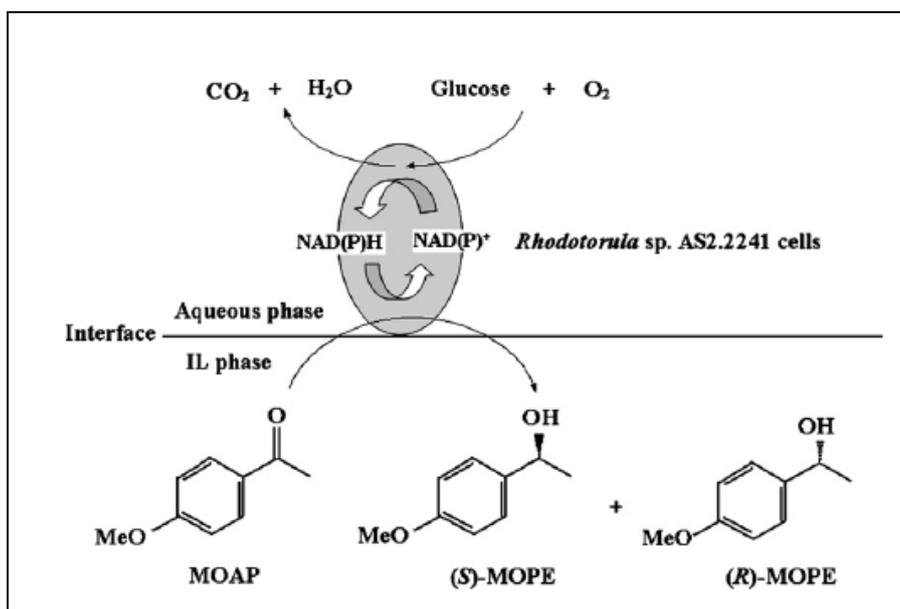


Figura 5- Redução assimétrica do **MOAP** catalisada por células de *Rhodotorula* sp AS2.2241, em sistema bifásico.²⁸

Está bem documentado na literatura que além das reações de redução de carbonilas, que são várias, as desidrogenases no interior dos microorganismos podem reduzir ligações duplas ativadas com grupos polarizados tais como nitro, carbonilas ou hidroxilas.^{11,29}

As enzimas responsáveis por estas reações são as enonas redutases dependentes de **NADH**, que podem ser encontradas em muitos microorganismos tais como *Clostridia*, *Proteus* sp e *S. cerevisiae* (fermento de pão, **FP**).¹¹

A capacidade do **FP** em reduzir assimetricamente ligações duplas carbono-carbono ativada foi descoberta em 1934, e desde esta data vários estudos vem sendo desenvolvidos visando melhorar a seletividade destas reações.¹¹

A biotransformação de compostos carbonílicos α,β -insaturados mediada por microorganismos, em muitos casos, pode resultar em uma mistura de cetona ou aldeído saturado, álcool saturado ou álcool alílico, devido ao fato das diferentes enzimas presentes nas células.^{11,19,30}

Kawai e col. estudaram a redução assimétrica de cetonas α,β -insaturadas com **FP** (**Figura 6**). Eles observaram que o produto majoritário formado na biotransformação do 3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona (**5a**) com **FP** foi (S)-(+)-3-metil-

4-fenil-2-butanona (**6a**) com 42% de rendimento e 71% de excesso enantiomérico. Em menor quantidade foi observado o 3-metil-4-fenil-3-buten-2-ol (**7a**) e o 3-metil-4-fenil-2-butanol (**8a**), com rendimentos de 3 e 9%, respectivamente.¹⁹

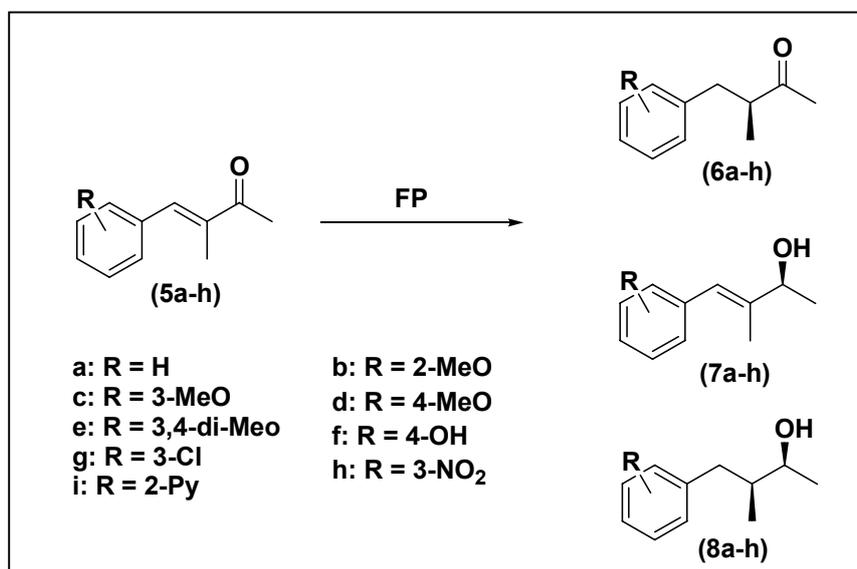


Figura 6- Redução de enonas α,β -dissubstituídas com FP.¹⁹

Foi também observado que a estereosseletividade da redução da ligação dupla carbono-carbono foi fortemente influenciada pelos substituintes presentes no anel aromático.

Recentemente Zagozda e col. obtiveram resultados similares na redução enantiosseletiva destas enonas mediadas por leveduras *Geotrichum candidum*, *Mortierella isabellina* e *Rhodotorula rubra*.¹⁸ Estes resultados mostraram que outros microorganismos além da levedura *S. cerevisiae* possuem a capacidade de hidrogenar a ligação dupla carbono-carbono de compostos carbonílicos α,β -insaturados.

Outro exemplo de redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados mediada por microorganismos, é apresentado no trabalho de Huang e col. (**Figura 7**). Estes pesquisadores realizaram a síntese do (S)-2-etil-hexan-1-ol (**10a**) via biorredução do 2-etil-hexan-2-enal (**9**) catalisada por FP comercial em meio aquoso. Os produtos formados em 1 h de reação foram o aldeído saturado **10a** e o

álcool alílico **10b** na proporção de 46:54. A configuração absoluta do álcool alílico formado foi a S.²⁹

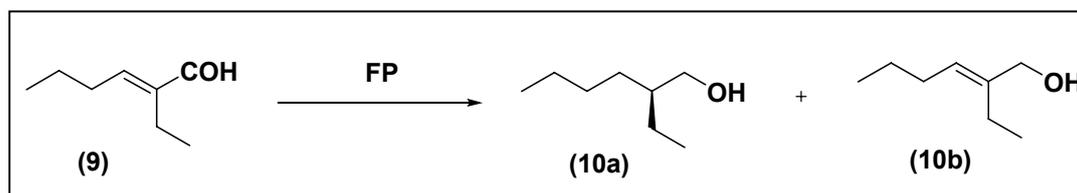


Figura 7- Biorredução do 2-etil-hexan-2-enal com fermento de pão.²⁹

Rodrigues e col. usando a levedura *Pichia stipitis* CCT 2617 na redução de α -metilenocetonas acíclicas tais como, o 2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ona (**11**) adsorvido em Amberlite XAD-7, obtiveram o (S)-2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ol (**13**) como único produto com conversão de 65% e alto ee. (>99%) (**Figura 8**).³¹

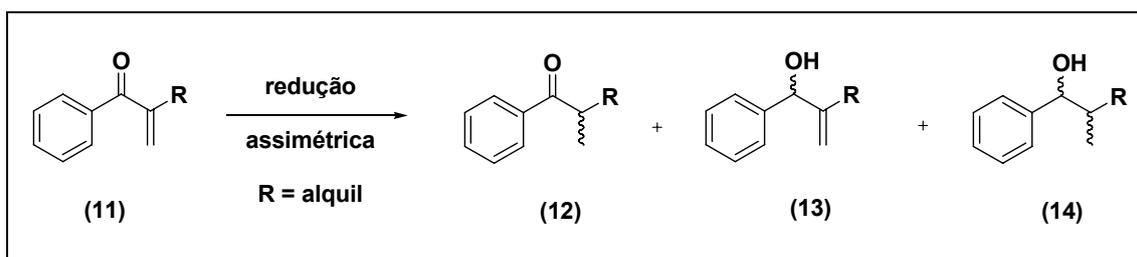


Figura 8- Síntese quimio-enantiosseletiva do (S)-2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ol com a levedura *Pichia stipitis* adsorvida em Amberlite.³¹

Para elucidar o mecanismo da transferência de hidrogênio, nas reações de redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados mediadas por **FP**, Chu e col. realizaram estudos utilizando traços de isótopos quantitativos com abundância próxima ao natural e mediram a conversão por RMN-²H. Segundo os autores o hidrogênio incorporado no carbono β a carbonila é derivado do cofator **NADPH** e o hidrogênio incorporado no carbono α a carbonila é derivado do meio aquoso.³²

Na **Figura 9**, está apresentada uma representação esquemática da proposta mecanística da redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados mediadas **FP**, apresentada por Kawai e col.³³

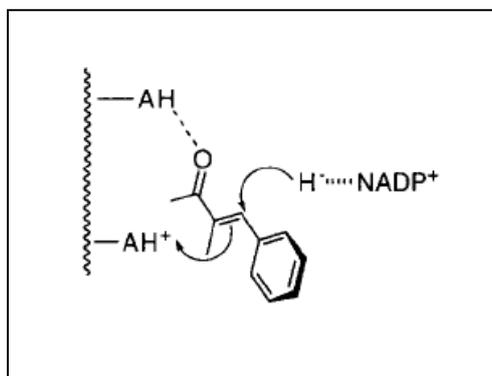


Figura 9- Representação esquemática da proposta mecanística da redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados mediada **FP**.³²

1.5 Microorganismos

A levedura *S. cerevisiae* é um microorganismo amplamente utilizado industrialmente na produção de biomassa, etanol, alimentos, proteínas, recombinantes, fármacos, feromônios e vacinas entre outros produtos de interesse comercial.³⁴ O uso de *S. cerevisiae* para mediar reações orgânicas tem sido explorado há aproximadamente um século^{35,36} e suas células integras tem sido o biocatalisador mais popularmente utilizado na redução de compostos carbonílicos.¹¹

O fermento biológico de padaria, **FP**, é um microorganismo vivo (*S. cerevisiae*), é provavelmente o biocatalisador mais utilizado pelos químicos orgânicos em síntese assimétrica nos últimos anos. São vários os motivos para este sucesso destacando a alta enantiosseletividade, rendimentos químicos comparáveis, ampla disponibilidade, custo desprezível, não requer adição de cofatores dispendiosos pois estão disponíveis nas células, e a facilidade de manuseio que não exige conhecimento de microbiologia, que tanto amedrontam os químicos e os afastam na hora da escolha entre um reagente químico e um microorganismo além do seu status de microorganismo seguro e não prejudicial à saúde.^{1,25,26}

A levedura *S. cerevisiae* também tem sido utilizada em grande escala no Brasil para a produção de álcool combustível. As linhagens industriais

denominadas **CAT-1** e **PE-2** foram selecionadas pela indústria na década de 90 por apresentarem excelentes rendimentos, e alta tolerância aos estresses do ambiente industrial, e vem sendo utilizadas em grande escala na produção de etanol nas usinas e destilarias do Brasil. No período de 2007/2008 as duas linhagens juntas foram responsáveis por 60% da produção brasileira de álcool, correspondendo a 13,4 bilhões de litros.^{37,38}

Além da levedura *S. cerevisiae* outros microorganismos tem sido utilizados como biocatalisadores em síntese orgânica. Como exemplos pode-se citar *Aspergillus niger*¹⁶, *Geotrichum candidum*¹⁸, *Hansenula sp*¹⁶ e *Candida glabrata*.²²

A *Candida glabrata* é uma levedura haplóide amplamente utilizada na produção de piruvato na indústria química, farmacêutica e alimentícia.⁴⁰ Até recentemente acreditava-se ser não-patogênico e totalmente inofensivo ao ser humano. Posteriormente, com o aumento do número de pessoas imunodeficientes, provou-se que a *C. glabrata* é um fungo extremamente oportunista que ataca principalmente as pessoas com altos índices de contaminação por HIV.⁴¹

Com o intuito de avaliar a eficiência catalítica de outros microorganismos na biotransformação de compostos carbonílicos α,β -insaturados, optou-se em utilizaram-se as leveduras *S. cerevisiae* (**FP**, **CAT-1** e **PE-2**) e a *C. glabrata* visto que esta já foi utilizada associada à cofatores (**NADH** ou **NADPH**) como biocatalisador em reações de hidrogenação do citral para citronelol.²²

1.6. Microorganismos em meio orgânico

A biocatálise em meio orgânico tem sido desenvolvida devido a baixa solubilidade em água de muitos compostos orgânicos de interesse comercial com potencial para serem transformados por enzimas e microorganismos. Entretanto, os solventes orgânicos podem causar danos irreversíveis na membrana hidrofóbica das células dos microorganismos, causando assim a inativação das enzimas ligadas a esta membrana. Portanto, são necessárias algumas alterações visando minimizar esses efeitos para proteger as células e manter sua atividade

catalítica em solvente orgânico, tais como o emprego de técnicas de imobilização e/ou o uso de açúcares.^{11,17,42}

A seguir, serão apresentadas as principais técnicas de proteção celular com açúcares e através da imobilização.

1.6.1 Proteção celular por açúcares

Como foi mencionado anteriormente o uso de solvente orgânico freqüentemente acarreta danos a membrana hidrofóbica das células dos microorganismos. Para contornar esse problema uma técnica que vem sendo muito utilizada é a adição de açúcares no meio reacional. Os açúcares especialmente a trealose e outros polióis, são conhecidos como estabilizadores das membranas protéicas.^{43,44}

A trealose (α -D-glicopiranosil- α -D-glicopiranosídeo) é um dissacarídeo não-redutor composto por duas moléculas de glicose unidas por ligações α - α -1,1-glicosídicas amplamente encontrado em bactérias, fungos, plantas e insetos mas aparentemente ausente em vertebrados (**Figura 10**).^{2,43,44,45}

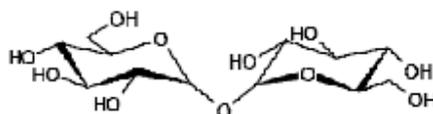


Figura 10- Estrutura da trealose.

Durante muito tempo acreditou-se que a trealose era um carboidrato de reserva. Entretanto, o papel mais importante que a trealose desempenha nas células de levedura é de estabilizar a membrana celular em condições de estresse.^{43,44,45,46}

Os grupos OH equatoriais nas moléculas de açúcares são responsáveis por ordenar as moléculas de água, aumentando sua estruturação, protegendo as membranas protéicas quando expostas a altas temperaturas e/ou aos solventes orgânicos.

Albuquerque e col. verificaram a influência de açúcares na redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila (**3**) usando levedura *S. cerevisiae* haplóide W303-1A em solvente orgânico (**Figura 11**). As maiores conversões no álcool (S)-(+)-3-hidroxiacetato de etila (**4**) (ee > 99%) foram obtidas quando as reações foram mediadas pela levedura crescida em glicerol/EtOH e com a adição de trealose no meio reacional. Entretanto, quando a reação foi realizada com a levedura crescida em glicose e protegida por sacarose, não foi observado a formação do produto, devido ao fato deste dissacarídeo ser consumido durante a reação o que não ocorre com a trealose.²⁴

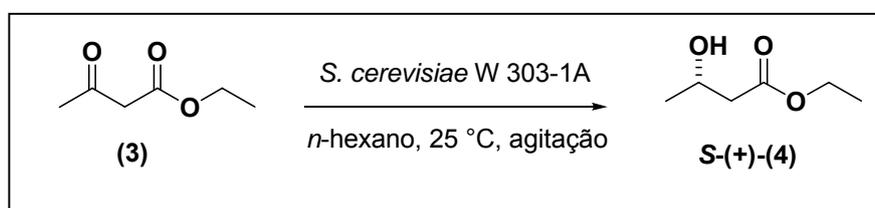


Figura 11- Biorredução do acetoacetato de etila mediada por células de *S. cerevisiae* W303-1A em meio orgânico.²⁴

1.6.2 Imobilização

Uma outra maneira eficiente de proteger as células do meio orgânico é através da imobilização. As enzimas e os microorganismos estão sujeitos a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, como decorrência da estocagem ou mesmo durante o uso. Para a manutenção da atividade catalítica, a técnica de imobilização em diferentes suportes é uma das mais utilizadas na biocatálise, sendo bastante aplicada para mediar reações de interesse sintético em solvente orgânico. A imobilização do biocatalisador, sem prejuízo de sua atividade por um razoável período de tempo, pode assegurar a reciclagem e o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais.^{11,47,48,49}

Muitos métodos de imobilização de biocatalisadores estão disponíveis. Os principais são os sistemas bifásicos, enzima em suspensão (método de Klibanov), em micelas reversas, em géis, microencapsulados ou confinados em matrizes poliméricas, fisicamente imobilizados (por adsorção ou ligação da enzima em um

material insolúvel), ou ainda através de ligações cruzadas com o uso de um reagente multifuncional.^{50,51,52,53}

A adsorção do biocatalisador em suporte macroscópico insolúvel em água é o método mais simples de imobilização. Pode ser aplicada para enzimas isoladas assim como para células íntegras.^{54,55} As forças de adsorção são bastante variadas, tais como as forças de van der Waals, interações iônicas e ligações de hidrogênio, são relativamente fracas, e em geral não interferem na atividade enzimática.^{10,55,56}

Entretanto, o desprendimento do suporte pode ocorrer se pequenas mudanças reacionais são feitas, como a variação na concentração do substrato, temperatura ou pH.^{57,58} Diferentes materiais orgânicos ou inorgânicos podem ser empregados como suporte neste tipo de imobilização, tais como carvão ativado, silicatos, óxido de alumínio, géis poliméricos, terra diatomácea, nanopartículas e celulose entre outros.^{51,52,59,60}

Um outro método de imobilização que vem sendo utilizado em biocatálise, é o sistema bifásico. Este sistema é formado por uma fase aquosa onde as células são suspensas, e por uma orgânica onde o substrato e o produto são solúveis, necessitando de agitação mecânica contínua para que ocorra a reação. As principais vantagens deste método incluem a facilidade na separação do biocatalisador do produto obtido, minimização da inibição da atividade biocatalítica causada pelo substrato, e a presença da fase aquosa, mais favorável ao biocatalisador do que o meio orgânico.^{11,42,52,61,62,63}

1.7. Compostos carbonílicos α,β -insaturados

Os compostos carbonílicos α,β -insaturados são matéria prima de grande importância em síntese orgânica devido ao fácil acesso sintético e versatilidade química. Eles possuem em sua estrutura molecular uma carbonila conjugada a uma ligação dupla carbono-carbono. Tais substâncias comportam-se como eletrofílos ambivalentes e podem reagir com nucleófilos, levando à formação tanto de produto de adição 1,4 quanto 1,2. Além disso, essas substâncias apresentam

propriedades básicas devido à presença dos pares de elétrons não compartilhados no oxigênio da carbonila e propriedades ácidas quando possuem pelo menos um átomo de hidrogênio em C5 (H_γ).

A **Figura 12**, sumariza essas diferentes possibilidades reacionais.⁶⁴

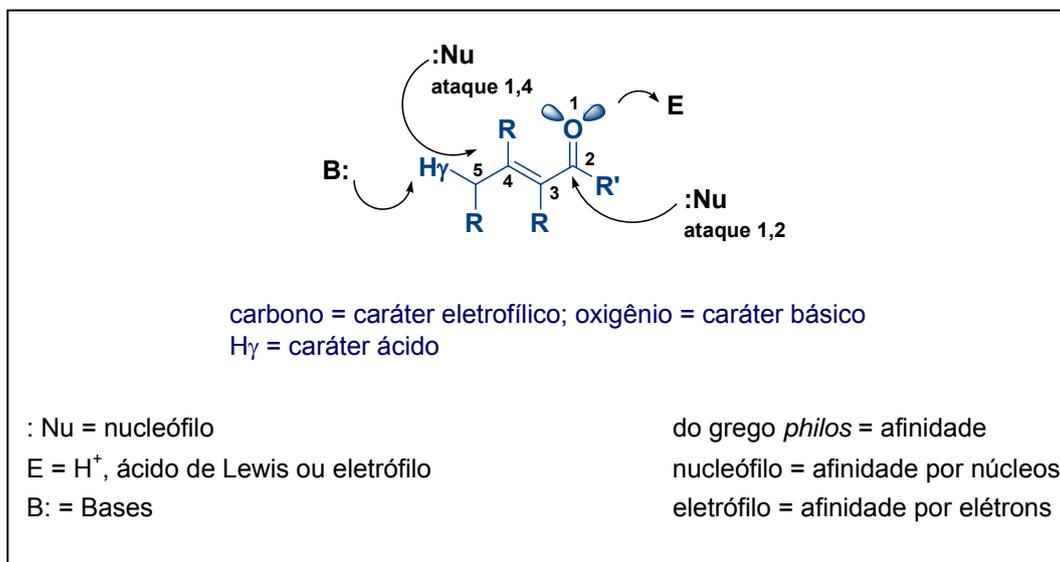


Figura 12- Possibilidades reacionais dos compostos carbonílicos α,β -insaturados.⁶⁴

Como exemplos desta classe de compostos, estão incluídas as (2*E*)-1,3-diaril-2-propen-1-ona (chalconas) (**15a-i**) e a (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (dibenzalacetona) (**16**).

1.7.1 Chalconas

As chalconas ou (2*E*)-1,3-diaril-2-propen-1-ona são consideradas uma das maiores classes de compostos naturais, comumente encontradas em frutas, vegetais, condimentos, chás e tem sido recentemente assunto de grande interesse devido a suas propriedades farmacológicas.^{65,66}

Muitas chalconas podem ser utilizadas como anti-oxidantes, anti-inflamatórios, inibidores de carcinogênese pulmonária, anti-malárico e anti-leishmanicida, antibactericida, antifúngico e antiviral.^{65,66}

As chalconas pertencem a família dos flavonóides. Estruturalmente elas apresentam dois anéis aromáticos ligados por três carbonos tendo neles um

sistema carbonílico α,β -insaturados (**Figura 13**).⁶⁷

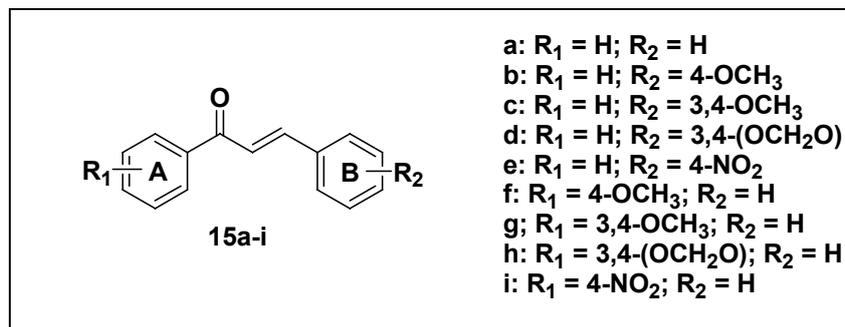


Figura 13- Estrutura de algumas chalconas.

Alberton e col. avaliaram o efeito de chalconas derivadas do piperonal e de acetofenonas substituídas na glicemia de ratos hiperglicêmicos. Eles observaram que as chalconas derivadas do piperonal diminuiriam significativamente a glicemia em ratos hiperglicêmicos, sendo que as substituições nas posições 3' e/ou 4' do anel **A** foram essenciais para a atividade hipoglicemiante desses compostos.⁶⁸

1.8. Cromatografia gasosa

Um método muito utilizado para a análise de mistura de enantiômeros é a cromatografia gasosa com fase quirais. Esse método está baseado em associações moleculares que podem levar a um reconhecimento quiral suficiente que resulte em uma resolução enantiomérica. A razão dos picos fornece uma medida da composição enantiomérica da amostra precisa e quantitativa. Tais medidas podem ser realizadas com um alto grau de precisão.⁶⁹

As ciclodextrinas (**CD**) ou seus derivados (α , β , γ) têm sido aplicadas com muita ênfase na separação de enantiômeros pela cromatografia líquida ou gasosa, através do desenvolvimento de colunas com fases estacionárias quirais.^{70,71,72}

Nesta técnica utiliza-se de uma fase estacionária quiral (ex. β -**CD**), a qual tem um agente de alta pureza enantiomérica que auxilia na resolução.^{69,72}

O enantiômero a ser analisado é submetido a interações diastereoisoméricas rápidas e reversíveis com a fase estacionária e, portanto, pode ser eluído em

diferentes velocidades. A resolução dos enantiômeros pela cromatografia baseia-se na diferença entre energias livres de formação dos intermediários diastereoisoméricos transitórios formados durante a eluição. A designação da configuração absoluta, portanto, envolverá a correlação da configuração molecular com a ordem da eluição do enantiômero. Outro fator importante no parâmetro de CG é o da separação do pico, chamado de seletividade.^{69,72}

A conversão é calculada pela razão das áreas dos picos referentes ao reagente e aos produtos, e o excesso enantiomérico é calculado através da **Equação 1**.

$$e.e. (\%) = \frac{\text{Área do pico do produto } (A_1)}{\sum \text{Áreas dos picos dos produtos } (A_1 + A_2)} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Existem certamente limitações para o método, algumas das quais são características para a cromatografia gasosa. As amostras deverão ser suficientemente voláteis e termicamente estáveis e, é claro, deverá ser quantitativamente resolvida na fase quiral do CG.⁷³

A partir destas considerações teóricas, a seguir serão apresentados os objetivos geral e específicos realizados neste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Preparar e caracterizar compostos carbonílicos α,β -insaturados, e utilizá-los na reação de bio-hidrogenação mediada pelas leveduras *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio orgânico ou em sistema bifásico.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar, purificar e caracterizar por técnicas de IV, RMN-¹H e CG-EM, os compostos carbonílicos α,β -insaturados tais como as (2*E*)-1,3-diaril-2-propen-1-onas (**15a-i**) e a (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (**16**) para serem utilizados como substratos na reação de bio-hidrogenação mediada por leveduras.
- Preparar, purificar e caracterizar por técnicas de IV, RMN-¹H e medidas de rotação óptica, os álcoois racêmicos obtidos através da redução dos compostos carbonílicos α,β -insaturados com borohidreto de sódio.
- Cultivar uma linhagem de levedura *C. glabrata* (LEMI-8228), em meio rico contendo diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol e lactato).
- Utilizar as leveduras *C. glabrata* e *S. cerevisiae* como catalisadores nas reações de bio-hidrogenação da chalcona **15a** em diferentes sistemas biocatalíticos, visando avaliar a influência da concentração das leveduras, temperatura reacional, pH da solução tampão do sistema bifásico, concentração do substrato, solvente orgânico e variação dos volumes das fases aquosa e orgânica.

- Verificar o efeito dos grupos substituintes dos anéis A e B das chalconas **15b-i**, após otimização das condições experimentais da reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** mediada pelas leveduras *S. cerevisiae*.

- Comparar os resultados obtidos na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** catalisada pela levedura *C. glabrata* com os obtidos utilizando as leveduras *S. cerevisiae*.

- Realizar a biotransformação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (**16**) mediada por fermento de pão comercial em diferentes sistemas biocatalíticos.

- Comparar os resultados obtidos com outros reportados na literatura.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos

Agitadores magnéticos (Dist); banho termostatizado (Micro Química MOBTZ99-20); rotaevaporador (Buchi 461); balanças analíticas Marte A 500; shaker (Certomat MO); cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-14B) equipado com coluna capilar de fase estacionária quiral da CHROMPACK (CP 7502 Chirasil - Dex CB 25 m x 0,25 m x ID x 0,25 μm); polarímetro (Schmidt + Haensch); centrífuga (Centrifugador excelsa baby, Fanem LTDA, Mod. 208N); espectrofotômetro de Perkin Elmer FT-IR 1600 (Central de Análise-UFSC); espectrômetro de RMN da Bruker AC 200F - 400MHz (Central de Análise-UFSC); espectrômetro GCMS-Q85050, coluna J & W Cientific' DB-5-M30 (Lab 210-Professor Dr° Faruk Nome); espectrofotômetro B295 II Micronal (Lab. de graduação em Química Orgânica); autoclave vertical Phoenix (Lab. 309-Professor Dr° Ricardo Nunes); incubadora orbital Nova Ética N480 (Lab. 309-Professor Dr° Ricardo Nunes)

3.2 Reagentes, solventes e biocatalisadores

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau P. A.

✓ **Reagente e solventes:**

Acetofenona (Riedel-di-Haen); 4-metoxiacetofenona (Merck); 4-nitroacetofenona (Acros); 3,4-dimetoxiacetofenona (Vetec); 3,4-(metilenodioxi)acetofenona (Aldrich); benzaldeído (Vetec); 4-metoxibenzaldeído (Aldrich); 4-nitrobenzaldeído (Fluka); 3,4-dimetoxibenzaldeído (Aldrich); 3,4-(metilenodioxi)benzaldeído (Aldrich); borohidreto de sódio (Merck); hidróxido de sódio (Grupo Química); acetona (Vetec); ácido cítrico (Cromato produtos químicos); K_2HPO_4 (Vetec); sacarose (Sigma); trealose (Sigma); *n*-hexano (F. Maia); *n*-heptano (Vetec); cicloexano (Carlo Erba); tetracloreto de carbono (Vetec);

tolueno (F. Maia); clorofórmio (Vetec); diclorometano (Vetec); metanol (Grupo Química); clorofórmio deuterado (CIL); acetona deuterada (CIL); acetato de etila (Vetec); etanol (Grupo Química); éter de petróleo (Vetec); sílica gel 60 para cromatografia em coluna 70-230 mesh (Vetec); montmorilonita K10 (**K10**) (Fluka)

✓ **Meios de cultivo:**

Peptona bacteriológica (Biobrás); extrato de levedura (Biobrás); glicerol 85% (Vetec); ácido láctico (Química moderna); glicose (sigma)

✓ **Biocatalisadores:**

- Fermento biológico Fleischmann (leveduras secas de *S. cerevisiae*)
- Linhagem CAT-1 de *S. cerevisiae* (leveduras secas)
- Linhagem PE-2 de *S. cerevisiae* (leveduras secas)
- Células de *C. glabrata* (linhagem LEMI-8228)

3.3 Microorganismos e condições de cultivo

As células da levedura *Candida glabrata* (linhagem LEMI-8228, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo do Laboratório Especial de Micologia Médica da Universidade Federal de São Paulo), foram crescidas utilizando-se meio de cultura rico YP contendo 2% (m/v) peptona e 1% extrato de levedura e três diferentes fontes de carbono: 4% de glicose; ou 3% de glicerol; ou 2% de etanol e 3% de glicerol; ou 2% de ácido láctico. O pH foi ajustado para 5,0 com solução de HCl ou de KOH, os meios foram autoclavados a 121 °C durante 20 min e inoculadas com 0,5% (v/v) de uma pré-cultura crescida por 48 h em meio YP contendo 3% de glicerol como fonte de carbono. Os frascos contendo os meio de cultura foram incubados a 30 °C, sob agitação orbital constante a 160 rpm.

O crescimento celular foi determinado espectrofotometricamente a 570 nm. O meio de cultivo foi diluído em água destilada a fim de se obter medidas de

absorbância $\leq 0,3$.⁸¹ As células em fase de crescimento exponencial (determinada a partir da curva de crescimento), antes da exaustão da fonte de carbono, foram coletadas por centrifugação e lavadas com água destilada e utilizadas nos experimentos de bio-hidrogenação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados.

O peso das células foi estimado a partir da **Equação 2**.⁸¹

$$\text{Peso seco (g/L)} = 0,35 \times A_{570} \times D \quad \text{Eq. 2}$$

onde A_{570} é a absorbância do meio de cultivo a 570 nm, D é o fator de diluição das amostras e 0,35 é o fator de conversão de absorbância para peso seco da levedura (determinado após secagem das células por 3-5 min em forno de microondas à potência máxima).⁸¹

As leveduras *S. cerevisiae* foram obtidas na sua forma seca pronta para uso (“*active dry yeast*”) no comércio local (fermento biológico Fleischmann, **FP**), enquanto que as linhagens **CAT-1** e **PE-2** foram gentilmente cedidas pela empresa Fermentec Ltda. Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica (Piracicaba, SP) e descritas por Basso e col.³⁸

3.4 Procedimentos para a preparação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados 15a-i e 16

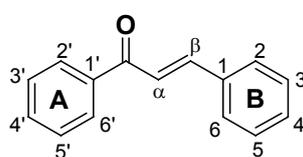
3.4.1 Procedimento geral para a preparação das chalconas 15a-i

Em um balão de 100 mL, munido de agitação magnética, adicionou-se aproximadamente 15 mL de etanol, acetofenona (21 mmol) substituída ou não e o benzaldeído (21 mmol) substituído ou não. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foi gotejada lentamente algumas gotas (~8 gotas) de solução NaOH 50%, até atingir o pH ~10, e a mistura foi mantida a temperatura ambiente. A formação do produto foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (**CCD**) utilizando como eluente a mistura de *n*-hexano:acetato de etila (9:1 ou 6:4 v/v). Ao final da reação, a mistura foi deixada na geladeira por uma noite, sendo em seguida filtrada em funil de Buchner e o produto lavado com etanol a frio. As chalconas

foram recristalizadas com etanol absoluto a quente e a seguir determinou-se o ponto de fusão. O produto da reação foi pesado e então calculado o rendimento. As chalconas **15a-i** foram caracterizadas e analisadas por técnicas de IV, RMN-¹H e CG-quiral ou CG-EM, quando necessário.

Os cromatogramas e os espectros de RMN-¹H e IV das chalconas **15a-i** encontram-se no **ANEXO**.

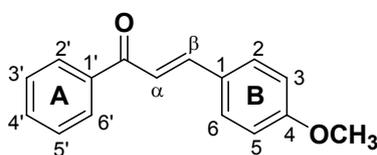
➤ **(2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (15a)**



15a

C₁₅H₁₂O (208,3 g mol⁻¹); tempo reacional 5 h; sólido amarelo claro; 3,5 g (80 %); pf.: 53-54 °C (lit⁶⁵ 57-58 °C); R_f: 0,47 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV v_{max}/cm⁻¹ (KBr): 3050, 1663, 1606, 1572, 1446 1285, 988, 750, 687; RMN-¹H (400MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7,42 (m, 3H, H3, H4, H5), 7,50-7,66 (m, 6H, H3' e H5', H4', H_α, H2 e H6), 7,82 (d, J=15,6Hz, 1H, H_β), 8,03 (d, J=7,6Hz, 2H, H2' e H6'); CG-quiral t_r=14,9 min [Condições de programação: conforme descrito na **Tabela 1**]; CG-EM (m/z): 208 (M⁺), 207, 131, 105, 103, 77.

➤ **(2E)-3-(4-metoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (15b)**

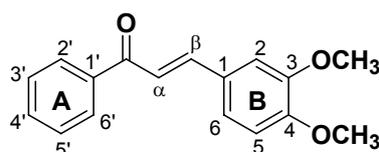


15b

C₁₆H₁₄O₂ (238,3 g mol⁻¹); tempo reacional 4 h; sólido amarelo; 3,1 g (62 %); pf.: 70 °C (lit⁶⁵ 75-77 °C); R_f: 0,32 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV v_{max}/cm⁻¹ (KBr): 3058, 2948, 1654, 1603, 1577, 1513, 1264, 1019, 985, 829, 770, 687; RMN-¹H

(400MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3,86 (s, 3H, OCH₃), 6,94 (d, J=8,4Hz, 2H, H₃ e H₅), 7,42 (d, J=15,6Hz, 1H, H_α), 7,51 (dd 2H, H_{3'} e H_{5'}), 7,60 (m, 3H, H₂, H₆ e H_{4'}), 7,80 (d, J=15,6Hz, 1H, H_β), 8,02 (d, J=7,2Hz, 2H, H_{2'} e H_{6'}); CG-quiral t_R=23,4 min [Condições de programação: conforme descrito na **Tabela 1**].

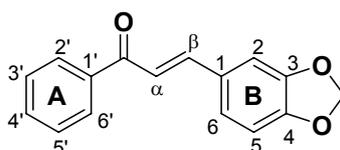
➤ **(2E)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (15c)**



15c

C₁₇H₁₈O₃ (268,3 g mol⁻¹); tempo reacional 48 h; sólido amarelo escuro; 4,7 g (84 %); pf.: 83-84 °C (lit⁷⁴ 87-89 °C); R_f: 0,53 (*n*-hexano:acet. etila, 6:4 v:v); IV v_{max}/cm⁻¹ (KBr): 3014, 2937, 1654, 1586, 1513, 1342, 1261, 1013, 850, 807, 777, 696; RMN-¹H (400MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3,93 (s, 6H, OCH₃), 6,89 (d, J=8,0Hz, 1H, H₅), 7,16 (s, 1H, H₂), 7,24 (m, 1H, H₆), 7,39 (d, J=15,6Hz, 1H, H_α), 7,50 (m, 3H, H_{3'}, H_{5'} e H₄), 7,76 (d, J=15,6Hz, 1H, H_β), 8,01 (d, J=7,2Hz, 2H, H_{2'} e H_{6'}); CG-quiral t_R=33,7 min [Condições de programação: conforme descrito na **Tabela 1**].

➤ **(2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona (15d)**

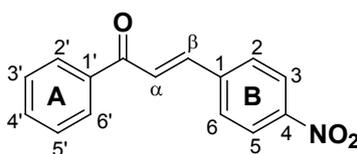


15d

C₁₆H₁₂O₃ (252,3 g mol⁻¹); tempo reacional 3 h; sólido amarelo escuro; 4,7 g (94 %); pf.: 118 °C (lit⁶⁵ 117 °C); R_f: 0,66 (*n*-hexano:acet. etila, 6:4 v:v); IV v_{max}/cm⁻¹ (KBr): 2984, 2920, 1661, 1601, 1572, 1501, 1359, 1249, 1035, 1014, 783, 701; RMN-¹H (400MHz, CDCl₃) δ(ppm): 6,04 (s, 2H, OCH₂O), 6,85 (d, J = 8,0Hz, 1H, H₅), 7,13 (d, J = 8,0Hz, 1H, H₆), 7,18 (s, 1H, H₂), 7,38 (d, J=15,6Hz, 1H, H_α), 7,50

(m, 3H, H3', H5' e H4'), 7,74 (d, J=15,6Hz, 1H, H β), 8,01 (d, J = 7,2Hz, 2H, H2' e H6'); CG-quiral t_R =30,6 min [Condições de programação: conforme descrito na **Tabela 1**].

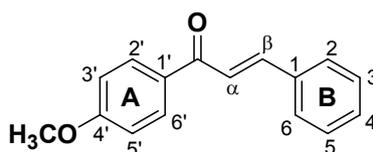
➤ **(2E)-3-(4-nitrofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (15e)**



15e

$C_{15}H_{11}NO_3$ (253,2 $g\ mol^{-1}$); tempo reacional 7 h; sólido amarelo escuro; 3,1 g (84 %); pf.: 160 °C (lit⁶⁵ 160-163 °C); R_f : 0,78 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV ν_{max}/cm^{-1} (KBr): 3072, 1664, 1587, 1414, 1337, 1216, 1013, 981, 846, 747; RMN-¹H (400MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,54 (m, 2H, H3' e H5'), 7,62-7,67 (m, 2H, H4' e H α), 7,82(m, 3H, H2, H6, H β), 8,02 (d, J=7,6Hz, 2H, H2' e H6'), 8,28 (d, J=8,8 Hz, 2H, H3 e H5); CG-quiral t_R =34,6 min [Condições de programação: conforme descrito na **Tabela 1**].

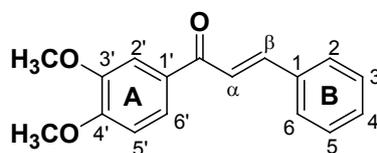
➤ **(2E)-1-(4-metoxifenil)-3-fenil- 2-propen-1-ona (15f)**



15f

$C_{16}H_{14}O_2$ (238,3 $g\ mol^{-1}$); tempo reacional 6 h; sólido amarelo claro, 3,5 g (70 %); pf.: 100-101 °C (lit⁶⁶ 104-105 °C); R_f : 0,31 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV ν_{max}/cm^{-1} (KBr): 3056, 2920, 1655, 1608, 1447, 1422, 1259, 1187, 1036, 828, 763, 697; RMN-¹H (400MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3,88 (s, 3H, OCH_3), 6,98 (d, J=8,6Hz, 2H, H3' e H5'), 7,41 (m, 3H, H3, H5 e H4), 7,54 (d, J=15,6Hz, 1H, H α), 7,65 (m, 2H, H2 e H6), 7,83 (d, J=15,6Hz, 1H, H β), 8,04 (d, J=8,6Hz, 2H, H2' e H6'); CG-quiral t_R =24,3 min [Condições de programação: conforme descrito na **Tabela 1**].

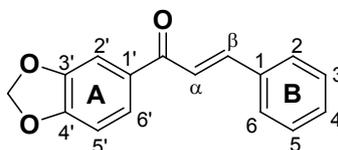
➤ (2E)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-fenil-2-propen-1ona (15g)



15g

$C_{17}H_{16}O_3$ (268,3 $g\text{mol}^{-1}$); tempo reacional 4 horas; sólido amarelo; 4,1 g (72 %); pf.: 82-83 °C (lit⁷⁴ 85-87 °C); R_f : 0,51 (*n*-hexano:acet. etila, 6:4 v:v); IV $v_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3064, 2964, 1654, 1602, 1583, 1513, 1417, 1309, 1258, 1024, 795, 754, 684; RMN-¹H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,96 (s, 6H, OCH_3), 6,92 (d, $J=8,4\text{Hz}$, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7,40 (m, 3H, H_3 , H_4 e H_5), 7,54 (d, $J=15,6\text{Hz}$ 1H, H_α), 7,62-7,68 (m, 4H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{6'}$, H_2 e H_6), 7,81 (d, $J=15,6\text{Hz}$ 1H, H_β); CG-quiral $t_R=36,5$ min [Condições de programação: conforme descrito na Tabela 1].

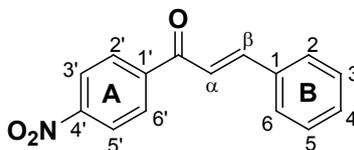
➤ (2E)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-fenil-2-propen-1ona (15h)



15h

$C_{16}H_{12}O_3$ (252,3 $g\text{mol}^{-1}$); tempo reacional 4 h; sólido amarelo claro; 4,3 g (78 %); pf.: 97 °C (lit⁷⁵ 97-98 °C); R_f : 0,65 (*n*-hexano:acet. etila, 6:4 v:v); IV $v_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3029, 2912, 1656, 1598, 1450, 1330, 1248, 1112, 1042, 933, 762, 681; RMN-¹H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6,06 (s, 2H, OCH_2O), 6,91 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7,41 (m, 3H, H_3 , H_4 e H_5), 7,50 (d, $J=15,6\text{Hz}$ 1H, H_α), 7,54 (s, 1H, $\text{H}_{2'}$), 7,65 (m, 3H, $\text{H}_{6'}$, H_2 e H_6), 7,80 (d, $J=15,6\text{Hz}$ 1H, H_β); CG-quiral $t_R=29,1$ min [Condições de programação: conforme descrito na Tabela 1].

➤ **(2E)-1-(4-nitrofenil)-3-fenil-2-propen-1-ona (15i)**



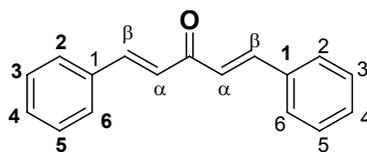
15i

$C_{15}H_{11}NO_3$ (253,2 g mol^{-1}); tempo reacional 5 h; sólido amarelo escuro; 3,2 g (60 %); pf.: 146-147 °C (lit⁷⁴ 145-147 °C); R_f : 0,31 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); ν_{max}/cm^{-1} (KBr): 3055, 1659, 1602, 1586, 1514, 1333, 1204, 999, 854, 745, 681; RMN-¹H (400MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,45-7,50 (m, 4H, H₃, H₄, H₅ e H α), 7,66 (m, 2H, H₂ e H₆), 7,84 (d, J=15,6Hz, 1H, H β), 8,15 (d, J=8,4Hz, 2H, H_{2'} e H_{6'}), 8,36 (d, J=8,4Hz, 2H, H_{3'} e H_{5'}); CG-quiral $t_R=31,0$ min [Condições de programação: conforme descrito na **Tabela 1**].

3.4.2 Preparação da (1E,4E)-1,5-difenil- 1,4-pentadien-3-ona (16)

Em um erlenmyer de 500 mL, munido de agitação magnética e banho maria, adicionou-se 25 g (625 mmol) de hidróxido de sódio em 250 mL de água e 200 mL de etanol. A mistura foi mantida a temperatura ambiente com agitação vigorosa. Foram adicionados metade de uma mistura previamente preparada de 26,5 g (25,5 mL, 250 mmol) de benzaldeído puro e 7,3 g (9,3 mL, 125 mmol) de acetona. Após 15 min adicionou-se o restante da mistura benzaldeído-acetona.⁵ A formação do produto foi acompanhada por **CCD** utilizando como eluente uma mistura de *n*-hexano:acetato de etila (9:1). Ao final da reação, a mistura foi filtrada em funil de Buchner e o produto lavado com acetato de etila a frio. A 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona foi recristalizada com acetato de etila a quente, e determinou-se o ponto de fusão. O produto da reação foi caracterizado e analisado por técnicas de IV, RMN-¹H e CG-quiral e CG-EM.

Os espectros de RMN-¹H, IV e CG-EM de **16** encontram-se no **ANEXO**.



16

$C_{17}H_{14}O$ ($234,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional 6 h; sólido amarelo escuro; 14,2 g (50 %); pf.: $109 \text{ }^\circ\text{C}$ (lit⁷⁶ $112 \text{ }^\circ\text{C}$) ; R_f : 0,45 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); $IV \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3022, 1648, 1591, 1339, 1190, 992, 757, 693; RMN-¹H (400MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,10 (d, $J=16\text{Hz}$, 2H, H_α), 7,41 (m, 6H, H_3 , H_4 e H_5), 7,62 (m, 4H, H_2 e H_6), 7,74 (d, $J=16\text{Hz}$, 2H e H_β); CG-quiral $t_R=24,6 \text{ min}$ [Condições de programação: conforme descrito na **Tabela 1**]; CG-MS (m/z): 234 (M^+), 131, 103, 77, 51.

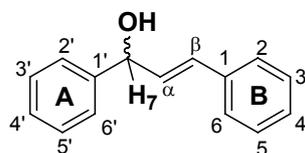
3.5 Procedimento geral para a redução dos compostos carbonílicos α,β -insaturados *via* química

Para obtenção dos álcoois racêmicos que serão utilizados como padrões nas análises de CG-quiral e de RMN-¹H, os compostos carbonílicos α,β -insaturados **15a-i** e **16** foram reduzidos com $NaBH_4$ de acordo com a metodologia descrita a seguir e adaptada da referência 76. Estes compostos serão também comparados com os obtidos nas reações de biohidrogenação.

Foram adicionados lentamente, a temperatura ambiente, em um balão de fundo redondo, 0,50 g dos substratos carbonílicos α,β -insaturados dissolvidos em aproximadamente 20 mL de metanol e, a seguir adicionou-se $NaBH_4$ em excesso (~0,30 g). A reação foi acompanhada por **CCD** utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila, (9:1 ou 6:4 v/v). Ao final da reação, a fase orgânica foi tratada com solução saturada de NaCl (BRINE) e extraída com 2 X 15mL de diclorometano. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$ e o solvente evaporado em rotaevaporador. Os correspondentes álcoois racêmicos **17a-i** e **18** foram submetidos às análises de IV, RMN-¹H, CG-quiral e medidas de rotação óptica.

Os cromatogramas e os espectros de RMN-¹H e IV dos álcoois **17a-i** e **18** encontram-se no **ANEXO**.

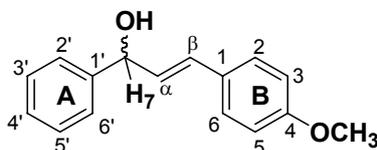
➤ **(2E)- (R,S)-1,3-difenil-2-propen-1-ol (17a)**



17a

$C_{15}H_{14}O$ ($210,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional 30 min; sólido branco; 0,42 g, (84 %); pf.: $49 \text{ }^\circ\text{C}$ (lit⁷⁷ $56\text{-}57 \text{ }^\circ\text{C}$); $[\alpha]_D=0$ (CHCl_3 , $c=0,15 \text{ g/100 mL}$); R_f : 0,29 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV $v_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3345, 3027, 1599, 1493, 1450, 1010, 966, 746, 696; RMN-¹H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,61 (s, 1H, OH), 5,14 (m, 1H, H₇), 6,40 (m, 1H, H_α), 6,66 (dd, $J=3,2$ e 16 Hz 1H, H_β), 7,26-7,40 (m, 10H, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'} e H_{6'}); CG-quiral $t_R=15,7 \text{ min}$ [Condições de programação: conforme descrito na **Tabela 1**].

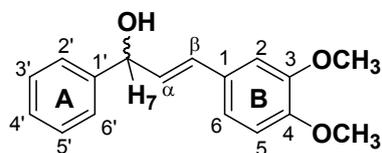
➤ **(2E)- (R,S)-3-(4-metoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ol (17b)**



17b

$C_{16}H_{16}O_2$ ($240,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional 1 h óleo; 0,40 g, (80 %); pf.(lit)⁷⁸ $50\text{-}52 \text{ }^\circ\text{C}$ $[\alpha]_D=0$ (CHCl_3 , $c=0,12 \text{ g/100 mL}$); R_f : 0,17 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV $v_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3400, 3033, 1606, 1512, 1252, 1173, 1029, 967, 831, 703; RMN-¹H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,10 (s, 1H, OH), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 5,32 (d, $J=5,6 \text{ Hz}$, 1H, H₇), 6,21 (dd, $J=6,4$ e $15,6 \text{ Hz}$, 1H, H_α), 6,57 (d, $J=16,0 \text{ Hz}$, 1H, H_β), 6,80 (d, $J=8 \text{ Hz}$, 2H, H₃ e H₅), 7,21-7,40 (m, 7H, H₂, H₆, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'} e H_{6'}); CG-quiral $t_R=14,3 \text{ min}$ [Condições de programação: conforme descrito na **Tabela 1**].

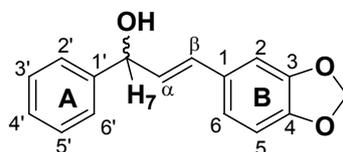
➤ (2E)- (R,S)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ol (17c)



17c

$C_{17}H_{18}O_3$ ($270,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional 30 min; sólido branco; 0,43 g, (86 %); pf.: 66-73 °C (lit*); $[\alpha]_D=0$ (CHCl_3 , $c=0,18 \text{ g/100 mL}$); R_f : 0,45 (*n*-hexano:acet. etila, 6:4 v:v); IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3509, 3035, 2845, 1603, 1578, 1512, 1417, 1152, 1018, 967, 698; RMN- ^1H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,22 (s, 1H, OH), 4,03 (s, 6H, OCH_3), 5,22 (m, 1H, H7), 6,41 (dd, $J=15,6$ e $6,4$ Hz, 1H, H_α), 6,78 (d, $J=15,6$ Hz, 1H, H_β), 7,08 (d, $J=7,6$ Hz, 1H, H2), 6,94 (m, 2H, H5 e H6), 7,42-7,59 (m, 5H, H2', H3', H4', H5' e H6'); CG-quiral $t_R=18,2$ min [Condições de programação: conforme descrito na Tabela 1] [* não encontrado].

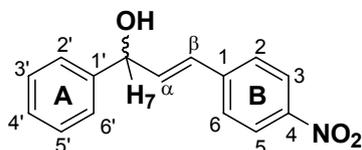
➤ (2E)- (R,S)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ol (17d)



17d

$C_{16}H_{14}O_3$ ($254,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional 30 min; óleo; 0,35 g, (70 %); óleo (lit⁷⁹) $[\alpha]_D=0$ (CHCl_3 , $c=0,13 \text{ g/100 mL}$); R_f : 0,54 (*n*-hexano:acet. etila, 6:4 v:v); IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3550, 3405, 3031, 1610, 1502, 1449, 1236, 1192, 1043, 918, 765, 701 1506, 1441, 1184, 1039, 918 761, 705; RMN- ^1H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,14 (s, 1H, OH), 5,20 (d, $J=6,4$ Hz, 1H, H7), 5,90 (s, 2H, OCH_2O), 6,20 (d/d, $J=6,4$ e $16,0$ Hz 1H, H_α), 6,54 (d, $J=15,6$ Hz, 1H, H_β), 6,76 (m, 2H, H5 e H6), 6,90 (s, 1H, H2), 7,37-7,41 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'); CG-quiral $t_R = 17,2$ min [Condições de programação: conforme descrito na Tabela 1].

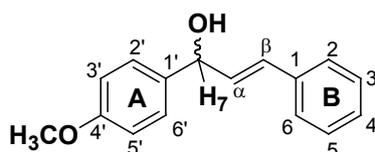
➤ **(2E)- (R,S)-3-(4-nitrofenil)-1-fenil- 2-propen-1-ol (17e)**



17e

$C_{15}H_{13}NO_3$ ($255,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional 1 h; sólido branco; 0,35 g, (70 %); pf.: $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (lit⁷⁸ 83-84 $^\circ\text{C}$); $[\alpha]_D = 0$ (CHCl_3 , $c=0,10 \text{ g/100 mL}$); R_f : 0,15 (*n*-hexano:acet. etila, 90:10 v:v); IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3335, 3082, 1650, 1593, 1512, 1341, 1194, 1112, 973, 847, 741, 708; RMN-¹H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,24 (s, 1H, OH), 5,44 (d, $J=4,8 \text{ Hz}$, 1H, H7), 6,55 (dd, $J=5,6$ e $16,0 \text{ Hz}$ 1H, H α), 6,79 (d, $J=15,6 \text{ Hz}$, 1H, H β), 7,43 (m, 5H, H2', H3', H4', H5' e H6'), 7,42-7,52 (d, $J=8,8$, 2H, H2 e H6), 8,16 (d, $J=8,8 \text{ Hz}$, 2H, H3 e H5); CG-quiral $t_R=34,8 \text{ min}$ [Condições de programação: conforme descrito na Tabela 1].

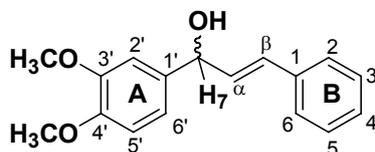
➤ **(2E)- (R,S)-1-(4-metoxifenil)-3-fenil-2-propen-1-ol (17f)**



17f

$C_{16}H_{16}O_2$ ($240,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional 30 mim; óleo; 0,43 g (86 %); óleo (lit⁷⁹) $[\alpha]_D = 0$ (CHCl_3 , $c = 0,20 \text{ g/100 mL}$); R_f : 0,16 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3387, 3029, 2833, 1609, 1511, 1447, 1250, 1173, 1032, 964, 833, 694; RMN-¹H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,48 (s, 1H, OH), 3,76 (s, 1H, OCH_3), 5,27 (d, $J=5,6 \text{ Hz}$, 1H, H7), 6,33 (dd, $J=6,0$ e $15,6 \text{ Hz}$ 1H, H α), 6,61 (d, $J=16,0 \text{ Hz}$, 1H, H β), 6,86 (d, $J=8,0 \text{ Hz}$, 2H, H3' e H5'), 7,20-736 (m, 7H, H2, H3, H4, H5, H6, H2' e H6'), CG-quiral $t_R=14,5 \text{ min}$ [Condições de programação: conforme descrito na Tabela 1].

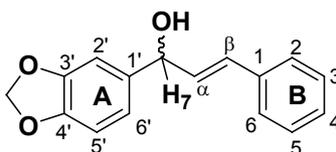
➤ **(2E)- (R,S)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-fenil-2-propen-1ol (17g)**



17g

$C_{17}H_{18}O_3$ ($270,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional 1 h; sólido branco; 0,42 g (81 %); pf.: 75-79 °C (lit*); $[\alpha]_D=0$ (CHCl_3 , $c=0,19 \text{ g/100 mL}$); Rf: 0,42 (*n*-hexano:acet. etila, 6:4 v:v); IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3509, 3002, 2834, 1593, 1518, 1447, 1258, 1145, 1019, 860, 818, 755, 600; RMN- ^1H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,50 (s, 1H, OH), 3,88 (s, 6H, OCH_3), 5,34 (s, 1H, H7), 6,39 (dd, $J=6,4$ e $15,6 \text{ Hz}$ 1H, H_α), 6,66 (d, $J=15,6 \text{ Hz}$, 1H, H_β), 6,86 (d, $J=8,0 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{5'}$), 6,96 (d, $J=7,6 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{6'}$), 7,02 (s, 1H, $\text{H}_{2'}$), 7,31-7,41 (m, 5H, H2, H3, H4, H5, e H6); CG-quiral $t_R=18,2 \text{ min}$ [Condições de programação: conforme descrito na Tabela 1] [* não encontrado].

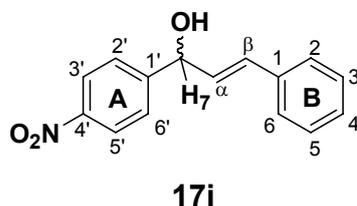
➤ **(2E)- (R,S)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-fenil-2-propen-1ol (17h)**



17h

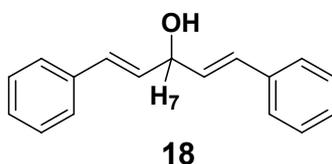
$C_{16}H_{14}O_3$ ($254,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional 1 h; óleo; 0,43 g (86 %); $[\alpha]_D=0$ (CHCl_3 , $c=0,23 \text{ g/100 mL}$); Rf: 0,50 (*n*-hexano:acet. etila, 6:4 v:v); IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3565, 3027, 2894, 1607, 1487, 1441, 1250, 1091, 1037, 967, 935, 811, 747, 698; RMN- ^1H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,15 (s, 1H, OH), 5,02 (m, 1H, H7), 5,97 (s, 2H, OCH_2O), 6,33-7,41 (m, 10H, H_α , H_β , $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{5'}$, $\text{H}_{6'}$, H2, H3, H4, H5 e H6); CG-quiral $t_R=17,3 \text{ min}$ [Condições de programação: conforme descrito na Tabela 1].

➤ (2E)- (R,S)-1-(4-nitrofenil)-3-fenil-2-propen-1-ol (17i)



$C_{15}H_{13}NO_3$ (255,3 $g\text{mol}^{-1}$); tempo reacional 1 h; sólido branco; 0,32 g (65 %); pf.: 56 °C (lit⁷⁸ 85-86 °C); $[\alpha]_D=0$ ($CHCl_3$, $c=0,12$ g/100 mL); R_f : 0,18 (*n*-hexano:acet. etila, 90:10 v:v); IV v_{max}/cm^{-1} (KBr): 3518, 3111, 2893, 1597, 1516, 1440, 1345, 1037, 973, 857, 742, 691; RMN-¹H (400MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 2,14 (s, 1H, OH), 5,45 (d, $J=7,2$ Hz, 1H, H7), 6,28 (dd, $J=7,2$ e 15,6 Hz 1H, H α), 6,69 (d, $J=15,6$ Hz, 1H, H β), 7,30 (m, 5H, H2, H3, H4, H5 e H6), 7,58 (d, $J=8,4$ Hz, 2H, H2' e H6'), 8,16 (d, $J=8,4$ Hz, 2H, H3' e H5'); CG-quiral $t_R=44,7$ min [Condições de programação: conforme descrito na Tabela 1].

➤ (1E,4E)- 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ol (18)



$C_{17}H_{16}O$ (236,3 $g\text{mol}^{-1}$); tempo reacional 30 min; sólido branco; 0,44 g (88 %); pf.: 64-66°C (lit⁸⁰ 64 °C); R_f : 0,20 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1); IV v_{max}/cm^{-1} (KBr): 3385, 3023, 1578, 1492, 1447, 1266, 963, 751, 692; RMN-¹H (400MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 2,85 (s, 1H, OH), 4,34 (d, $J=4,0$ Hz 1H, OH), 4,95 (m, 1H, H7), 6,39 (dd, $J=6,0$ e 16,0 Hz 2H, H α), 6,70 (d, $J=16,0$ Hz, 2H, H β), 7,31-7,47 (m, 10H); CG-quiral $t_R=25,3$ min [Condições de programação: conforme descrito na Tabela 1].

3.6 Imobilização do FP em montmorilonita K10

Uma mistura contendo o biocatalisador, montmorilonita K10 (**K10**) na proporção 3:1 (suporte:biocatalisador)⁸² e 100 mL de água foi agitada vigorosamente durante 5 h a temperatura ambiente. A mistura **FP/K10** foi filtrada a vácuo em funil de Buchner, seca na capela à temperatura ambiente por aproximadamente 12 h e triturada até resultar em partículas finas.

Após este processo, o **FP/K10** foi armazenado em *n*-hexano e então utilizado nas reações de bio-hidrogenação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados.

3.7 Biotransformação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados mediados por microorganismos

As reações de biotransformação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados **15a-i** e **16** foram realizadas sob diferentes condições experimentais. Os biocatalisadores utilizados foram as células das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (**FP**, **CAT-1**, **PE-2**) e *Candida glabrata*.

Em um erlenmeyer de 125 mL, solubilizou-se o substrato carbonílico α,β -insaturado (1,0 mmol) em 30 mL de solvente orgânico, e a seguir adicionou-se 30 mL de solução tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico⁸³ e o biocatalisador. Os frascos foram submetidos à agitação magnética com temperatura controlada. Foram retiradas alíquotas periodicamente do meio reacional e extraídas com diclorometano (2 X 15 mL). A formação do produto foi analisada por cromatografia gasosa com fase quiral.

Para as reações onde utilizou-se os açúcares como proteção celular, o procedimento experimental foi o seguinte: adicionou-se o biocatalisador em um erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de solvente orgânico, onde 1,0 mmol do substrato já tinha sido previamente solubilizado. A seguir, adicionou-se lentamente 2,5 mL de solução de trealose ou sacarose 10% ao meio reacional. Os frascos foram submetidos à agitação magnética com temperatura controlada. Foram

retiradas alíquotas periodicamente do meio reacional, e a formação do produto foi analisada por cromatografia gasosa com fase quiral.

As quantidades utilizadas de biocatalisador e dos substratos assim como a temperatura, pH da solução tampão e solvente variaram conforme o experimento, e serão detalhadas no decorrer da apresentação dos resultados e discussão.

3.8 Determinação da conversão

Para a determinação da porcentagem de conversão da biotransformação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados, alíquotas do meio reacional foram retiradas periodicamente e analisadas no CG equipado com uma coluna capilar de fase estacionária quiral da CHROMPACK (Chirasil - DEX CB 25 m x 0,25 mm x ID x 0,25 μ m). As condições de análise estão demonstradas na **Tabela 1**.

Tabela 1- Condições de programação do CG-quiral e CG-EM.

Parâmetros	
Coluna	CP 7502 Chirasil - DEX CB J & W Cientific' DB-5-M30
Temperatura inicial	100°C
Temperatura final 1	150°C
Temperatura final 2	200°C
Taxa de aquecimento 1	10°C/min
Taxa de aquecimento 2	5°C/min
Tempo final 1	1min
Injetor: Split 200	250
Detector: FID	275
Pressão do gás carreador (H ₂)	75kPa
Volume da amostra	2 μ L

A conversão em produto foi calculada através da razão das áreas dos picos referentes ao reagente e ao produto. A **Figura 14** apresenta um cromatograma de uma alíquota da reação de bio-hidrogenação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona

mediada por **FP** comercial em sistema bifásico. A porcentagem de conversão calculada foi de 27%.

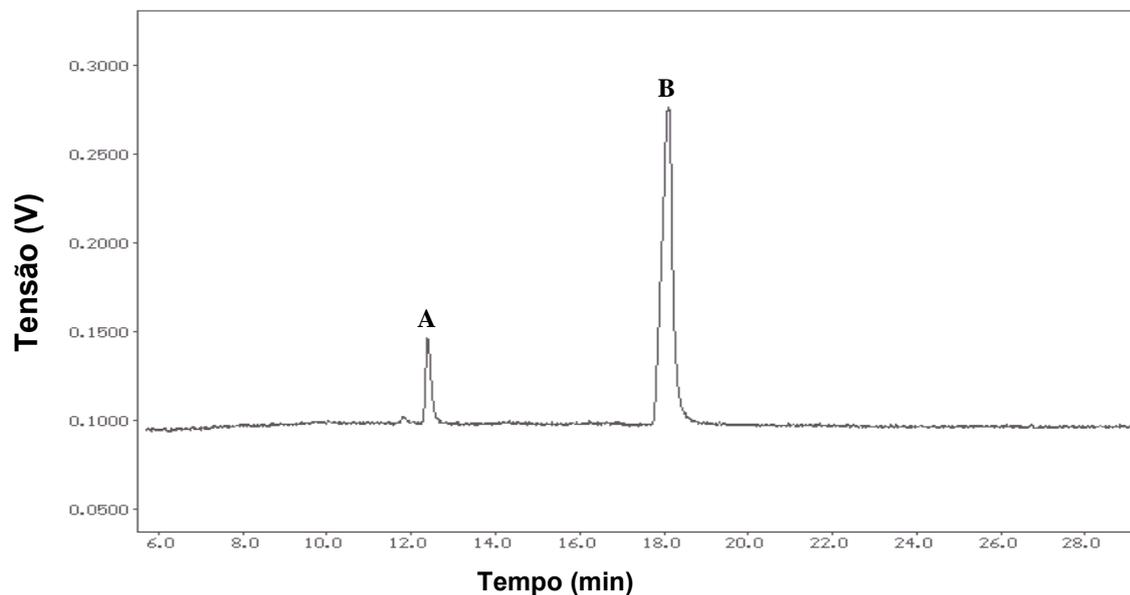


Figura 14- Cromatograma obtido por CG-quiral para uma alíquota da reação de bio-hidrogenação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por FP em sistema bifásico (*n*-hexano/tampão 30/30 mL, pH 4,5), 1 h, 25 °C. [(**B**) chalcona **15a**, (**A**) produto da reação de bio-hidrogenação]

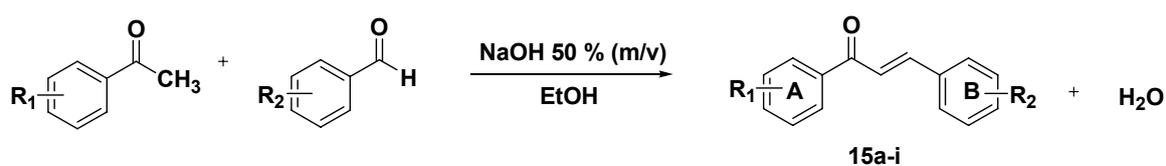
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, realizaram-se a biotransformação de compostos carbonílicos α,β -insaturados tais como as (2*E*)-1,3-diaril-2-propen-1-onas (chalconas) (**15a-i**) e (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (**16**) mediada pelas leveduras *Candida glabrata* (**Cgl**) e *Saccharomyces cerevisiae* (**FP**, **CAT-1** e **PE-2**). Primeiramente, serão abordados os resultados relacionados a síntese destes compostos e da redução com NaBH₄ para a obtenção dos álcoois racêmicos que serão utilizados como padrões nas análises de cromatografia gasosa e RMN-¹H. Em seguida, serão abordadas as reações de bio-hidrogenação desses substratos utilizando os biocatalisadores em meio orgânico ou em sistema bifásico.

4.1. Preparação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados **15a-i** e **16**

4.1.1. Preparação das chalconas **15a-i**

As (2*E*)-1,3-diaril-2-propen-1-onas **15a-i** foram preparadas a partir da reação de condensação aldólica entre diferentes benzaldeídos e diferentes acetofenonas, utilizando hidróxido de sódio como base e etanol como solvente, à temperatura ambiente (**Figura 15**).⁶⁸



15a R₁= H; R₂= H

15b R₁= H; R₂= 4-OCH₃

15c R₁= H; R₂= 3,4-*di*-O CH₃

15d R₁= H; R₂= 3,4-(OCH₂O)

15e R₁= H; R₂= 4-NO₂

15f R₁= 4-OCH₃; R₂= H

15g R₁= 3,4-*di*-OCH₃; R₂= H

15h R₁=3,4-(OCH₂O); R₂= H

15i R₁= 4-NO₂; R₂= H

Figura 15- Síntese das chalconas **15a-i**, via condensação aldólica básica.

As chalconas **15a-i** foram obtidas na forma sólida com coloração amarela de diferentes tonalidades e com bons rendimentos (60-94%). O tempo de reação foi dependente de cada composto sintetizado, variando de 1 até 48 horas. Os pontos de fusão obtidos experimentalmente apresentaram-se um pouco diferentes em algumas unidades em °C quando comparados aos dados obtidos da literatura, possivelmente por não estarem corrigidos. Além da determinação do ponto de fusão e pelas análises de CCD todas as chalconas apresentaram apenas uma mancha, indicando assim a sua pureza.

Tabela 2- Dados analíticos das chalconas **15a-i**.

Chalconas	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)	R _f	pf (°C) (pf lit)
15a	5	80	0,47 ^a	53-54 (57-58) ⁶⁵
15b	4	62	0,32 ^a	70-71 (75-77) ⁶⁵
15c	48	84	0,53 ^b	83-84 (87-89) ⁷⁴
15d	3	94	0,66 ^b	118-119 (117) ⁶⁵
15e	7	84	0,78 ^a	160 (160-163) ⁶⁵
15f	6	70	0,31 ^a	100-101 (104-105) ⁶⁶
15g	4	72	0,51 ^b	82-83 (85-87) ⁷⁴
15h	4	78	0,65 ^b	97-98 (97-98) ⁷⁴
15i	5	60	0,31 ^a	146-147 (145-147) ⁷⁴

(a) *n*-hexano:acet.etíla 9:1 (v:v) (b) *n*-hexano:acet.etíla, 6:4 (v:v)

Para todas as chalconas, substituídas ou não, foram realizadas análises de IV, CG-quiral, RMN-¹H e de ponto de fusão como citado na parte experimental. Para a chalcona **15a** além das análises citadas anteriormente, foi também realizada análise de CG-EM.

A chalcona **15a** foi selecionada para uma análise mais detalhada desta classe de compostos.

A **Figura 16**, apresenta o espectro de infravermelho da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (**15a**).

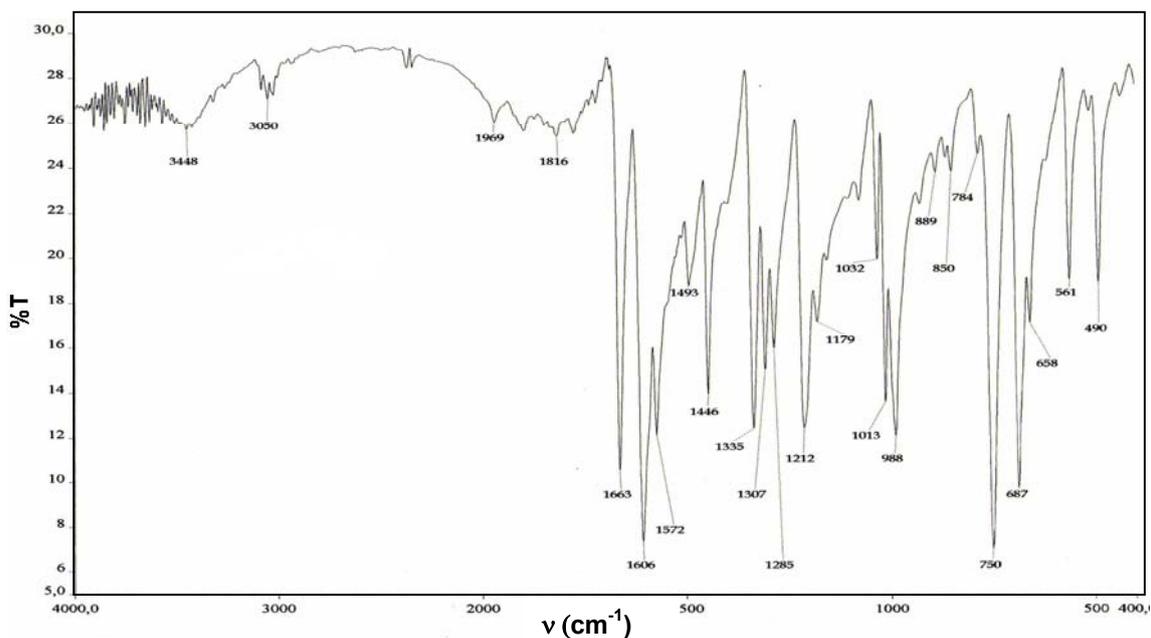


Figura 16- Espectro de infravermelho da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona. [pastilha de KBr]

No espectro de IV da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona, são observadas as bandas em 1663 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação carbono oxigênio da carbonila (C=O) de compostos α,β -insaturados, e em 1606 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação dos carbonos olefínicos conjugados com o grupo carbonila. Em 750 a 687 cm^{-1} , são observadas as bandas características das vibrações de deformação angular fora do plano das ligações carbono hidrogênio do anel aromático.⁸⁴

Na **Figura 17**, está demonstrado o cromatograma de CG-quiral da chalcona **15a**. Pela análise deste cromatograma, pode-se observar dois picos com tempo de retenção de 13,5 min e 17,3 min. O pico de maior intensidade (**B**-99,2%), refere-se a (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona e o pico com menor intensidade (**A**-0,80%), a alguma impureza e/ou um subproduto da reação de condensação aldólica entre o benzaldeído e a acetofenona.

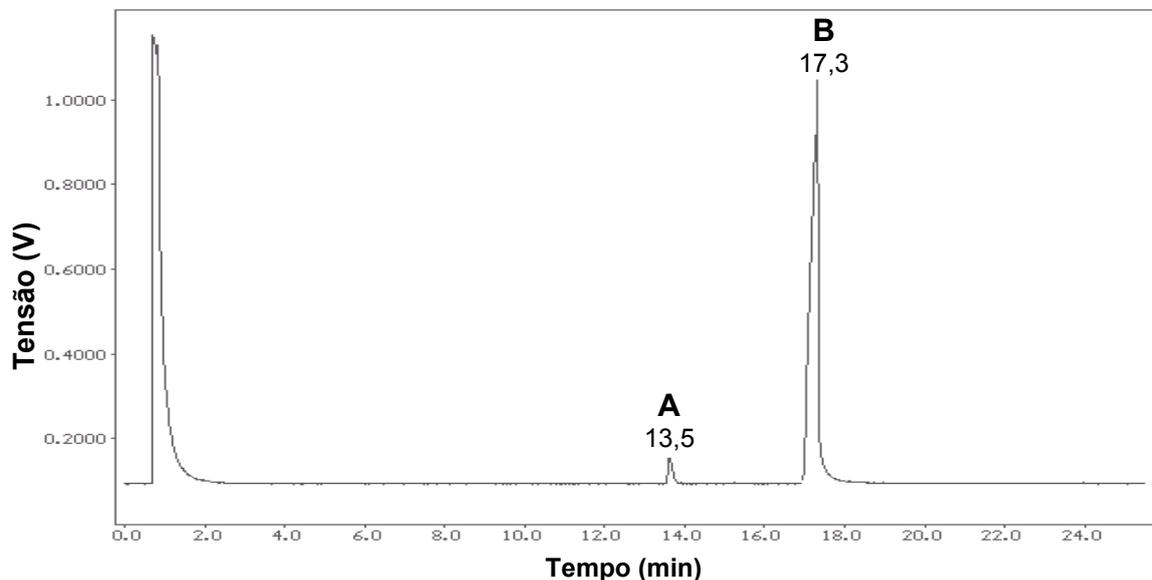


Figura 17- Cromatograma de CG-Quiral da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona em CH₃CN. [parâmetros operacionais: conforme descrito na Tabela 1]

O espectro de RMN-¹H da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona está demonstrado na **Figura 18**.

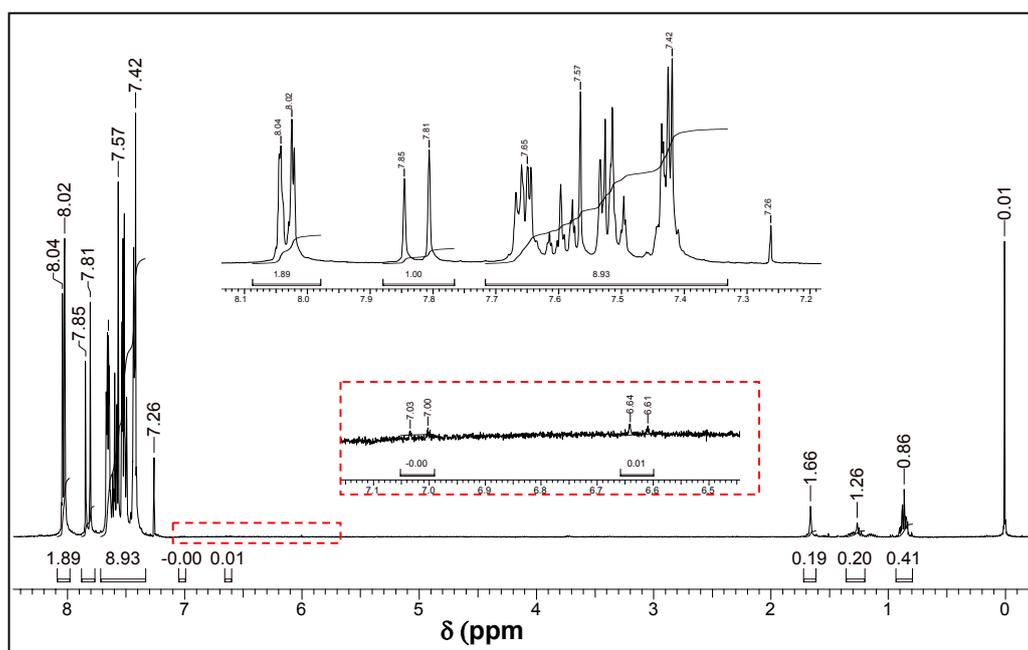


Figura 18- Espectro de RMN-¹H da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona. [CDCl₃, 400MHz]

No espectro de RMN-¹H, são evidenciados um multiplete em 7,42 a 7,67 ppm referentes aos hidrogênios 3', 4', 5', 2, 3, 4, 5, 6 e α , um dublete centrado em 7,83 ppm ($J=16,0$ Hz) referente ao hidrogênio β , e um dublete centrado em 8,03 ppm ($J=8,0$ Hz) referente aos hidrogênios 2' e 6'. Os valores da constante de acoplamento (J) obtidos confirmam a geometria *E* para o grupo funcional alceno deste composto. Centrado em 6,63 e 7,02 ppm, observam-se dois dupletes com menor intensidade com constante de acoplamento de 12,0 Hz.

Pela constante de acoplamento dos hidrogênios olefínicos pode-se afirmar que o composto majoritário (99%), cujo dublete apresenta uma constante de acoplamento é de 16,0 Hz é o isômero (*E*)-**15a**, e o produto em menor quantidade (1%) é o isômero (*Z*)-**15a**, cuja constante de acoplamento dos hidrogênios olefínicos é de 12,0 Hz. Os valores da constante de acoplamento dos hidrogênios olefínicos da (*Z, E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona estão de acordo com os obtidos por Yoshizawa e col., sendo de 15,5 Hz para o isômero *E* de 12,5 Hz para o isômero *Z*.

84,85

A **Figura 19**, apresenta o espectro de CG-EM da chalcona **15a**. A similaridade dos espectros de massas onde observa-se o íon molecular em m/z 207 bem como os outros fragmentos característicos, são evidências de que os picos **A** e **B** correspondem aos isômeros (*Z*)-**15a** e (*E*)-**15a**, respectivamente e corrobora com os resultados obtidos por RMN-¹H.

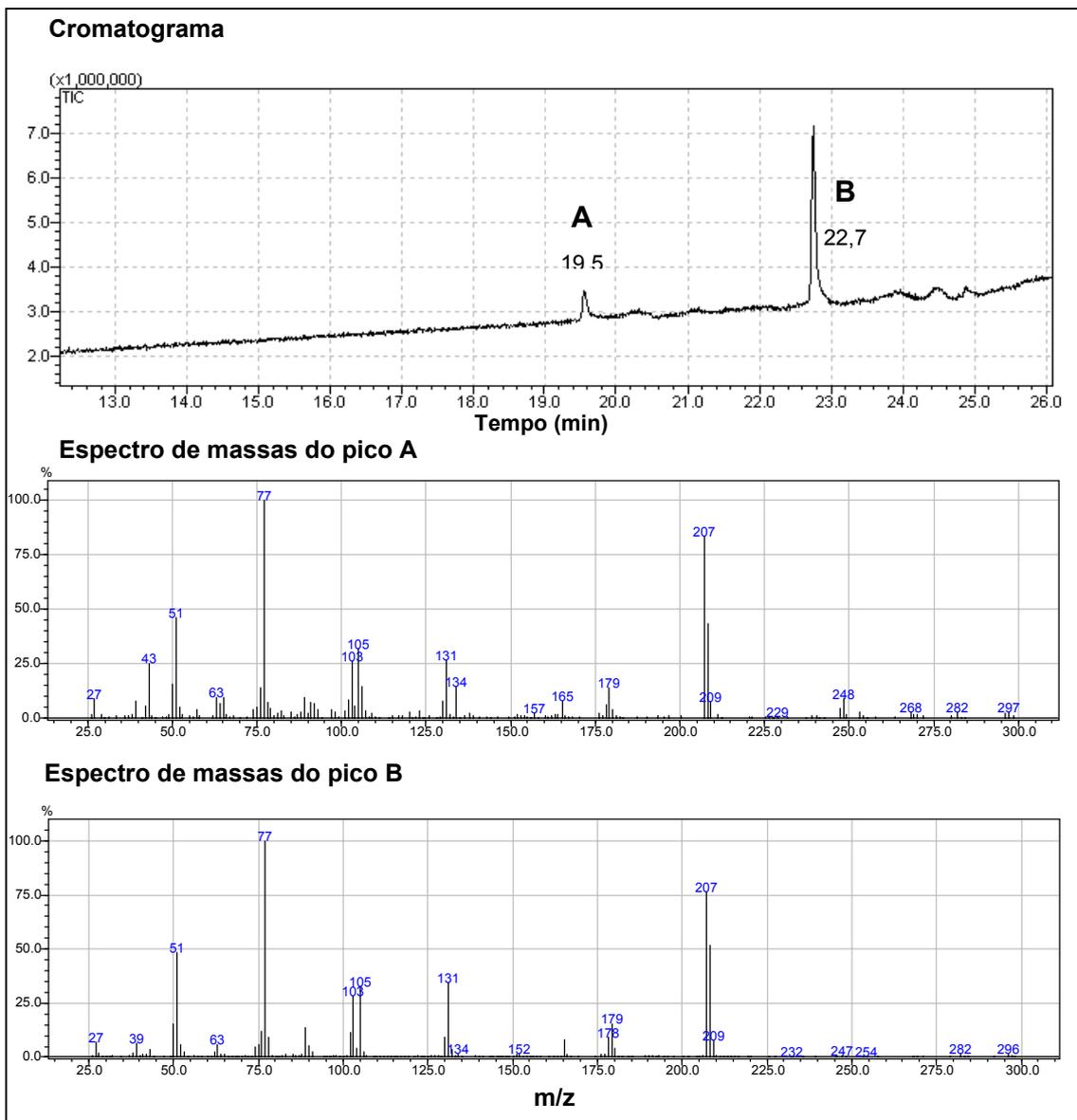


Figura 19- Cromatograma e espectros de massas da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona dissolvida em CH₂Cl₂. [Parâmetros operacionais: conforme descrito na **Tabela 1**]

Na **Figura 20**, estão apresentadas as propostas para os fragmentos correspondentes aos principais picos dos espectros de massas. O íon molecular e o pico base são observados em *m/z* de 208 e 77, respectivamente.

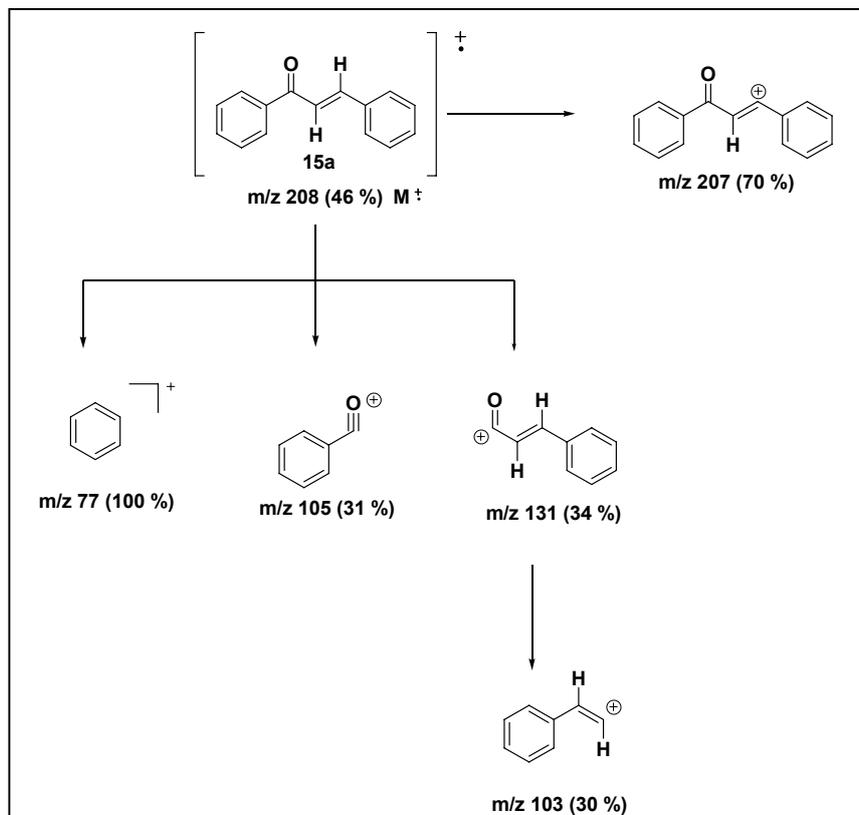


Figura 20- Propostas dos fragmentos para os principais picos obtidos nos espectro de massas da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona.

Através da análise espectroscópica de RMN-¹H, CG-EM e de infravermelho, foi possível observar os picos e bandas característicos para a confirmação da estrutura da chalcona sintetizada.

4.1.2. Preparação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (16)

A (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona foi preparada conforme procedimento descrito na literatura a partir do benzaldeído e da acetona, utilizando NaOH como base e etanol como solvente, à temperatura ambiente (**Figura 21**).⁷⁶

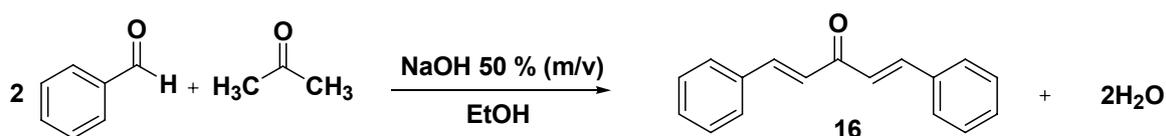


Figura 21- Síntese da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona *via* condensação aldólica básica.

A (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona foi obtida com rendimento de 50% em aproximadamente 1 h de reação. O ponto de fusão determinado foi de 109 °C o que está de acordo com o citado na literatura (112 °C).⁷⁶ Através das análises de **CCD**, foi observado somente uma mancha com R_f de 0,45 (*n*-hexano:acetato de etila 9:1 v/v).

A (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona foi devidamente caracterizada por técnicas de IV, CG-quiral, RMN-¹H e CG-EM.

A **Figura 22**, apresenta o espectro de infravermelho da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona.

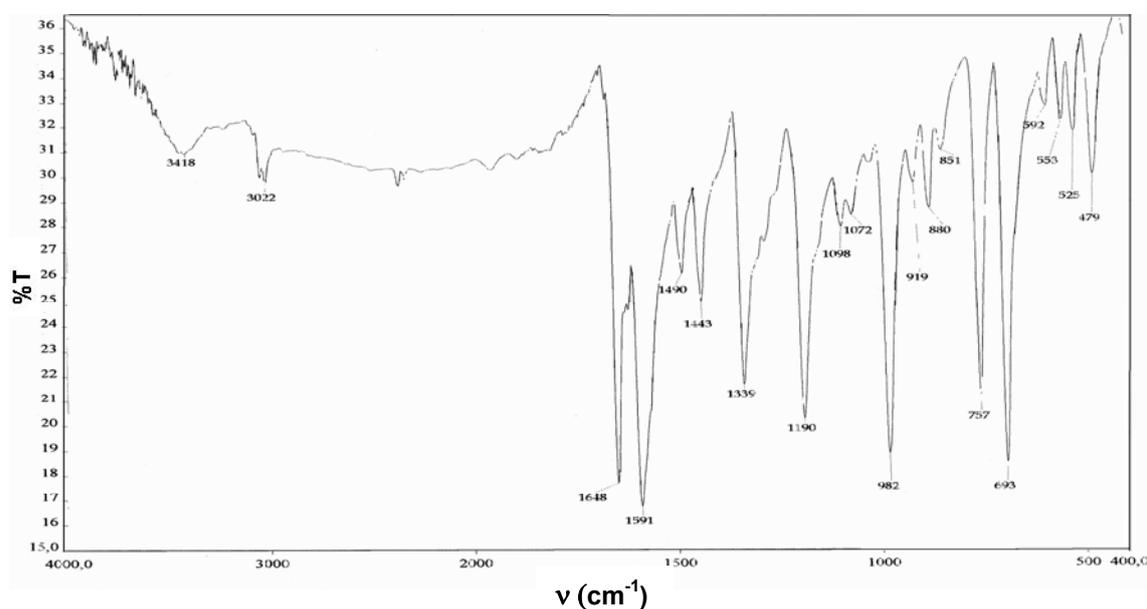


Figura 22- Espectro de infravermelho de **16**. [pastilha de KBr]

No espectro de IV, são observadas bandas na região de 3022 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-H dos anéis aromáticos. Em 1648 e 1591

cm^{-1} observam-se as bandas de estiramento referentes as ligações C=O e C=C de compostos carbonílicos α,β -insaturados, respectivamente. Em 757 a 693 cm^{-1} são observadas bandas características das vibrações de deformação angular fora do plano das ligações carbono hidrogênio do anel aromático.⁸⁴

A **Figura 23**, mostra o cromatograma da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona.

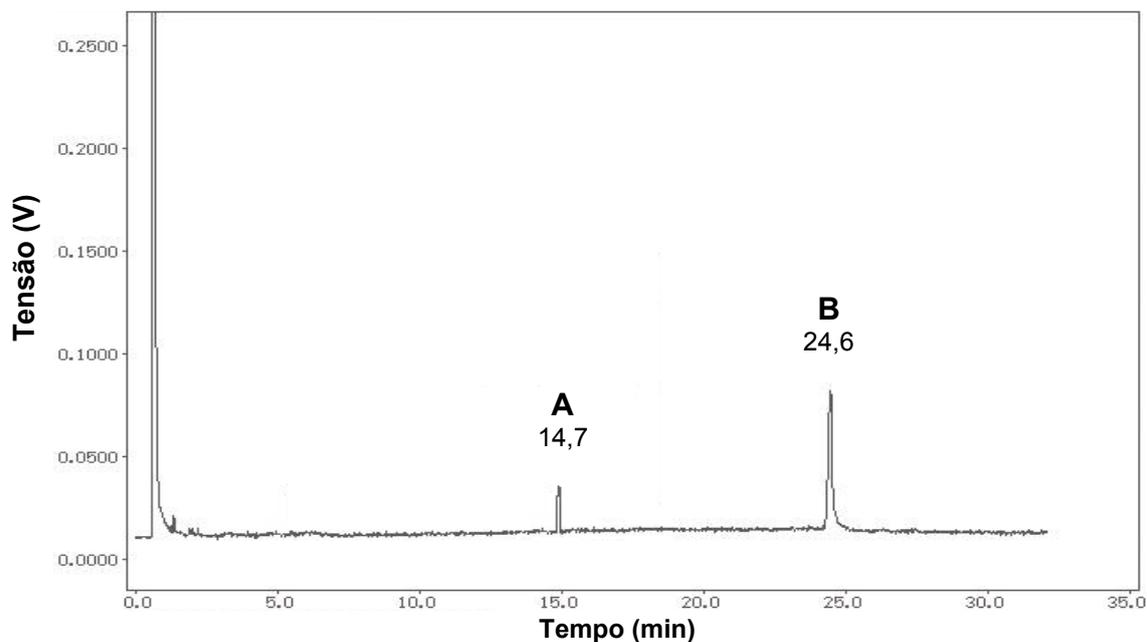


Figura 23- Cromatograma de CG-quiral da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona em CH_3CN . [Parâmetros operacionais: conforme descrito na **Tabela 1**]

Pela análise de CG-quiral, pode-se observar a presença de dois picos, um em maior proporção com o t_R de 24,6 min (94%) e outro em menor proporção com t_R de 14,7 min (6%). O pico de maior área (**B**) refere-se a (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona, e o de menor área refere-se a alguma impureza e/ou subproduto da reação.

A **Figura 24**, apresenta o espectro de RMN-¹H deste composto em CDCl_3 .

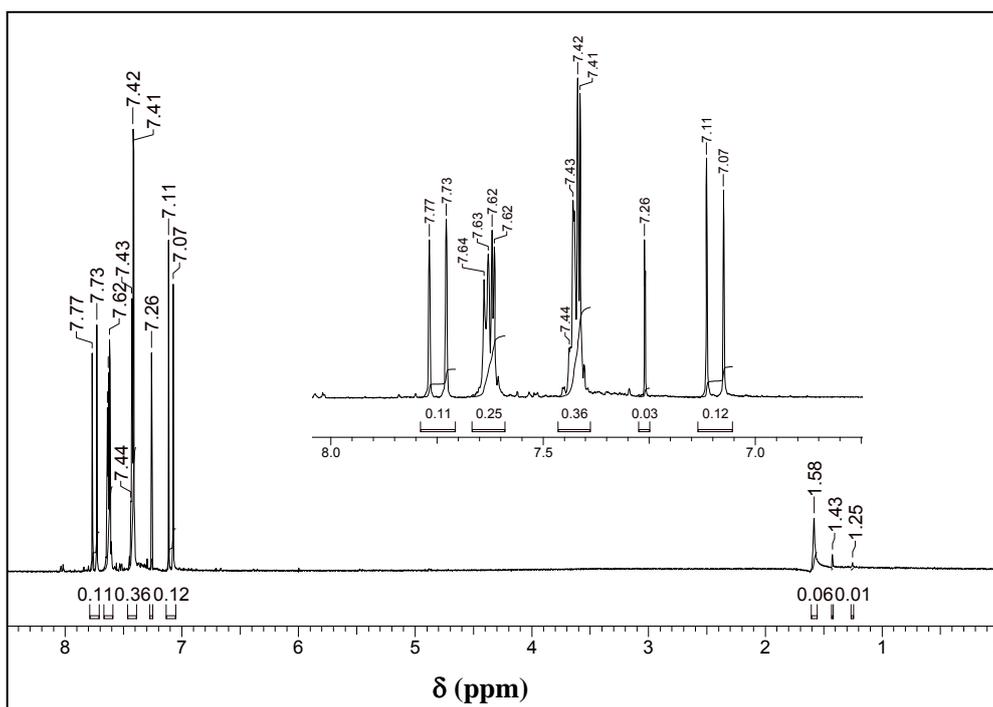


Figura 24- Espectro de RMN-¹H da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona. [CDCl₃, 400MHz]

No espectro de RMN-¹H são evidenciados um dublete centrado em 7,09 ppm ($J=16$ Hz) que foi atribuído aos 2 hidrogênios α , um dublete centrado em 7,75 ppm ($J=16$ Hz) referente aos 2 hidrogênios β . Os sinais na região de 7,42 e 7,62 ppm foram atribuídos aos hidrogênios 2, 3, 4, 5 e 6 dos anéis aromáticos. Estes dados são concordantes com os reportados na literatura.

A seguir, é apresentado o espectro de CG-EM para este composto (**Figura 25**).

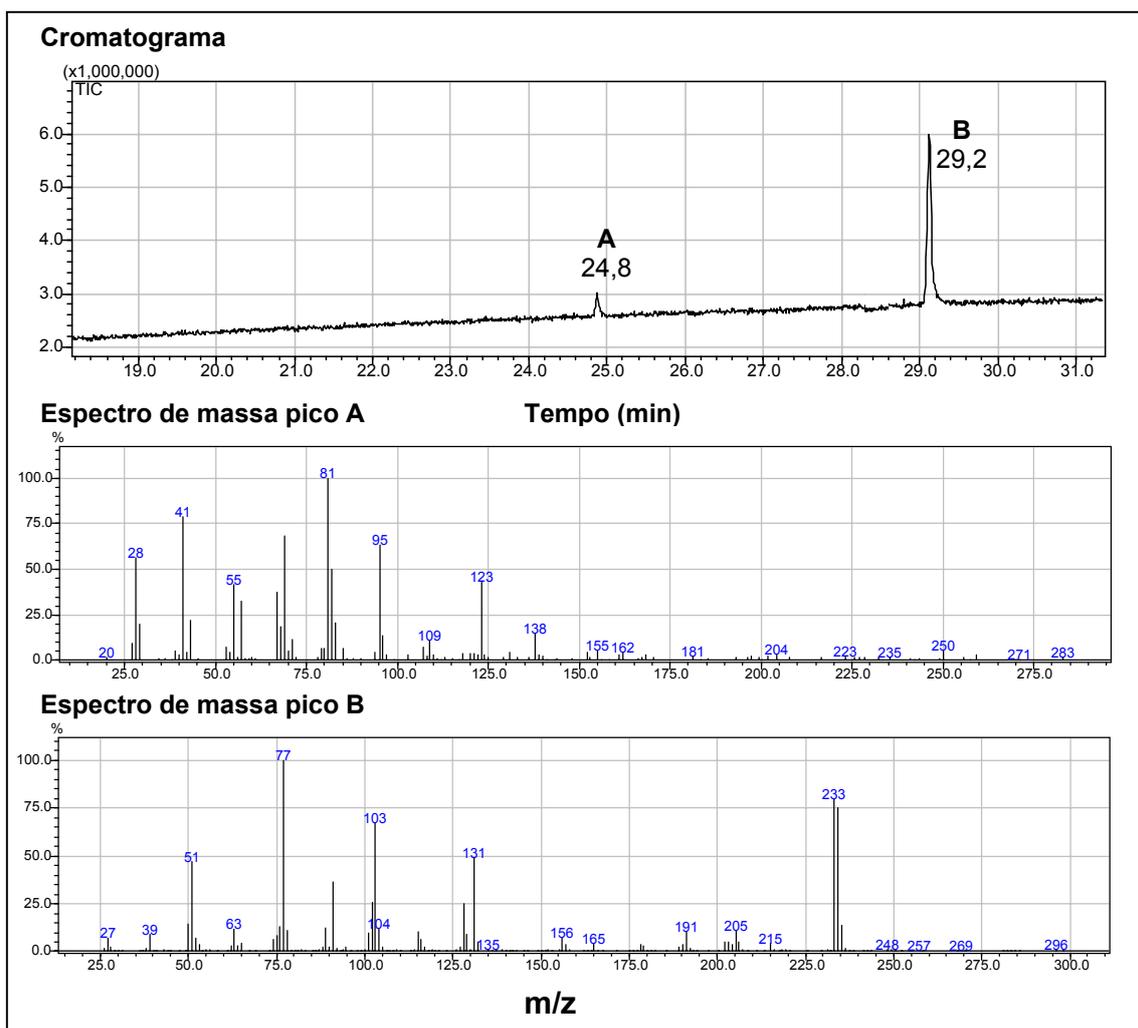


Figura 25- Cromatograma e espectros de massas da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona, em CHCl₃. [Parâmetros operacionais: conforme descritos na **Tabela 1**]

Pelas análises de CG-EM, pode-se observar que o pico **B** refere-se a (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona, sendo que a presença do íon molecular em m/z 234 e dos outros fragmentos em 131, 103, 91 e 77 (pico base) são característicos deste composto. O pico **A** refere-se a alguma impureza que não foi possível ser identificada por esta análise.

Na **Figura 26** estão apresentadas as propostas para os fragmentos correspondentes aos sinais observados no espectro de massas do pico **B**.

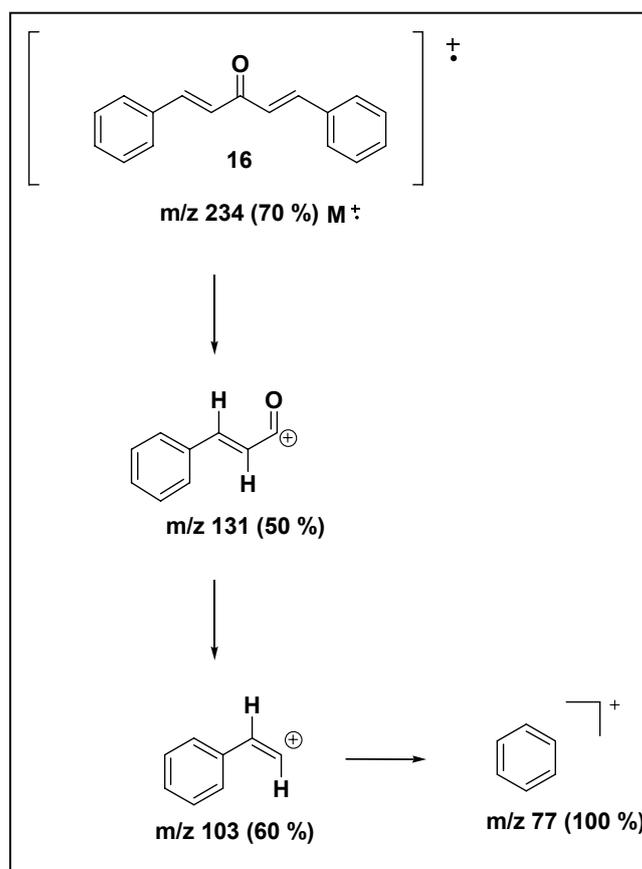


Figura 26- Propostas dos fragmentos para os principais picos obtidos no espectro de massas da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona.

Portanto, as análises de IV, RMN-¹H e CG-EM comprovam a obtenção da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona.

4.2. Redução *via* química dos substratos 15a-i e 16

Realizou-se a redução dos compostos carbonílicos α,β -insaturados **15a-i** e **16** *via* química utilizando borohidreto de sódio, para a obtenção dos álcoois racêmicos que serão utilizados como padrões nas análises de RMN-¹H e de cromatografia gasosa quiral. (**Figura 27**)

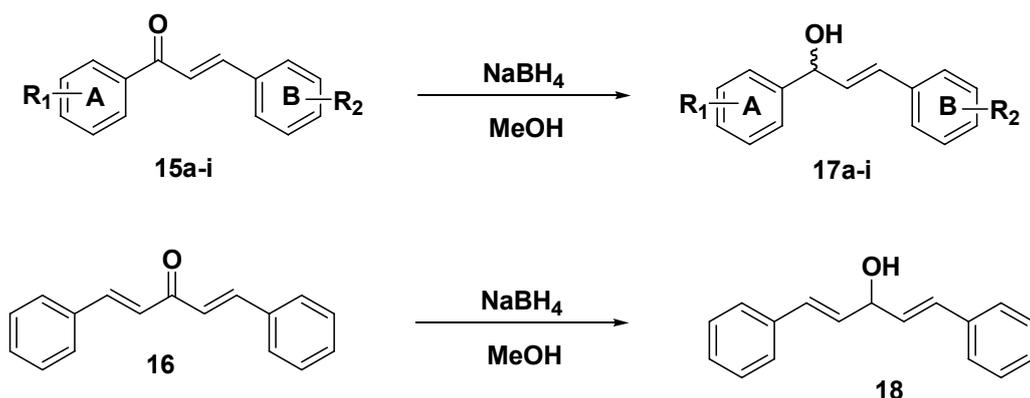


Figura 27- Reação de redução *via* química dos compostos carbonílicos α,β -insaturados **15a-i** e **16** com NaBH_4 .

Os rendimentos, pontos de fusão e medidas de rotação ótica ($[\alpha]_D$) dos compostos **17a-i** e **18**, estão listados na **Tabela 3**.

Todos os álcoois preparados *via* redução química com NaBH_4 foram obtidos com bons rendimentos (65-88%) em tempos de reação relativamente baixos (0,5 a 1 h), e apresentaram medidas de rotação ótica igual a zero, comprovando a obtenção do produto racêmico. Este é um resultado esperado, considerando que o NaBH_4 é um agente redutor aquiral.⁶⁴

Tabela 3- Dados analíticos para os álcoois racêmicos **17a-i** e o álcool **18**.

Álcool	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)	R _f	pf (°C) (pf lit)	$[\alpha]_D$ (CHCl_3 c, g/100mL)
17a	0,5	84	0,29 ^a	49 (56-57) ⁷⁷	0 (0,15)
17b	1	80	0,17 ^a	Óleo (50-52) ⁷⁸	0 (0,12)
17c	0,5	86	0,45 ^b	66-73 (*)	0 (0,18)
17d	0,5	70	0,54 ^b	Óleo (oleo) ⁷⁹	0 (0,13)
17e	1	70	0,15 ^a	80 (83-84) ⁷⁸	0 (0,10)
17f	0,5	86	0,16 ^a	Óleo (Óleo) ⁷⁹	0 (0,20)
17g	1	81	0,42 ^b	75-79(*)	0 (0,19)
17h	1	86	0,50 ^b	Óleo (*)	0 (0,23)
17i	1	65	0,18 ^a	56 (85-86) ⁷⁸	0 (0,12)
18	0,5	88	0,20 ^a	64-66 (64) ⁸¹	-

(a) *n*-hexano:acet. etila, 9:1 (v:v); (b) *n*-hexano:acet. etila, 6:4 (v:v); (*) não encontrado.

Os espectros de RMN-¹H em geral, apresentaram sinais característicos da formação dos álcoois, tais como um dublete em ~5,30 ppm, um duplo dublete em ~6,30 ppm e um dublete em ~6,60 ppm, referente aos hidrogênios H₇, H_α e H_β, respectivamente. Nos espectros de IV, foram observadas bandas em aproximadamente 3417 (ν OH) e 1607 cm⁻¹ (ν C=C). Portanto, as análises de RMN-¹H aliadas às de IV comprovam a formação dos álcoois.

É importante ressaltar que na coluna utilizada para as análises de cromatografia gasosa, não foi possível observar a separação dos álcoois racêmicos.

Os espectros de IV e RMN-¹H e os cromatogramas dos álcoois **17a-i** e **18** estão apresentados no **ANEXO**.

Após preparar e caracterizar todos os compostos carbonílicos α,β-insaturados **15a-i** e **16** e os álcoois **17a-i** e **18**, realizaram-se as reações de bio-hidrogenação de **15a-i** e **16** mediadas pelas leveduras *S. cerevisiae* e *C. glabrata*, em meio orgânico ou em sistema bifásico (**SB**). Primeiramente, serão discutidos os resultados obtidos na reação de bio-hidrogenação das chalconas **15a-i** e após os resultados obtidos com a (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona.

4.3 Biotransformação das chalconas 15a-i catalisada por leveduras *S. cerevisiae*

4.3.1 Biotransformação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (15a)

Na literatura está bem documentado que a biotransformação de compostos carbonílicos α,β-insaturados pode resultar na redução completa do sistema carbonílico α,β-insaturado com a formação do álcool saturado, a redução exclusiva da carbonila levando ao álcool alílico correspondente ou a hidrogenação exclusiva da ligação dupla carbono carbono com formação da cetona saturada.^{11,64}

Na **Figura 28**, são apresentados os possíveis produtos obtidos na biotransformação das chalconas **15a-i**

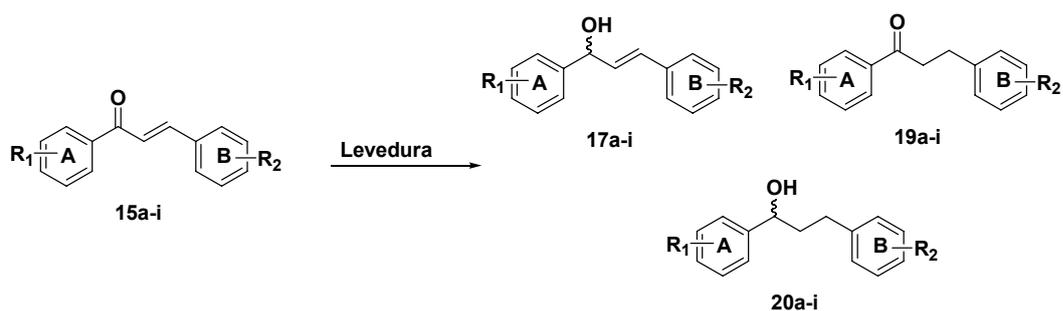


Figura 28- Prováveis produtos obtidos na biotransformação das chalconas **15a-i** mediada por leveduras.

A fim de verificar qual foi o produto formado na biotransformação da chalcona **15a** mediada por **FP** em sistema bifásico, foram retiradas alíquotas periodicamente, e a formação dos produtos analisada por cromatografia gasosa quiral e CG-EM.

A **Figura 29**, mostra a sobreposição dos cromatogramas de uma alíquota da biotransformação da chalcona **15a** mediada por **FP** em sistema bifásico (pH 4,5), 1 h, temperatura ambiente (picos **A** e **B**), e do álcool racêmico formado *via* redução química da chalcona **15a** com NaBH_4 (pico **C**).

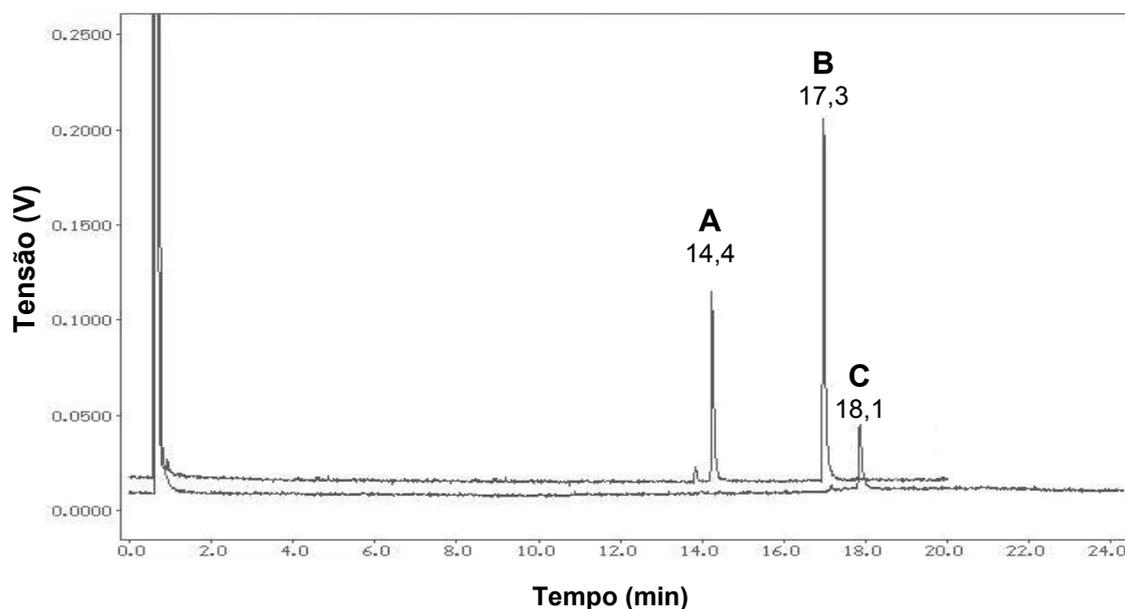


Figura 29- Sobreposição dos cromatogramas da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (**B**), do (2*E*)-(R,S)-1,3-difenil-2-propen-1-ol (**C**) e do produto da reação biocatalisada (**A**) em CH_3CN , c = 35 %. [Parâmetros operacionais: conforme descrito na **Tabela 1**]

Observa-se pela sobreposição dos cromatogramas que o produto formado na reação enzimática (pico **A**) e química (pico **C**) apresentam tempo de retenção de 14,4 e 18,1 min, respectivamente, indicando que o produto da reação da chalcona **15a** catalisada por **FP** não foi o álcool racêmico.

Para verificar qual foi o produto formado na biotransformação da chalcona **15a** mediada por **FP** em sistema bifásico, realizou-se análise de CG-EM. O cromatograma e os espectros de massas de uma alíquota desta reação estão demonstrados na **Figura 30**.

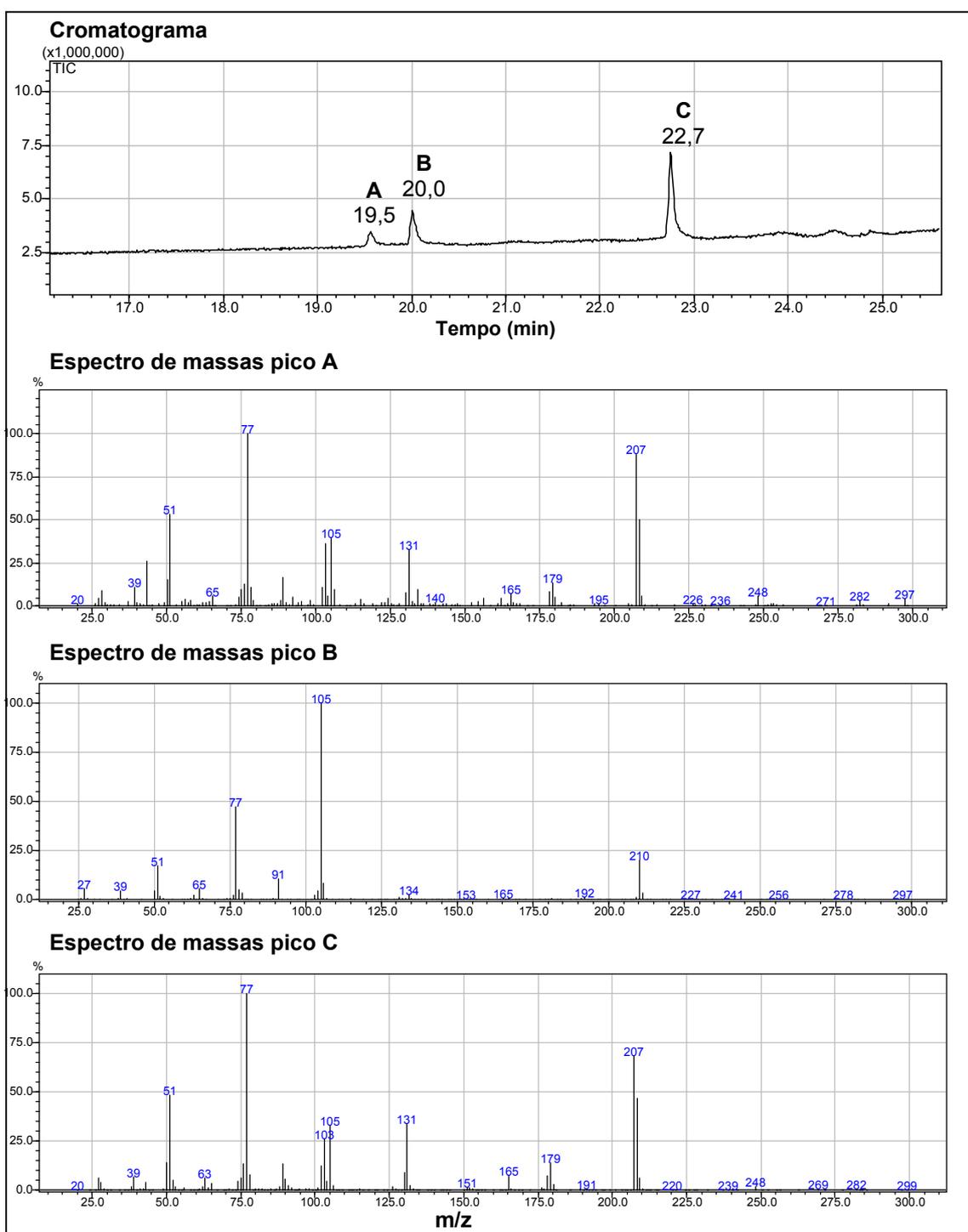


Figura 30- Cromatograma e espectro de massas da uma alíquota da reação enzimática da chalcona **15a** mediada por **FP** em sistema bifásico, (*Z*)-chalcona (pico **A**), (*E*)-chalcona (pico **C**) produto da reação biocatalisada (pico **B**). [Parâmetros operacionais: conforme descrito na **Tabela 1**]

A análise do pico **B** mostra a presença do íon molecular em m/z 210 (25%) e de outros fragmentos em 105, 91 e 77, evidenciando que ocorreu a hidrogenação da ligação dupla carbono-carbono, formando o composto **19a**.

A **Figura 31**, apresenta as propostas dos fragmentos para os principais sinais obtidos no espectro de massas de uma alíquota da reação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por **FP** em sistema bifásico.

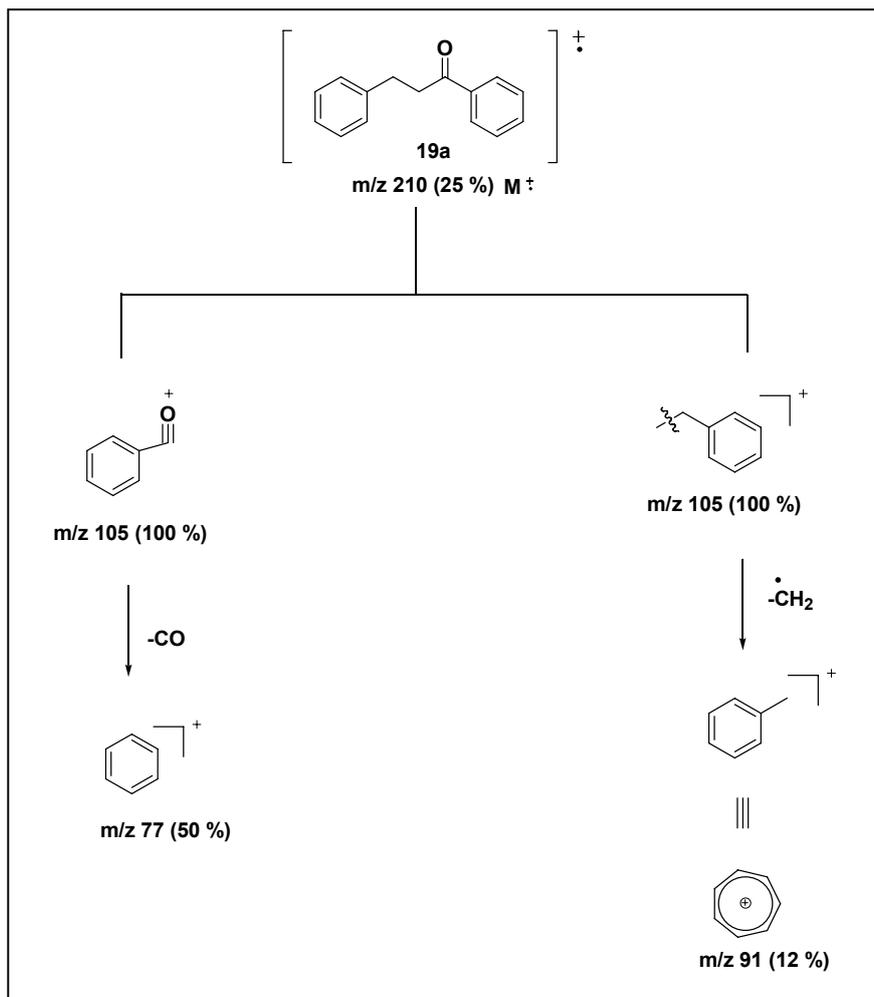


Figura 31- Propostas dos fragmentos para os principais sinais obtidos no espectro de massas de uma alíquota da reação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por **FP** em sistema bifásico.

Um resultado interessante que foi observado nos cromatogramas de CG-quiral e CG-EM é que a (*Z*)-chalcona **15a** não foi reduzida, e isto pode ter ocorrido devido ao encaixe não adequado deste substrato no sítio ativo, evidenciando

também a importância dos efeitos estéreos em reações biocatalisadas.¹¹

O produto obtido (pico B) na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** mediado por **FP** foi isolado, purificado por cromatografia em coluna e analisado por IV e RMN-¹H. Na **Figura 32**, está demonstrado o espectro de IV.

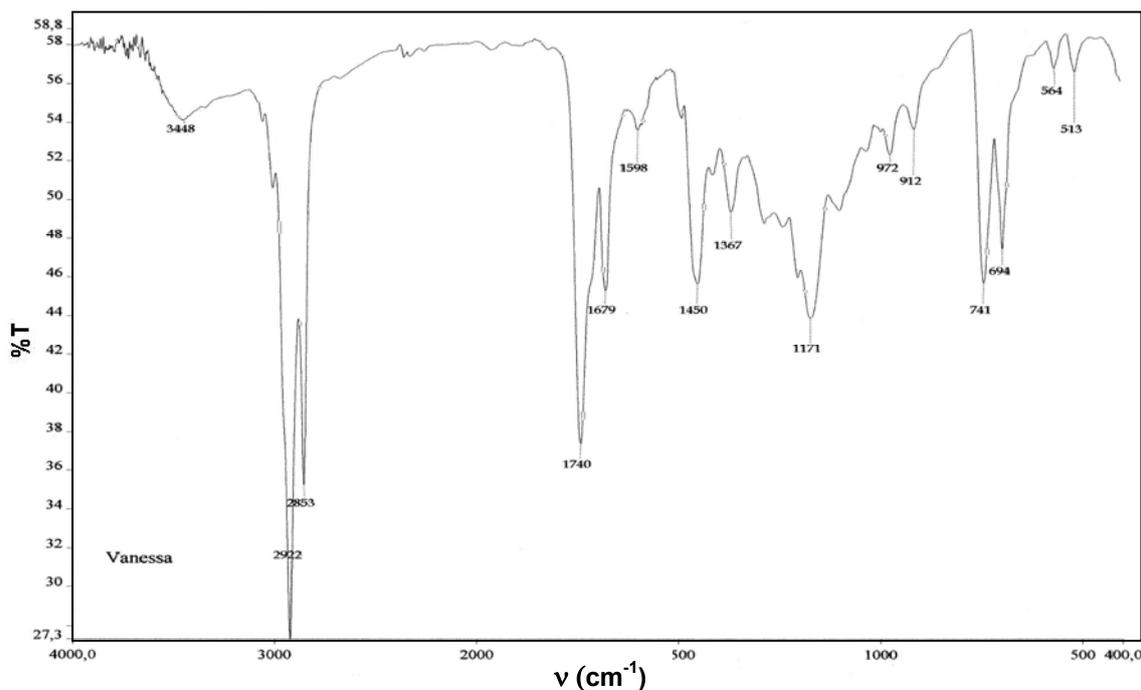


Figura 32- Espectro de infravermelho do produto obtido na reação de bio-hidrogenação da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por **FP** em sistema bifásico. [pastilha de KBr]

O espectro de IV do produto da reação biocatalisada apresentou uma banda em 2922 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação carbono hidrogênio de aromáticos, em 1740 cm⁻¹ observa-se uma banda referente ao estiramento da ligação carbono oxigênio da carbonila (C=O). Em 741 a 694 cm⁻¹ são observadas bandas características das vibrações de deformação angular fora do plano das ligações carbono hidrogênio do anel aromático. Este resultado também indica que o produto formado foi o da hidrogenação da ligação carbono-carbono.

A **Figura 33**, mostra o espectro e RMN-¹H do produto obtido na reação de bio-hidrogenação de **15a** com **FP** em sistema bifásico.

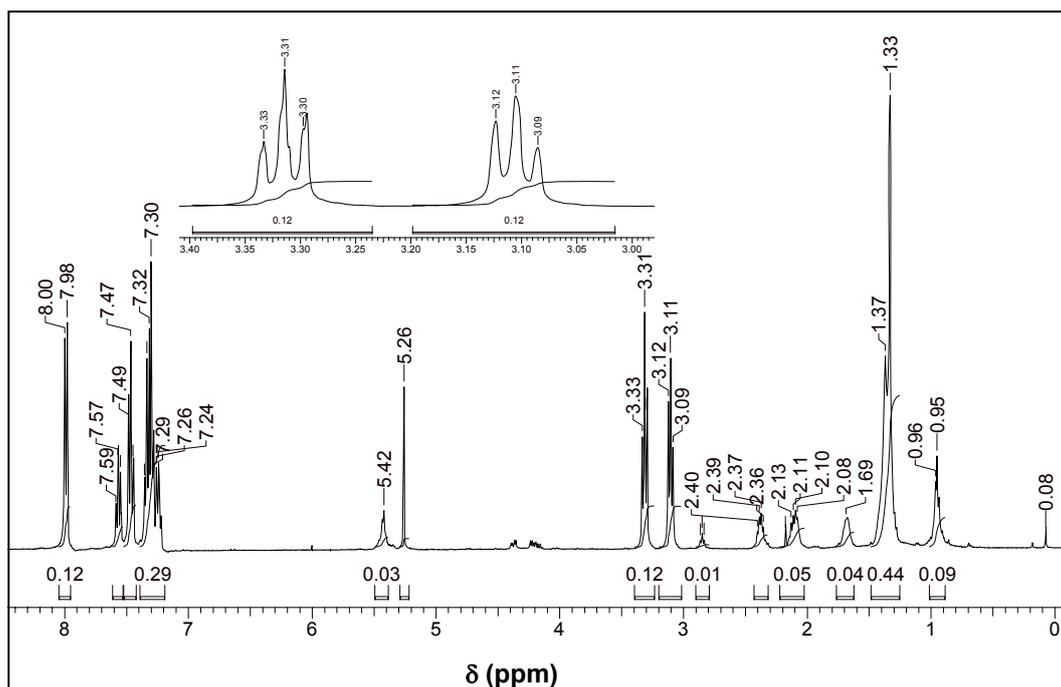
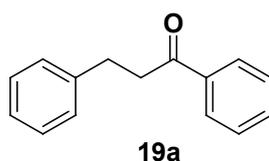


Figura 33- Espectro de RMN-¹H do produto obtido na reação de bio-hidrogenação da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por **FP** em sistema bifásico. [CDCl₃, 400MHz]

Os sinais na região de 7,24-8,00 ppm são referentes aos 10 hidrogênios dos anéis aromáticos. Os tripletes centrados em 3,33 e 3,16 ppm são atribuídos aos 4 hidrogênios metilênicos do produto da hidrogenação da ligação dupla carbono-carbono. Os sinais em 2,36, 2,11, 1,37 e 0,95 ppm, correspondem a vestígios dos solventes acetona e *n*-hexano usados na limpeza do tudo e como meio reacional.

Através da análise destes dados, juntamente com as de CG-quiral, CG-EM e IV, discutido anteriormente, conclui-se que o composto formado *via* redução enzimática foi a dehidrochalcona 1,3-difenil-1-propanona (**19a**).



A partir da confirmação da estrutura do produto formado na reação de bio-hidrogenação de **15a** mediada por **FP** serão apresentados e discutidos os resultados obtidos desta reação catalisada pelas leveduras *S. cerevisiae*, sob diferentes condições, e a seguir os dados obtidos com a *C. glabrata*.

Os estudos iniciais relacionam-se a otimização das condições experimentais da reação de bio-hidrogenação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1ona (**15a**) catalisada pelas leveduras *S. cerevisiae* (**FP**, **CAT-1** e **PE-2**). Posteriormente, foi realizado o estudo da influência dos grupos substituintes em ambos os anéis aromáticos das chalconas **15a-i**.

4.3.2 Estudo dos sistemas biocatalíticos

Esta bem documentado na literatura que o meio aquoso é o mais freqüentemente utilizado nas reações de redução mediadas por microorganismos, pois dessa forma as condições ambientais ideais para a sobrevivência dos microorganismos são mantidas. Entretanto, a solubilização do substrato no meio reacional e a posterior extração do produto formado tornam-se fatores limitantes ao processo, e podem ser superadas com o uso de solvente orgânico.^{17,18, 19,20}

Para que as células mantenham sua atividade catalítica em solvente orgânico torna-se necessário protegê-las e, portanto o emprego de técnicas de imobilização e/ou de proteção celular deve ser estudado para cada sistema em particular.

Para verificar o efeito de imobilização e de proteção celular na reação de bi-hidrogenação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona catalisada por **FP**, foram utilizados diferentes sistemas reacionais, e os resultados estão apresentados na **Figura 34**. Estes incluem o uso do fermento de pão na sua forma livre (**FP**); imobilizado em mont-K10 (**FP/K10**); na presença de sacarose (**FP/S**) e trealose (**FP/T**); em sistema bifásico (**FP/SB**); bem como em sistema bifásico na presença de sacarose (**FP/SB/S**) e trealose (**FP/SB/T**).

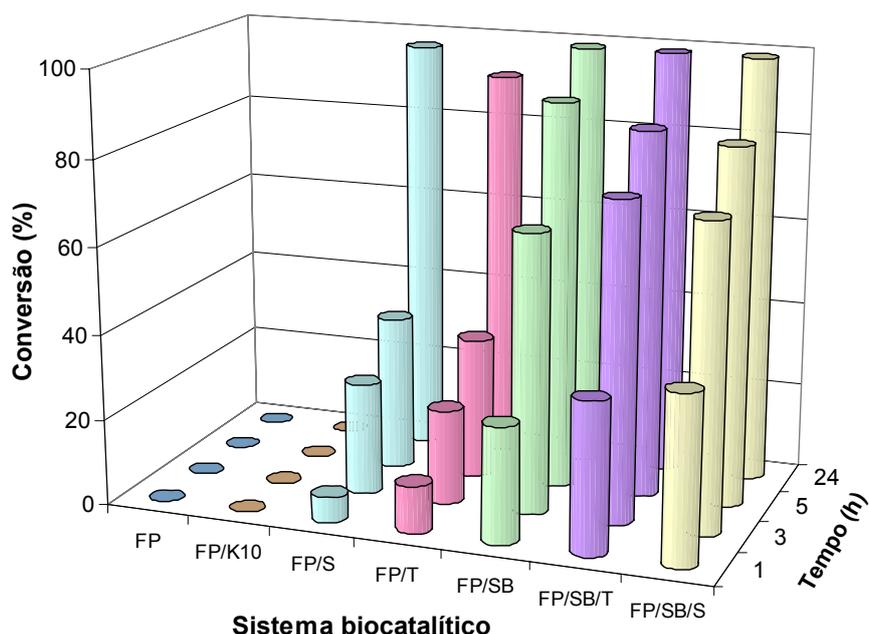


Figura 34- Efeito do sistema biocatalítico na reação de bio-hidrogenação da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por **FP**. [condições reacionais: 208,0 mg (1,0 mmol) substrato, 100,0 gL⁻¹ **FP**, 30 mL de *n*-hexano, 2,5 mL trealose, 2,5 mL sacarose, 30 mL de solução tampão K₂HPO₄/ácido cítrico (0,2 M/0,1 M, pH 4,5), 18 g mont-K10, 25 °C, agitação magnética, conversão determinada por CG-quiral]

Como pode ser observado na **Figura 34**, as conversões em (2E)-1,3-difenil-1-propanona (**19a**) foram dependentes do meio reacional utilizado. As maiores foram obtidas quando se utilizou os sistemas **FP/SB**, **FP/SB/T** e **FP/SB/S**, sendo de 27-90%, 35-85% e 39-83%, respectivamente no período de 1-5 horas. Após 24 h, as conversões foram máximas ao utilizar estes sistemas. Foram obtidas conversões moderadas a ruins com os sistemas **FP/S** e **FP/T** no período de 1-5 h, sendo de 6-36% e 11-33%, respectivamente. Após 24 h as conversões foram de 97% com o sistema **FP/S** e de 91% com o **FP/T**.

Quando o **FP** foi utilizado na forma livre ou imobilizado em **K10**, não foi observado a formação do produto. Este é um resultado esperado pois já está bem documentado na literatura que a adição de água ao meio reacional é indispensável para promover as reações catalisadas por leveduras.^{21,24,42,86,87}

Como o sistema bifásico mostrou ser o método de imobilização e/ou de

proteção celular mais eficiente na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** mediada por **FP**, este foi utilizado nos estudos subsequentes.

4.3.3 Influência da concentração das leveduras

A influência da concentração das leveduras *S.cerevisiae* (**FP**, **CAT-1** e **PE-2**) foi estudada na reação de bio-hidrogenação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (**15a**) em sistema bifásico a 25 °C. As concentrações das leveduras utilizadas foram de 100,0, 66,7 e 33,3 gL⁻¹. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 35**.

Como pode ser observado, aumentando a concentração das leveduras *S. cerevisiae*, as conversões em produto aumentam principalmente nas primeiras horas de reação. Em 5 h de reação as conversões aumentaram de 46-90%, 41-87% e de 32-98% com o aumento da concentração das leveduras de **FP**, **CAT-1** e **PE-2** de 33,3 a 100,0 gL⁻¹ respectivamente. Após 48 h, as conversões em **19a** variaram pouco com o aumento da concentração de levedura, permanecendo entre 92 e 99% para as três leveduras.

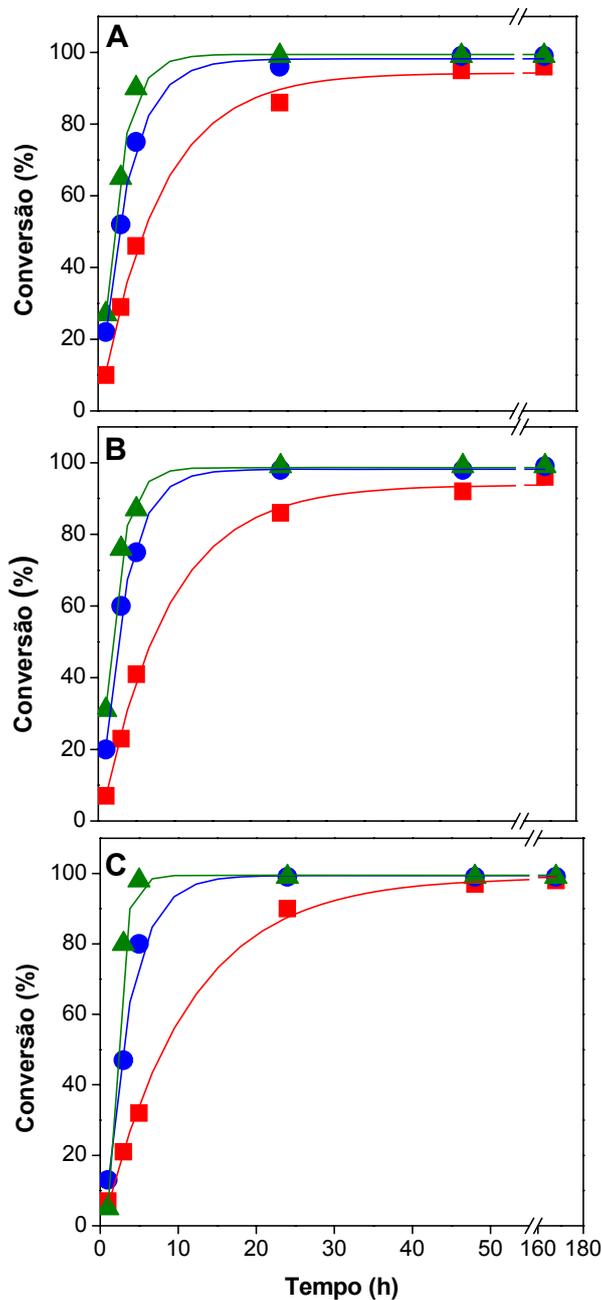


Figura 35- Valores de conversões da reação de bio-hidrogenação de **15a** mediada por **FP (A)**, **CAT-1 (B)** e **PE-2 (C)** em função do tempo com diferentes concentrações dos biocatalisadores 100,0 gL⁻¹ (—▲—), 66,7 gL⁻¹ (—●—) e 33,3 gL⁻¹ (—■—). [Condições reacionais: 208,0 mg (1,0 mmol) substrato, 30 mL tampão K₂HPO₄/ácido cítrico (0,2 M/ 0,1 M, pH 4,5), 30 mL *n*-hexano, agitação magnética, 25 °C]

Para uma análise mais refinada da influência da concentração das leveduras *S. cerevisiae* na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** em sistema bifásico, a partir dos valores de conversão em função do tempo, obteve-se os dados de velocidade inicial que foram relacionados com a concentração do biocatalisador (**Figura 36**).

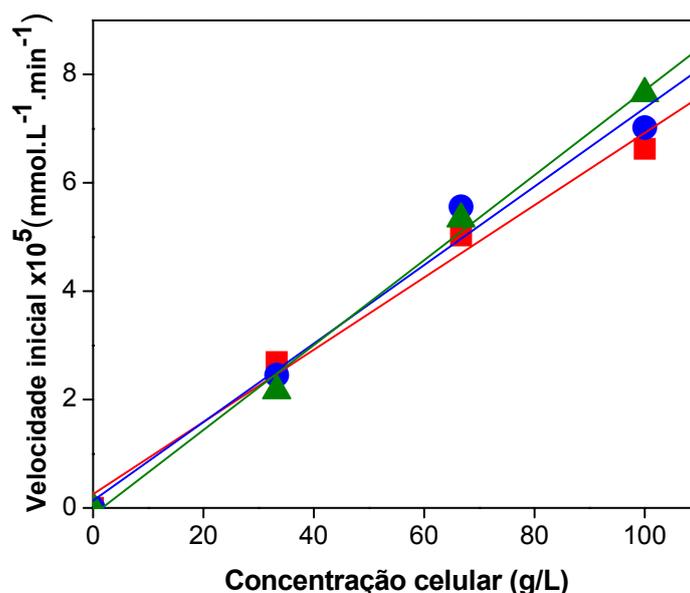


Figura 36- Velocidade inicial da reação de bio-hidrogenação de **15a** em função da concentração da levedura **PE-2** (—▲—), **CAT-1** (—●—) e **FP** (—■—). [Condições reacionais: conforme descrito na **Figura 35**]

Observa-se que dentro da faixa de concentração utilizada, a velocidade inicial aumentou de maneira linear com o aumento da concentração das leveduras *S. cerevisiae*.

A maior velocidade inicial foi obtida com $100,0 \text{ gL}^{-1}$ das leveduras **FP**, **CAT-1** e **PE-2** sendo de $6,63 \times 10^{-5}$, $7,02 \times 10^{-5}$ e $7,65 \times 10^{-5} \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivamente. Estes resultados mostram a eficiência similar destes biocatalisadores.

Considerando estes resultados, o tempo de 3 horas e concentração de **FP**, **CAT-1** e **PE-2** de $100,0 \text{ gL}^{-1}$ foram selecionados para os experimentos subsequentes.

4.3.4 Influência da agitação

Um fator muito importante que deve ser avaliado nas reações biocatalisadas em sistema bifásico é a agitação devido ao fato desta influenciar na difusão e partição do substrato e produtos no sistema reacional.^{42,88} Entretanto, deve-se salientar que uma agitação muito forte pode causar a desativação da enzima por estresse mecânico e químico.¹¹

Para avaliar o efeito da agitação na reação de bio-hidrogenação da **15a** mediada por **FP** realizaram-se as reações em Shaker (agitação orbital, 150rpm), banho termostaticado tipo Dubnoff (agitação horizontal) e agitação magnética com temperatura controlada. Os resultados de conversão em produto em função do tempo de reação estão apresentados na **Figura 37**.

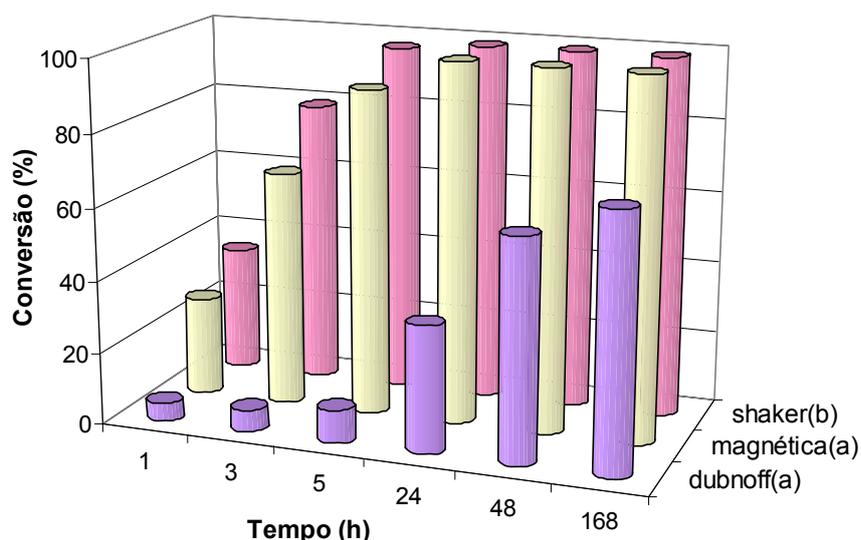


Figura 37- Efeito da agitação na reação de bio-hidrogenação de **15a** mediada por **FP** em sistema bifásico. [condições reacionais: conforme descrito na **Figura 35**, exceto a agitação e temperatura, (a) Temp. 25 °C, (b) Temp. ambiente]

Pode-se observar, que a conversão em produto foi dependente do tipo de agitação utilizada. As maiores conversões foram obtidas quando a reação foi realizada em shaker (150 rpm) e agitador magnético, sendo de 35-99% e 27-99% no período de 1 a 24 h. Após este período as conversões em **19a** atingiram o máximo (>99%) ao utilizar ambos os tipos de agitação. Quando as reações foram

realizadas em banho termostático tipo dubnoff, as conversões em **19a** apresentaram uma cinética mais lenta, atingindo o máximo de 70% em 168 h.

No período de 1-168 h não foi observado a formação do produto da redução da carbonila, sendo formado apenas a dehidrochalcona **19a**.

Lou e col. realizaram o estudo do efeito da agitação na redução assimétrica de acil silanos catalisada por uma levedura *S. cerevisiae* mutante irradiada por UV (UVSC II) imobilizada em alginato de sódio em sistema bifásico. Eles observaram que ocorreu um aumento significativo na velocidade inicial da reação de redução com o aumento da velocidade de agitação até 150 rpm, sendo esta a mais adequada. Em velocidades maiores não foi observado um aumento significativo na conversão.⁸⁹

É importante ressaltar que realizando a reação em shaker, não foi possível o controle adequado da temperatura, e como este é um parâmetro muito importante nas reações biocatalisadas, optou-se em utilizar o agitador magnético com temperatura controlada para realizar os experimentos subsequentes, que incluem o efeito da temperatura, pH, concentração do substrato, solvente orgânico, volume da fase aquosa/orgânica e de grupos substituintes.

4.3.5 Influência da temperatura

O efeito da temperatura em reações mediadas por enzimas está fundamentado em dois aspectos. O primeiro, é que com o aumento da temperatura, em geral, ocorre um aumento da velocidade reacional e isto pode ser explicado pela teoria de Arrhenius que se baseia na hipótese de que duas partículas devem se colidir na orientação correta e com energia cinética suficiente para que os reagentes sejam transformados em produtos.⁹⁰ O segundo é que as enzimas possuem uma temperatura ótima na qual a sua atividade é máxima, sendo que uma variação brusca pode ocasionar a desnaturação da mesma e com consequência a diminuição e/ou perda da atividade catalítica.⁹¹

A fim de verificar a influência da temperatura na reação de bio-hidrogenação da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona catalisada pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (FP, CAT-1 e PE-2) em sistema bifásico, variou-se a

temperatura de 25 a 50 °C em pH 4,5, e os resultados estão apresentados na **Figura 38**.

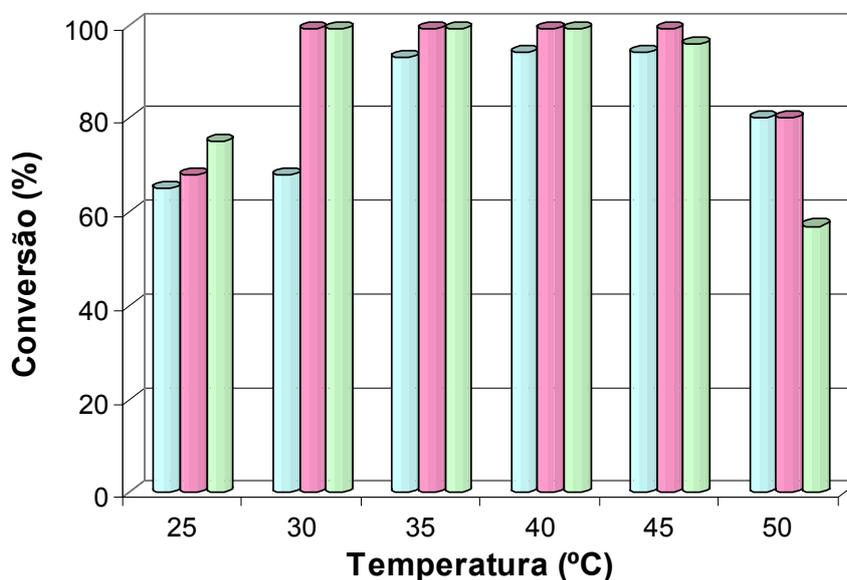


Figura 38- Efeito da temperatura na reação de bio-hidrogenação de **15a** mediada pelas leveduras **FP** (□), **CAT-1** (□) e **PE-2** (□) em sistema bifásico. [condições reacionais: conforme descrito na **Figura 35**, exceto a temperatura]

As conversões em produto aumentaram de 68-99% e de 75-99% com o aumento da temperatura de 25 a 30 °C respectivamente, quando as reações foram mediadas pelas leveduras **CAT-1** e **PE-2**. Na faixa de temperatura de 30 a 45 °C, as conversões em **19a** mantiveram-se constantes (~99%). Após 45 °C, houve uma diminuição das conversões em produto.

Quando utilizou-se o fermento de pão as conversões em produto aumentaram de 65 para 93% com o aumento da temperatura de 25 para 35 °C. Entre 35-45 °C, as conversões em **19a** foram de 93-94%, e à 50 °C e foi de 80%.

Estes resultados evidenciam a boa tolerância das leveduras *S. cerevisiae* em temperaturas maiores que 30 °C. Resultados similares foram obtidos por Matsuda e col. na redução assimétrica de acetofenonas em meio aquoso catalisada pela levedura *Geotrichum candidum* livre ou imobilizada em resina de troca iônica com polialilamina. Nas faixas de temperaturas de 30-40 °C e de 30-50 °C, as conversões foram de aproximadamente 80%.⁹²

A partir destes resultados a temperatura de 35 °C foi selecionada para os estudos subsequentes.

4.3.6 Influência do pH do tampão

Um outro fator importante que deve ser avaliado nas reações catalisada por enzimas e/ou microorganismos é pH do meio reacional. Cada enzima apresenta um pH ótimo na qual sua atividade é máxima, e variações do pH podem desnaturar a enzima e como conseqüência conduzir a diminuição e/ou perda da atividade catalítica. Isso acontece devido a protonação ou desprotonação dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo, ocasionado repulsões eletrostáticas na estrutura tridimensional e, como conseqüência, o rompimento das ligações de hidrogênio, importante para a manutenção da estrutura terciária.¹¹

Para verificar a influência do pH na reação de bio-hidrogenação da (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona catalisada pelas leveduras *S. cerevisiae* em sistema bifásico, variou-se o pH da solução tampão de 3,5 a 12,0 a 35 °C. Os resultados estão apresentados na **Figura 39**.

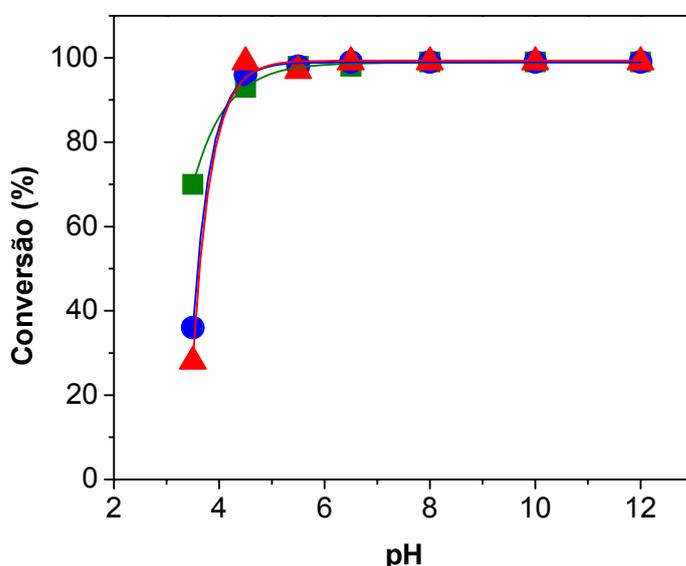


Figura 39- Efeito do pH da solução tampão na reação de bio-hidrogenação de **15a** catalisada por FP (—■—), CAT-1 (—●—) e PE-2 (—▲—). [Condições reacionais: conforme descrito na **Figura 35**, exceto a temperatura e o pH]

Observa-se uma dependência da conversão em produto em relação ao pH da solução tampão. Com o aumento do pH de 3,5 a 4,5, as conversões em **19a** aumentaram de 70-93%, de 36-96% e de 28-99% utilizando as leveduras **FP**, **CAT-1** e **PE-2**, respectivamente. Acima do pH 5,5, as conversões, foram máximas utilizando as três leveduras.

Resultados similares foram descritos por Lou e col. na redução assimétrica de acil silanos catalisada por uma levedura *S. cerevisiae* mutante irradiada por UV (UVSC II) imobilizada em alginato de sódio em sistema bifásico. Na faixa de pH estudada (5,5 a 9,0), as conversões em produto e os excessos enantioméricos foram de 83,6-95,3% e 92,8-95,8%, respectivamente.⁸⁹

Estes resultados, associados ao anterior, evidenciam a boa tolerância destas leveduras quanto a temperatura brandas e pHs neutros a básicos.

A partir destes resultados, o pH de 5,5 foi selecionado para os estudos posteriores.

4.3.7 Influência da concentração do substrato

Alguns relatos na literatura,^{93,94,95} têm demonstrado que a mudança na concentração do substrato no meio reacional afeta não só a velocidade de reação, mas também a estereosseletividade da redução catalisada por leveduras. Isso ocorre devido ao fato de existirem vários tipos de oxidoredutases com diferentes estereosseletividades e diferentes afinidades pelo substrato. Além disso, a inibição pelo substrato pode ocorrer em diferentes concentrações para as diversas enzimas presentes. Portanto, é de grande importância analisar este efeito.

Para avaliar o efeito da concentração do substrato na reação de bio-hidrogenação de **15a** catalisada por **FP**, **CAT-1** e **PE-2**, foram realizadas uma série de experimentos com diferentes concentrações do substrato, sendo de 8,3-83,3mM em sistema bifásico de *n*-hexano a pH 5,5 a 35 °C por 3 h. As conversões em produto em função da concentração do substrato estão apresentadas na **Figura 40**.

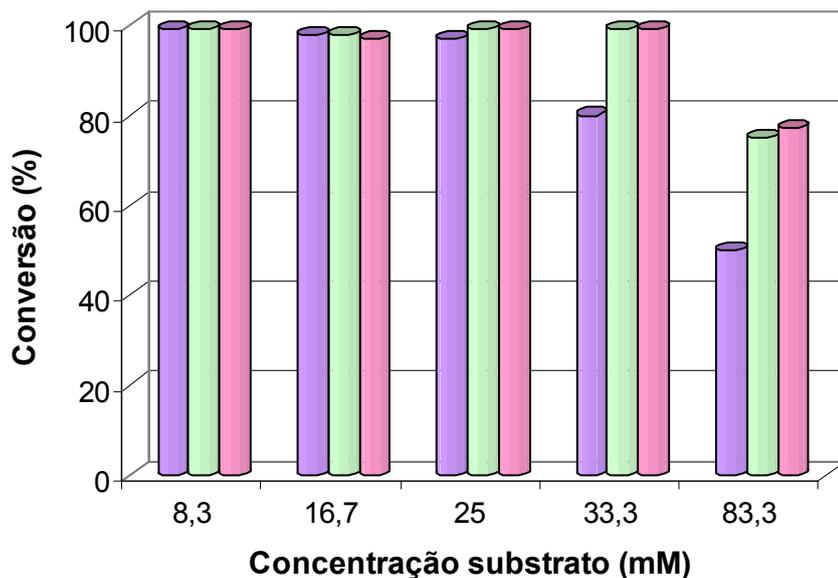


Figura 40- Efeito da concentração do substrato na reação de bio-hidrogenação de **15a** catalisada pelas leveduras **FP** (■) **CAT-1** (■) e **PE-2** (■) em sistema bifásico. [condições reacionais: 100,0 gL⁻¹ biocatalisador, 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de solução tampão K₂HPO₄/ácido cítrico (0,2 M/0,1 M pH 5,5), agitação magnética, 35 °C, 3 h, conversão determinada por CG-quiral]

Observa-se que as conversões em produtos mantiveram-se em torno de 99%, com aumento da concentração de substrato até 25 mM quando utilizou-se o **FP** como catalisador e 33,3 mM com a **CAT-1** e a **PE-2**. Com o aumento na concentração do substrato, ocorreu uma pequena diminuição nas conversões, principalmente nas bio-hidrogenações com **FP**, indicando que existe uma inibição da atividade das enzimas presentes nas leveduras *S. cerevisiae* pelo substrato. Portanto, a concentração do substrato de 16,7 mM continuou sendo utilizada nos experimentos posteriores.

Foi observado por Wang e col. um efeito similar na redução assimétrica da 4'-metoxiacetofenona catalisada por células de *Rhodotorula* sp. AS2.2241 imobilizada em alginato de sódio em meio aquoso (tampão Tris-HCl) e em sistema bifásico de líquido iônico/tampão.²⁸

4.3.8 Estudo da influência do solvente orgânico

Os critérios mais importantes para a seleção do solvente orgânico em reações catalisadas por enzimas e/ou células íntegras em sistema bifásico, são a alta capacidade de solubilizar tanto o produto e o substrato, bem como a biocompatibilidade. Entretanto outras características são desejáveis tais como estabilidade química e térmica, baixa tendência de formar emulsão com a água, não biodegradabilidade, baixa periculosidade no manuseio e preços baixos.⁴²

O parâmetro mais freqüentemente utilizado para classificar os solventes em termos de biocompatibilidade é o log P, que é definido como logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água. Segundo Laane e col. os solventes que possuem $\log P \leq 2$ são hidrofílicos, não sendo adequados para biocatálise porque alteram fortemente a interação água/biocatalisador, tornando-o inativo ou ocasionando a desnaturação. Os solventes com log P entre 2 e 4 são também hidrofílicos, mas perturbam menos a interação água/biocatalisador. Os solventes com log P acima de 4 são hidrofóbicos, não alteram estas interações e deixam o biocatalisador no seu estado ativo.⁹⁶

Para avaliar o efeito do solvente na reação de bio-hidrogenação de **15a** catalisada por FP em sistema bifásico, foram utilizados solventes com diferentes log P. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4- Efeito do solvente orgânico na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** mediada por **FP** em sistema bifásico. ^(a)

Solventes	Log P	Conversão (%) ^(b)
<i>n</i> -heptano	4,0	99
<i>n</i> -hexano	3,5	98
cicloexano	3,2	98
tetracloroeto de carbono	3,0	63
tolueno	2,5	57
clorofórmio	2,0	1
diclorometano	1,5	0

(a), 208,0 mg (1,0 mmol) substrato, 100,0 gL⁻¹ biocatalisador, 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de solução tampão K₂HPO₄/ácido cítrico (0,2 M/0,1 M pH 5,5), agitação magnética, 35 °C, 3 h (b) determinada por CG-Quiral.

Os resultados obtidos, em geral, corroboram com os de Laane e col. mostrando que a conversão a produto foi dependente do solvente orgânico.⁹⁶ Os solventes com log P acima de 2,50, ou seja, os menos polares foram os mais eficientes, formando o produto com conversões entre 57 e 99%. Usando solventes com log P menores que 2,50, ou seja, os mais polares, o produto praticamente não foi formado (conversões de 0-1%). A baixa conversão em **19a** com os solventes mais polares deve-se provavelmente ao fato destes retirarem a camada de água essencial ao redor da enzima, causando distorção na conformação nativa e, portanto, alterando a atividade catalítica do biocatalisador.^{11,42,57,}

Li e col. observaram a mesma influência do solvente orgânico na redução assimétrica da 2-octanona mediada por fermento de pão **FD-12** em sistema bifásico. Eles obtiveram conversões de 22,7-11,5% com os solventes com log P ≥ 4 e de 6,9-0,4% com os solventes de log P < 4 .⁹⁷

Os estudos subsequentes foram realizados com *n*-hexano, considerando os dados obtidos neste estudo e em outros reportados na literatura.

4.3.9 Influência da variação da fase aquosa e da fase orgânica (V_{aq}/V_{org})

Nas biotransformações em sistema bifásico a variação das fases aquosa e orgânica influencia a área interfacial, que por sua vez afeta a velocidade de biotransformação. A fim de avaliar este efeito, realizaram-se as reações de bio-hidrogenação da chalcona **15a** utilizando diferentes volumes das fases aquosa e orgânica, mantendo-se o volume total da reação de 60 mL (**Figura 41**).

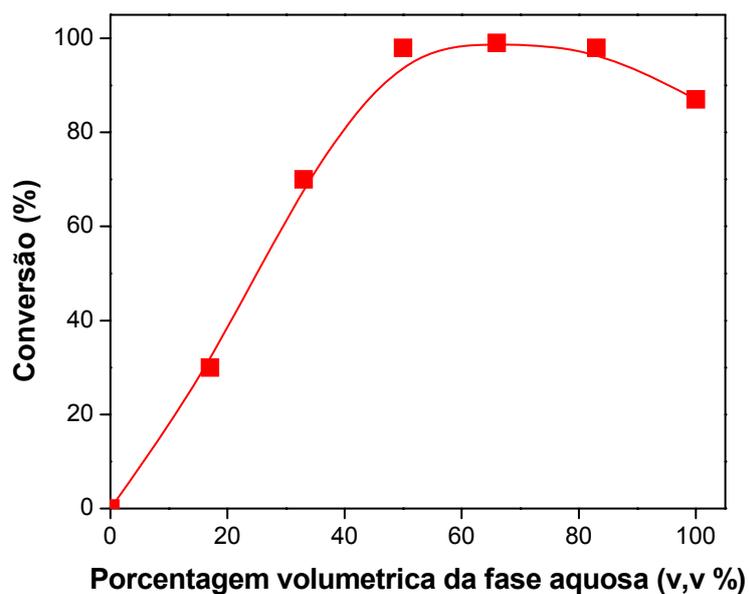


Figura 41- Efeito da variação das fases aquosa e orgânica na reação de bio-hidrogenação de **15a** mediada por **FP** em sistema bifásico. [Condições reacionais: conforme descrito na **Figura 40**, exceto o volume das fases aquosa e orgânica]

Observa-se que a variação do volume das fases aquosa e orgânica influencia significativamente a conversão em produto. As maiores conversões em **19a** (>99%) foram obtidas quando utilizou-se V_{aq}/V_{org} de 50,0/50,0; 66,7/33,3 e 83,3/16,7 v/v.

A partir destes resultados postula-se que, conforme esperado, ao aumentar o volume de água diminui a probabilidade das células de entrarem em contato com o solvente orgânico e assim diminui os danos causados pelo solvente. Porém, ao utilizar somente água a conversão em produto diminuiu um pouco, e isto pode ter sido ocasionado pela diminuição da solubilização do substrato neste meio.

Estes resultados são concordantes com os anteriores apresentados, que mostram que na ausência de água, as enzimas presentes no **FP** perdem a atividade catalítica (ver item **4.3.2**).

Bie e col. obtiveram resultados similares na dehidrogenação de metiltestosterona catalisada por *Arthrobacter simplex* AS1.94 em sistema bifásico para produzir metandienona que é um importante esteróide anabólico. A maior bioconversão (~90%) foi obtida com a razão volumétrica de $3_{org}:7_{aq}$.⁹⁸

Considerado estes resultados, a V_{aq}/V_{org} de 50,0/50,0 o que corresponde a 30 mL da fase aquosa e 30 mL da fase orgânica, foi utilizado no próximo estudo, que se refere a influência dos substituintes nos anéis aromáticos A e B das chalconas **15a-i**.

4.3.10 Influência do grupo substituinte dos anéis aromáticos A e B das chalconas 15a-i na biotransformação mediada por leveduras *S. cerevisiae*

Para realizar o estudo da influência dos substituintes dos anéis A e B das chalconas, foi feito um estudo prévio da quantidade de diclorometano adicionada no meio reacional, que foi necessário para aumentar a solubilidade de alguns substratos.

Primeiramente, avaliou-se a solubilidade das chalconas **15b-i** em *n*-hexano e diclorometano. As chalconas testadas apresentaram solubilidade moderada em *n*-hexano e alta em diclorometano. Como o diclorometano não foi um solvente eficiente na reação de bio-hidrogenação de **15a** (vide **Tabela 4**) e o *n*-hexano foi um dos melhores, optou-se por realizar a reação destas chalconas em *n*-hexano e diclorometano como co-solvente.

A fim de verificar a influência da adição de pequenos volumes de diclorometano (1, 3 e 5 mL) nas conversões a produto, realizou-se a reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** catalisada por **FP** em sistema bifásico (**Figura 42**).

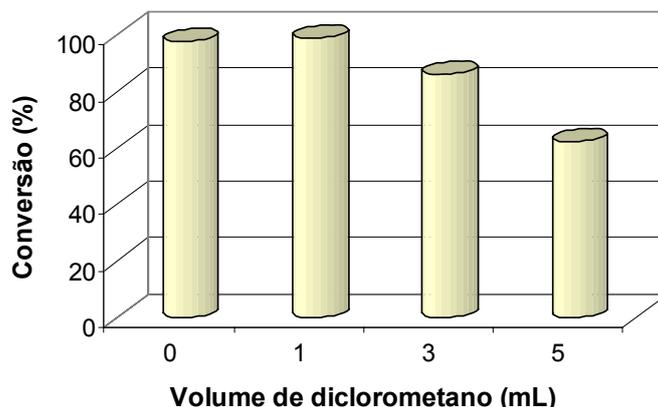


Figura 42- Influência da quantidade de diclorometano adicionada na reação de bio-hidrogenação de **15a** mediada por **FP** em sistema bifásico. [Condições reacionais: conforme descrito na **Figura 40**, exceto pelo volume de CH_2Cl_2]

As conversões em **19a** foram dependentes da quantidade de diclorometano adicionada ao meio reacional. Com a adição de 1 mL não houve variação na conversão em produto comparando com a reação realizada sem adição deste solvente. Com a adição de 3 e 5 mL, ocorreu uma diminuição significativa nas conversões em **19a**, sendo de 86 e 62% respectivamente. Portanto nos estudos do efeito dos substituintes, utilizou-se 1 mL de diclorometano.

As conversões em produto foram máximas, após 3 h de reação, e como o objetivo deste estudo foi de avaliar o efeito causado pelos substituintes doadores e retiradores de elétrons dos anéis aromáticos das chalconas substituídas, foi necessário realizar estes experimentos em um tempo menor, sendo este de 1 h.

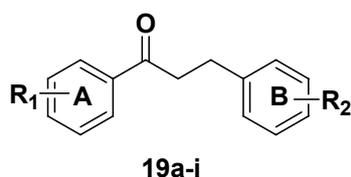
Está bem documentado na literatura que a adição de hidreto nas reações dos compostos carbonílicos α,β -insaturados catalisadas por leveduras, ocorre no carbono beta a carbonila.³³ Isto pode ser explicado devido ao fato deste carbono apresentar um alto caráter eletrofílico.⁶⁴

Visando verificar a influência de grupos retiradores e doadores de elétrons dos anéis aromáticos **A** e **B** na reatividade do carbono beta a carbonila, frente a adição de hidreto realizaram-se as reações de bio-hidrogenação das chalconas **15a-i** medidas pelas leveduras *S. cerevisiae*.

Na **Tabela 5**, estão apresentados as conversões em produto da

biotransformação das chalconas **15a-i** mediadas pelas leveduras **FP**, **CAT-1** e **PE-2**, em sistema bifásico (pH 5,5), a 35 °C, por 1 h.

Tabela 5- Bio-hidrogenação das chalconas **15a-i** mediada por leveduras *S. cerevisiae* em sistema bifásico^(a).



deidrochalcona	R ₁	R ₂	Conversão (%) ^(b)		
			FP	CAT-1	PE-2
19a	H	H	79	92	96
19b	H	4-OCH ₃	97	97	94
19c	H	3,4- <i>di</i> -O CH ₃	16	2	8
19d	H	3,4-(OCH ₂ O)	64	49	47
19e	H	4-NO ₂	94	74	63
19f	4-OCH ₃	H	49	56	50
19g	3,4- <i>di</i> -OCH ₃	H	57	30	40
19h	3,4-(OCH ₂ O)	H	74	91	91
19i	4-NO ₂	H	62	45	47

(a) 208,0 mg (1,0 mmol) substrato, 100,0 gL⁻¹ biocatalisador, 30 mL de *n*-hexano, 1 mL de diclorometano, 30 mL de solução tampão K₂HPO₄/ácido cítrico (0,2 M/0,1 M, pH 5,5), agitação magnética, 35 °C, 1 h, (b) determinada por CG-quiral

Devido a conjugação apresentada, espera-se que grupos retiradores no anel aromático **B** deixem o carbono beta a carbonila mais reativo, e que os doadores de elétrons menos reativo frente a adição de hidreto. É esperado que grupos retiradores e doadores de elétrons do anel aromático **A** não interfiram muito na reatividade do carbono beta a carbonila.

Pode-se observar na **Tabela 5** que na reação de bio-hidrogenação das chalconas com substituintes doadores e retiradores de elétrons no anel **A**, as conversões em produto foram menores quando comparadas com as obtidas na reação da chalcona sem substituinte, exceto com a **15h** que apresentou

conversões em produto similares as obtidas com **15a**.

Nas reações de bio-hidrogenação das chalconas com substituintes doadores e retiradores de elétrons no anel **B**, as conversões em produto foram maiores com a **15b** (substituinte doador na posição *para*) e **15e** (substituinte retirador na posição *para*), quando comparadas com as obtidas para a **15a**. Para as chalconas com dois grupos doadores de elétrons (**15c** e **15d**), as conversões em produto foram menores.

É importante e ressaltar que no intervalo de tempo analisado, somente houve a hidrogenação da ligação dupla carbono-carbono para todas as chalconas.

A partir destes resultados, pode-se concluir que os efeitos eletrônicos dos grupos substituintes dos anéis aromáticos **A** e **B** são, em geral, pequenos e não se correlacionam. Ohta e col. também observaram pouca influência dos efeitos eletrônicos na biotransformação das chalconas substituídas por grupos doadores ou retiradores de elétrons nos anéis **A** e **B**, mediada por *Corynebacterium equi* IFO 3730.⁹⁹

A seguir a levedura *C. glabrata* foi utilizada como biocatalisador nas reações de bio-hidrogenação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona, onde foram avaliados diversos parâmetros tais como a influência da concentração da levedura, temperatura, pH e sistema biocatalítico.

4.4. Biotransformação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (15a) mediada pela levedura *C. glabrata*.

4.4.1 Curvas de crescimento em diversas fontes de carbono

Inicialmente, foram determinadas as curvas de crescimento da levedura *Candida glabrata* nos diferentes meios de cultivo, a fim de estabelecer o tempo apropriado para a coleta das células. Para garantir uma alta atividade enzimática, o biocatalisador foi coletado ao final da fase logarítmica de crescimento, sem que a fonte de carbono fosse esgotada, garantindo assim o metabolismo fermentativo para as células cultivadas em glicose, e respiratório (ou oxidativo) para as cultivadas em lactato ou em glicerol-etanol.

As curvas de crescimento da levedura *C. glabrata* utilizando as diferentes fontes de carbono estão apresentadas na **Figura 43**. As medidas de absorbância obtidas ao longo do tempo foram determinadas e tratadas conforme descrito na parte experimental, item 3.3, pg 22-23.

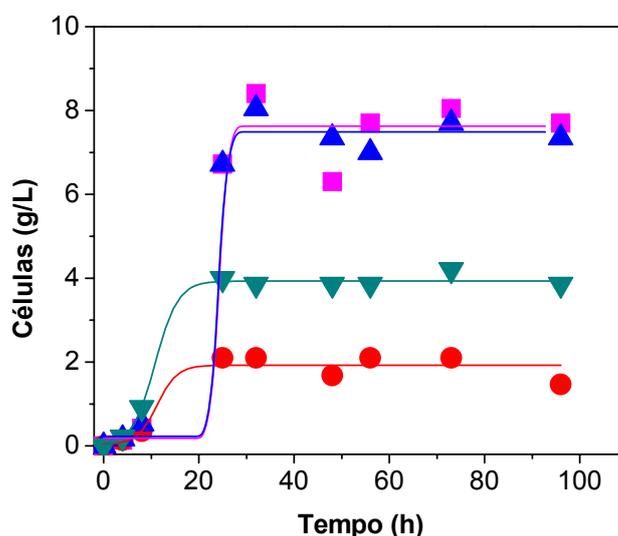


Figura 43- Variação da concentração das células em função do tempo para o crescimento da levedura *C. glabrata* em (—■—) glicerol/EtOH, (—●—) lactato, (—▲—) glicerol e (—▼—) glicose. [30 °C, 160 rpm]

Os resultados mostram que, para as células cultivadas em glicerol e glicerol/EtOH, a fase exponencial de crescimento encerra em torno de 30 h de cultivo, atingindo em média 7 gL^{-1} de biomassa. As células cultivadas em lactato e glicose, atingiram o final da fase logarítmica após 20 h de crescimento, atingindo em média 4 e 2 gL^{-1} de biomassa respectivamente.

Albuquerque e col., observaram no crescimento da levedura de *S. cerevisiae* W303-1A, que as células cultivadas em glicose apresentaram maior biomassa no final da fase exponencial, atingindo em média 5 gL^{-1} , comparadas com as células crescida em lactato e glicerol/EtOH ($\sim 4 \text{ gL}^{-1}$).¹⁰⁰

Portanto, para cada microorganismo deve-se avaliar a fonte de carbono mais adequada. Estes resultados mostram a diversidade metabólica das diferentes espécies de levedura, enfatizando a necessidade e importância da pesquisa nesta área.

A partir destes resultados, utilizou-se levedura *C. glabrata* crescida em glicerol, onde se obteve uma maior concentração de biocatalisador. É importante salientar que não foram realizados processos de liofilização quando utilizou-se a levedura *C. glabrata* nas reações de bio-hidrogenação de **15a**, sendo que esta sempre foi utilizada na forma de células vivas, e não na forma de levedura seca.

4.4.2 Influência da concentração de *C. glabrata* na bio-hidrogenação de **15a**.

A influência da concentração da levedura *C. glabrata* foi verificada na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** em sistema bifásico a 25 °C. As concentrações utilizadas foram de 4,2 a 33,3 gL⁻¹ de células úmidas. Na **Figura 44**, estão apresentadas as conversões em produto em função do tempo de reação.

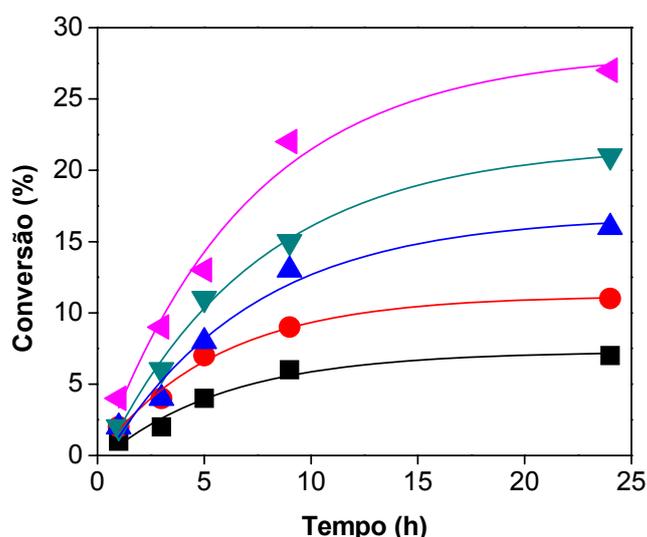


Figura 44- Efeito da concentração do biocatalisador 4,2 gL⁻¹ (—■—), 8,3 gL⁻¹ (—●—), 12,5 gL⁻¹ (—▲—), 16,7 gL⁻¹ (—▼—) e 33,3 gL⁻¹ (—◆—) na reação de bio-hidrogenação de **15a**. [Condições reacionais 208,0 mg (1,0 mmol) substrato, 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de solução tampão K₂HPO₄/ácido cítrico (0,2 M/0,1 M pH 4,5), agitação magnética, 25 °C, conversão determinada por CG-quiral]

No intervalo de tempo estudado, as conversões em **19a** aumentaram com o aumento da concentração da levedura. As maiores foram (21 e 27%) com 16,7 e 33,3 gL⁻¹ células de *C. glabrata* em 24 h, respectivamente. Quando as reações

foram realizadas com concentrações de 4,2, 8,3 e 12,5 gL⁻¹, as conversões em produto foram de 7, 11 e 16%, respectivamente. Portanto, nos estudos subsequentes utilizou-se 16,7 gL⁻¹ de células úmidas visando a utilização de menores quantidades de biocatalisador.

Embora as conversões não tenham sido muito altas, estes resultados podem ser considerados satisfatórios, sendo que são os primeiros dados reportados para o uso desta levedura sem adição de cofatores em reações de bio-hidrogenação de compostos carbonílicos α,β -insaturados em sistema bifásico.

4.4.3 Influência da temperatura

A fim de verificar a temperatura ótima da reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** em sistema bifásico catalisada pela levedura *C. glabrata*, as reações foram realizadas em diferentes temperaturas, sendo de 20, 25, 30, 35 e 50 °C. A **Figura 45**, mostra as conversões em produto em função da temperatura de reação.

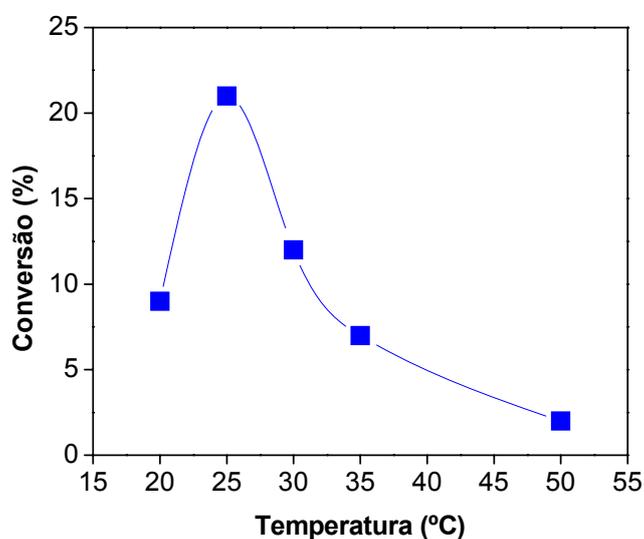


Figura 45- Efeito da temperatura na reação de bio-hidrogenação de **15a** mediada pela levedura *C. glabrata* em sistema bifásico. [Condições reacionais: conforme descrito na **Figura 44**, exceto a temperatura]

Observa-se que a maior conversão em produto foi de 21% à 25 °C. Em temperaturas abaixo e acima de 25 °C as conversões em **19a** foram menores que

12%. Este resultado foi um tanto inesperado, uma vez que *C. glabrata* é considerada uma levedura termofílica capaz de crescer normalmente a 42 °C, característica esta que contribui para a patogenicidade desta espécie de levedura.^{40,41}

A partir destes resultados a temperatura de 25 °C foi utilizada nos estudos da influência do pH e do sistema biocatalítico.

4.4.4 Influência do pH do tampão

O efeito do pH foi estudado na reação de bio-hidrogenação de **15a** catalisada pela levedura *C. glabrata* em sistema bifásico a 25 °C. Os pHs das soluções tampões utilizados foram, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5 e 8,0, e as conversões em produto em função do pH estão apresentadas na **Figura 46**.

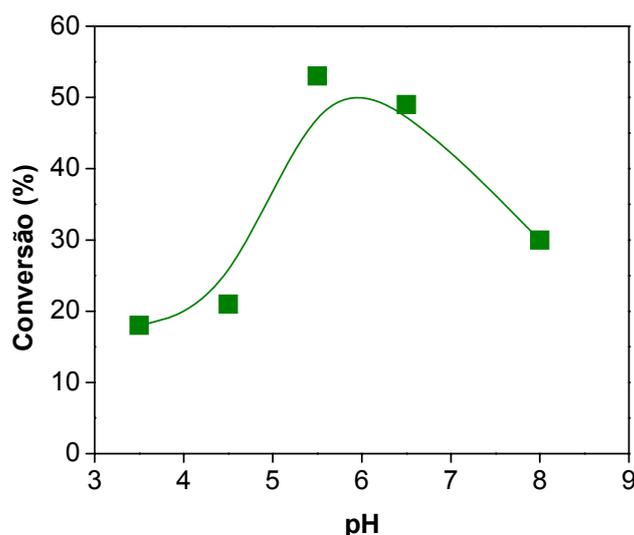


Figura 46- Efeito do pH da solução tampão na reação de bio-hidrogenação de **15a** catalisada por *C. glabrata*. [condições reacionais: conforme descrito na **Figura 44**, exceto temperatura e pH]

Os dados mostram a dependência da conversão em produto em relação ao pH da solução tampão. Com o aumento do pH de 3,5 a 5,5, as conversões em **19a** aumentaram de 18-53%. Acima do pH de 5,5, houve uma diminuição das conversões em produto, sendo de 53-30%. Assim, pode-se afirmar que o pH ótimo da reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** mediada pela levedura *C.*

glabrata é de 5,5.

A partir dos resultados obtidos com relação a temperatura e pH, pode-se afirmar que esta levedura é mais sensível frente a estas condições quando comparada com as leveduras *S. cerevisiae* (**FP**, **CAT-1** e **PE-2**) para esta reação (vide resultados acima).

4.4.5 Influência do sistema biocatalítico

O efeito do sistema biocatalítico foi avaliado na reação de bio-hidrogenação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada pela levedura *C. glabrata*. Na **Figura 47**, estão apresentadas as conversões em produto em função do sistema biocatalítico.

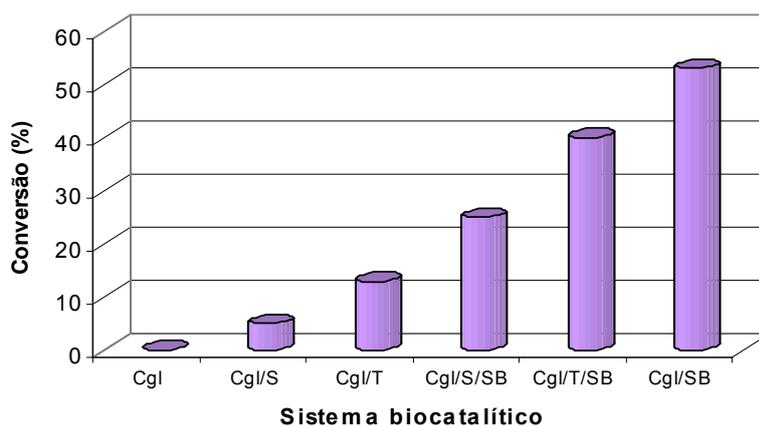


Figura 47- Efeito do sistema biocatalítico na reação de bio-hidrogenação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada pela levedura *Candida glabrata*. [208.0 mg (1.0 mmol) substrato, 16,7 gL⁻¹ de biocatalisador, 30 mL de *n*-hexano, 2,5 mL trealose, 2,5 mL sacarose, 30 mL de solução tampão ácido cítrico/K₂HPO₄ (0,1 M/0,2 M, pH 5,5), 25 °C, 24 h, agitação magnética, conversão determinada por CG-Quiral]

Analisando estes resultados verifica-se que a maior conversão em produto foi obtida com o sistema **Cgl/SB**, sendo de 53%. Com os sistemas **Cgl/S/SB** e **Cgl/T/SB** as conversões em produto foram moderadas, sendo de 25 e 40%, respectivamente. Ao utilizar os sistemas **Cgl/T**, **Cgl/S** e **Cgl** na forma livre e/ou na

presença de açúcares, as conversões em **19a** foram menores que 13%. Estes resultados são similares aos obtidos na bio-hidrogenação da chalcona **15a** mediada pelas leveduras *S. cerevisiae*, mostrando o papel indispensável da água nas nestas reações, embora os resultados diferem quando foram adicionados açúcares nas reações em sistema bifásico (foram obtidas conversões menores, enquanto que para *S. cerevisiae* os açúcares melhoram a eficiência catalítica, vide **Figura 34**).

4.5 Comparação do desempenho das leveduras *S. cerevisiae* e *C. glabrata* na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a**

Com o objetivo de comparar a eficiência das leveduras *S. cerevisiae* e *C. glabrata* na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** em sistema bifásico foi necessário diminuir a massa de **FP**, **CAT-1** e **PE-2** utilizada nas reações, devido ao fato destas leveduras serem utilizadas na forma liofilizada (seca) e a levedura *C. glabrata* na forma úmida (células vivas). Neste sentido foi considerado que o peso seco desta levedura corresponde a 1/3 do peso úmido das células.⁸¹

A **Figura 48** mostra os valores de conversão obtidas em função do tipo de levedura utilizada na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a**, em sistema bifásico.

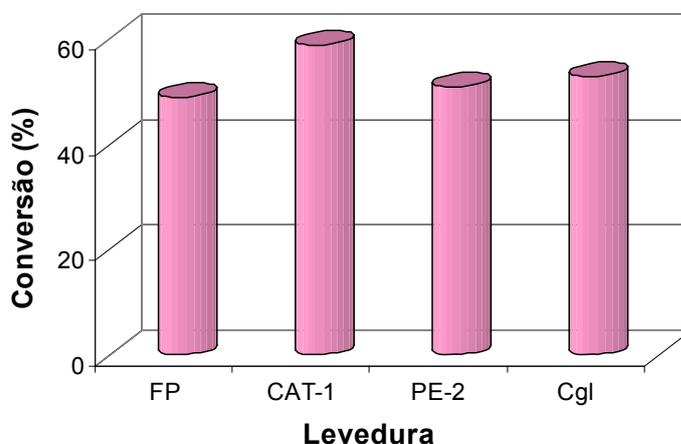


Figura 48- Desempenho das leveduras *S. cerevisiae* e *C. glabrata* na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** em sistema bifásico. [208,0 mg (1,0 mmol) substrato, 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de solução tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (0,2 M /0,1 M pH 5,5), agitação magnética, 24 h, *S. cerevisiae* (5,5 gL⁻¹, 35 °C), *C. glabrata* (16,7 gL⁻¹, 25 °C), conversão determinada por CG-Quiral]

Comparando os resultados, fica evidente que a levedura *C. glabrata*, apresenta praticamente a mesma eficiência quando comparada com as leveduras *S. cerevisiae*. As conversões em produto foram de 49, 59, 51 e 53% com as leveduras **FP**, **CAT-1**, **PE-2** e **Cgl**, respectivamente.

De modo geral a levedura *C. glabrata* apresentou um grande potencial para ser utilizada como biocatalisador em síntese orgânica, sendo comparável as leveduras *S. cerevisiae* (embora diferenças no pH ótimo e temperatura ótima são evidentes), que já vem sendo amplamente utilizadas em biotransformações microbianas.^{17,21,29}

Dando continuidade a este trabalho, realizou-se a biotransformação de outro substrato carbonílico α,β -insaturado mediado por **FP**, e os resultados obtidos são apresentados a seguir.

4.6 Biotransformação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por FP

A biotransformação da (1*E*,4*E*)-1,5 difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por FP pode resultar na redução completa do sistema carbonílico α,β -insaturado (**21**), redução exclusiva da carbonila formando o álcool alílico correspondente (**18**), e ainda a hidrogenação exclusiva de uma ligação dupla (**22**) ou das duas ligações duplas (**23**), conforme mostrado na **Figura 49**.^{11,64}

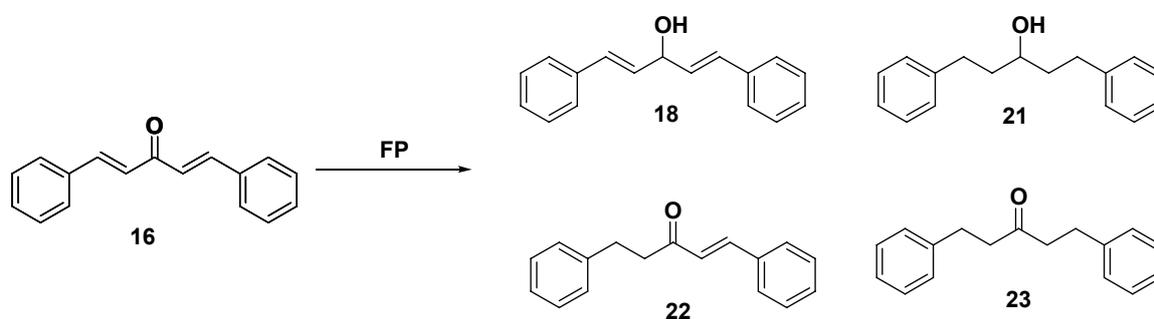


Figura 49- Prováveis produtos da biotransformação da (1*E*,4*E*)-1,5 difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por FP.

Para verificar qual foi o produto formado na biotransformação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por FP comercial, foram retiradas alíquotas periodicamente da reação, e a formação dos produtos analisada por CG-quiral, CG-EM e RMN-¹H.

A **Figura 50**, mostra o cromatograma de CG-quiral de uma alíquota da reação de bio-hidrogenação de **16** mediada por FP com adição de 2,5 mL de solução de trealose 10%, temperatura ambiente, agitação magnética, 24 h.

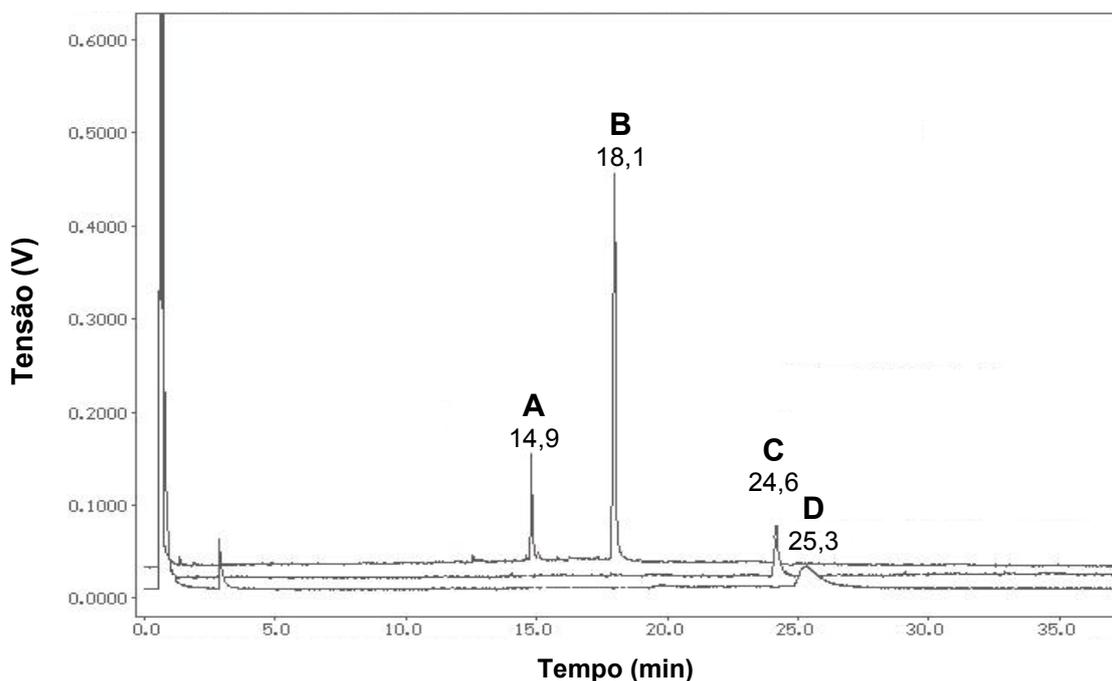


Figura 50- Sobreposição dos cromatogramas da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (pico **C**), do 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ol (pico **D**) e dos produtos da reação biocatalisada por **FP** (picos **A** e **B**) em CH₃CN, c = 30 e 69%. [Parâmetros operacionais: conforme descrito na **Tabela 1**].

Observa-se pela sobreposição dos cromatogramas da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (pico **C**), do 1,5-difenil-1,4-pentadien-1-ol (pico **D**) e dos produtos da reação biocatalisada (picos **A** e **B**) que foram obtidos dois compostos com t_R de 14,9 (30%) e 18,1 min (69%), e que estes não se referem ao álcool racêmico cujo t_R é de 25,3 min.

A **Figura 51**, apresenta o espectro de RMN-¹H de uma alíquota da reação de bio-hidrogenação de **16**.

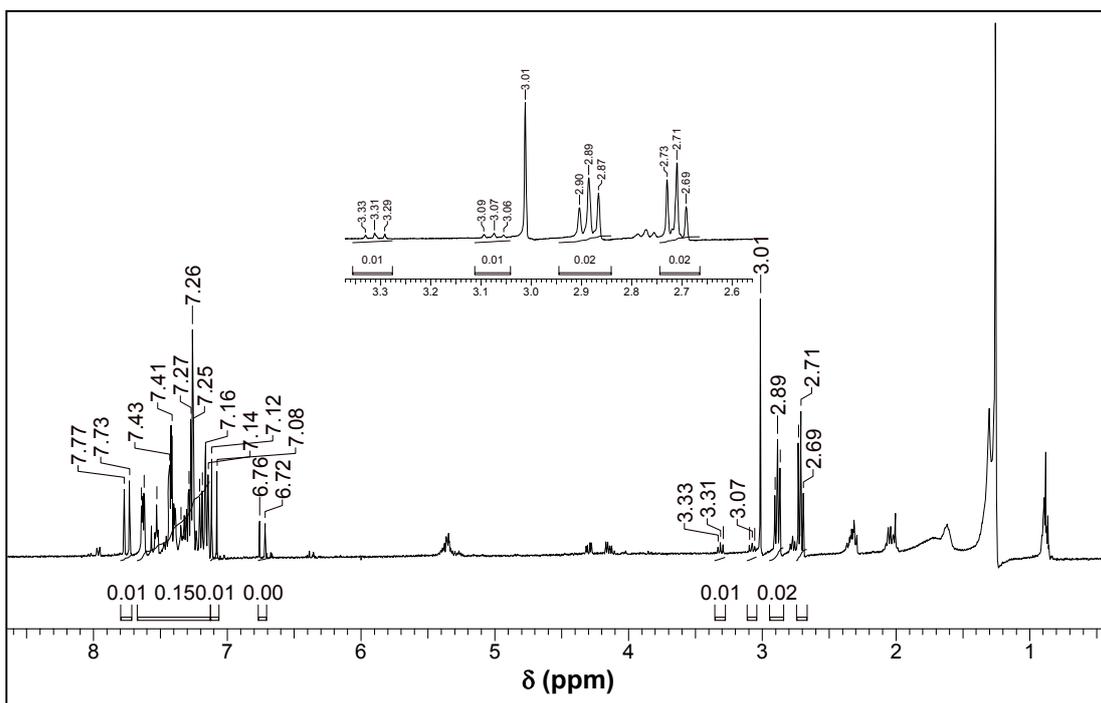


Figura 51- Espectro de RMN-¹H de uma alíquota da reação de bio-hidrogenação de **16** mediada por **FP** em sistema bifásico. [CDCl₃, 400 MHz]

Pela análise do espectro de RMN-¹H, pode-se observar a presença de quatro tripletes centrado em 2,71, 2,89, 3,07 e 3,31 ppm, um dubete em 6,74 ppm ($J = 16,0$ Hz), um dubete em 7,10 ppm ($J = 16,0$ Hz), um multiplete em 7,12 a 7,63 ppm, e um dubete em 7,74 ppm ($J = 16,0$ Hz). Esses resultados também indicam a formação de dois produtos, devido ao aparecimento dos tripletes que são característicos do produto hidrogenado na ligação dupla carbono-carbono.

Para caracterizar os produtos obtidos na biotransformação de **16** mediada por **FP** foi necessário realizar análises de CG-EM. O cromatograma e os espectros de massas estão apresentados na **Figura 52**.

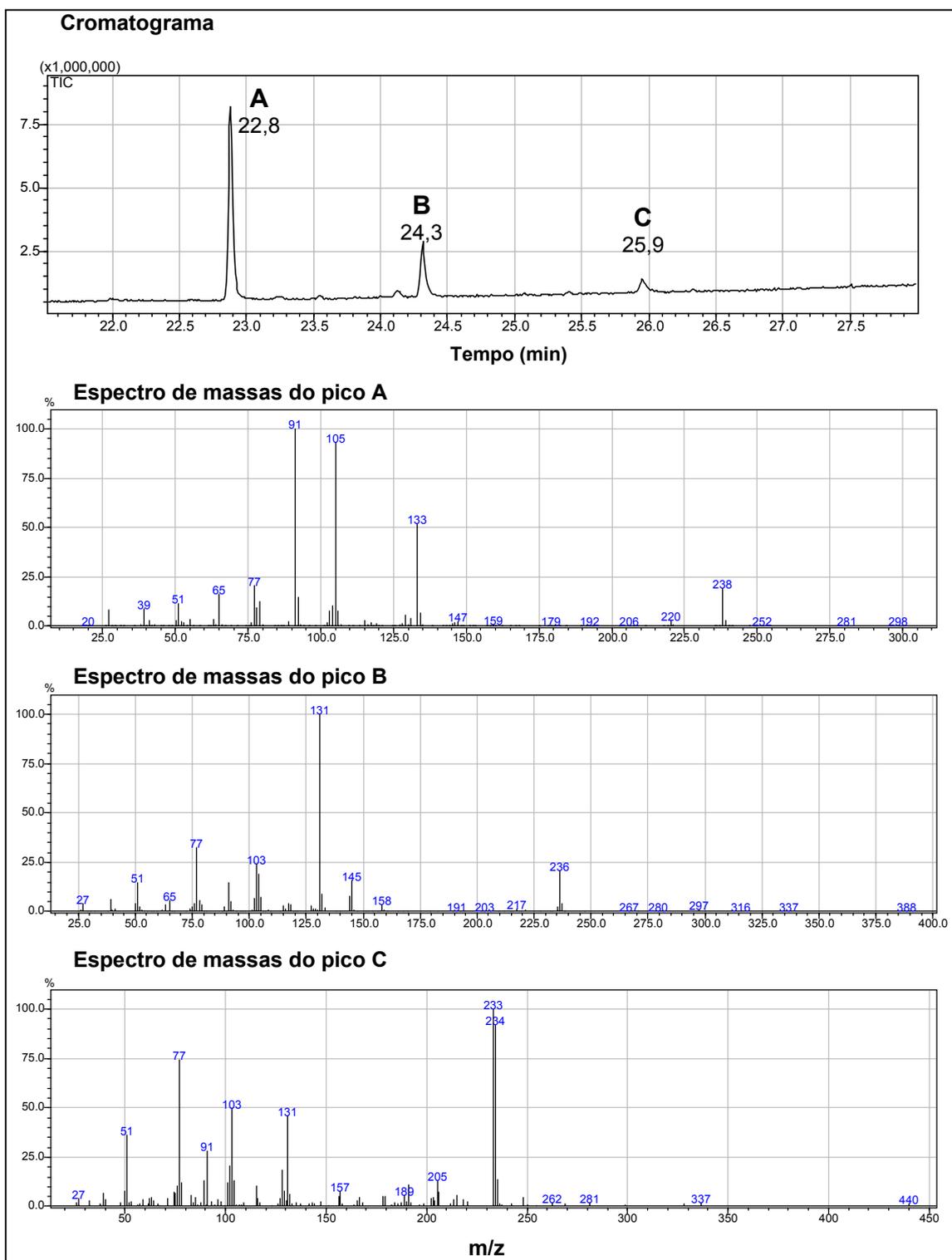


Figura 52- Cromatograma e espectros de massas da uma alíquota da reação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por FP em sistema bifásico, 25 °C, 24 h. [Parâmetros operacionais: conforme descrito na Tabela 1]

Pela análise do espectro de massas do pico **A**, observa-se a presença do íon molecular em m/z 238 e os principais fragmentos em 133, 105, 91 e 77. O espectro de massas do pico **B** apresenta o íon molecular em m/z 236 e os sinais em 131, 103, 91 e 77 como fragmentos principais.

Estes resultados aliados aos obtidos por RMN- ^1H indicam que os produtos formados na biotransformação de **16** mediada por **FP** são as cetonas 1,5-difenil-3-pentanona (**23**) e a (1*E*)-1,5-difenil-1-penten-3-ona (**22**).

Na **Figuras 53**, estão apresentadas as propostas dos fragmentos para os principais sinais obtidos no espectro de massas da 1,5-difenil-3-pentanona e da (1*E*)-1,5-difenil-1-penten-3-ona.

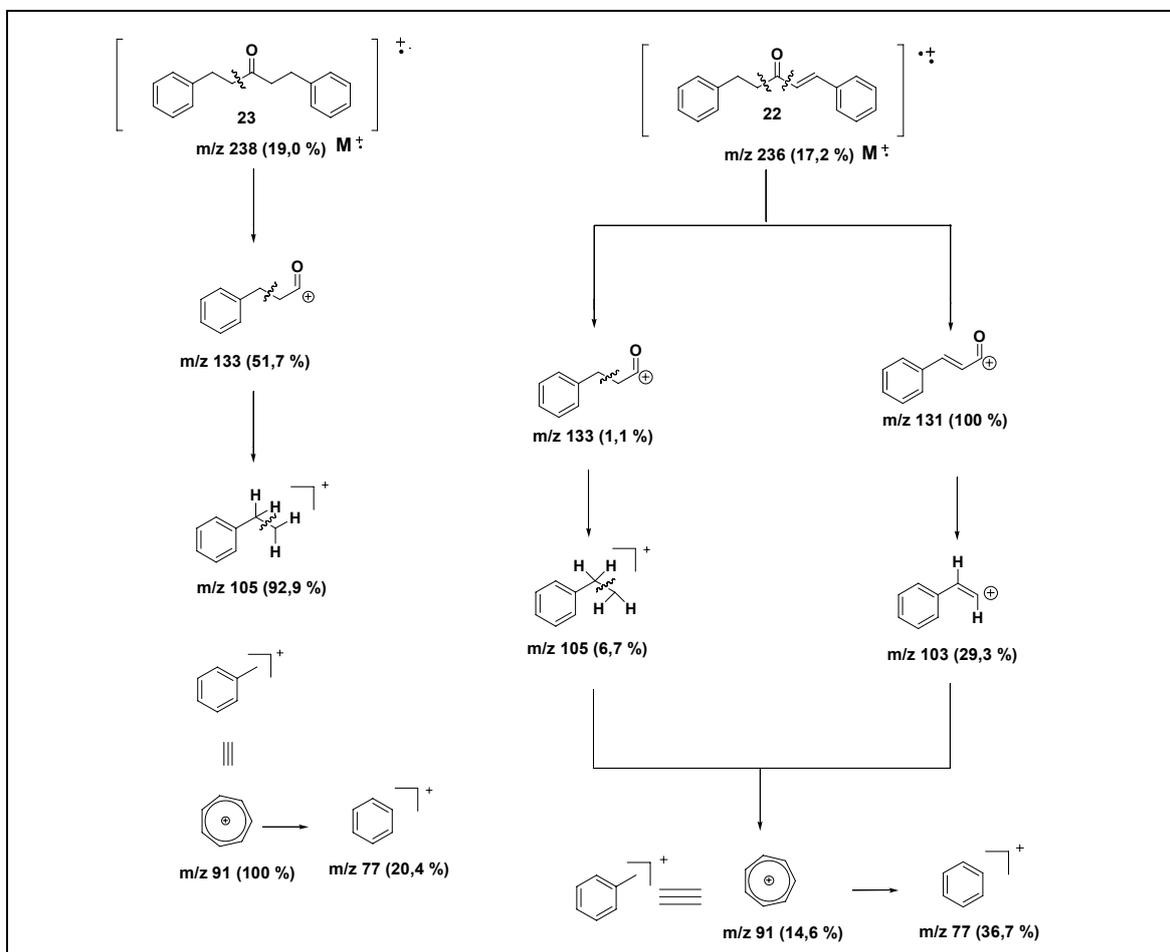


Figura 53- Propostas dos fragmentos para os principais sinais obtidos no espectro de massas da 1,5-difenil-3-pentanona (**23**) e da (1*E*)-1,5-difenil-1-penten-3-ona (**22**).

A fim de verificar o efeito do sistema biocatalítico na reação de bio-hidrogenação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona, as reações foram realizadas em sistema bifásico, com adição de sacarose e trealose. As conversões em produtos em função do tempo estão apresentadas na **Figura 54**.

Observa-se, que o produto majoritário formado na bio-hidrogenação de **16** foi dependente do sistema biocatalítico utilizado. Quando realizou-se a reação em sistema bifásico (**Figura 53A**), o produto majoritário formado inicialmente é a 1,5-difenil-1-penten-3-ona (**22**), que é prontamente transformada na 1,5-difenil-3-pentanona (**23**), sendo que após 24 h o composto **23** foi obtido com conversões maiores que 90%. Estes resultados indicam que na bio-hidrogenação de (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (**16**) ocorre inicialmente uma hidrogenação em uma das ligações dupla (produzindo **22**), seguido da hidrogenação da segunda ligação dupla (produzindo **23**).

Já ao utilizar os sistemas **FP/T** e **FP/S**, o produto **22** foi obtido em maior quantidade, com conversões de 26-69% e 31-73% no intervalo de tempo analisado (3-168 h), respectivamente. Embora o produto **23** foi obtido com conversões de 3-38% e 2-22% ao utilizar os sistemas **FP/T** e **FP/S**, respectivamente (**Figura 54B e 54C**), aparentemente quando foram adicionados açúcares ao sistema biocatalítico o composto **22** não foi quantitativamente transformado na 1,5-difenil-3-pentanona.

A partir destes resultados pode-se concluir que o sistema bifásico foi o método de imobilização e/ou proteção celular mais eficiente nas reações nas reações de bio-hidrogenação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por **FP** quando se deseja a obtenção da 1,5-difenil-3-pentanona (**23**), enquanto que maiores conversões a (1*E*)-1,5-difenil-1-penten-3-ona (**22**) são obtidas com a presença de sacarose.

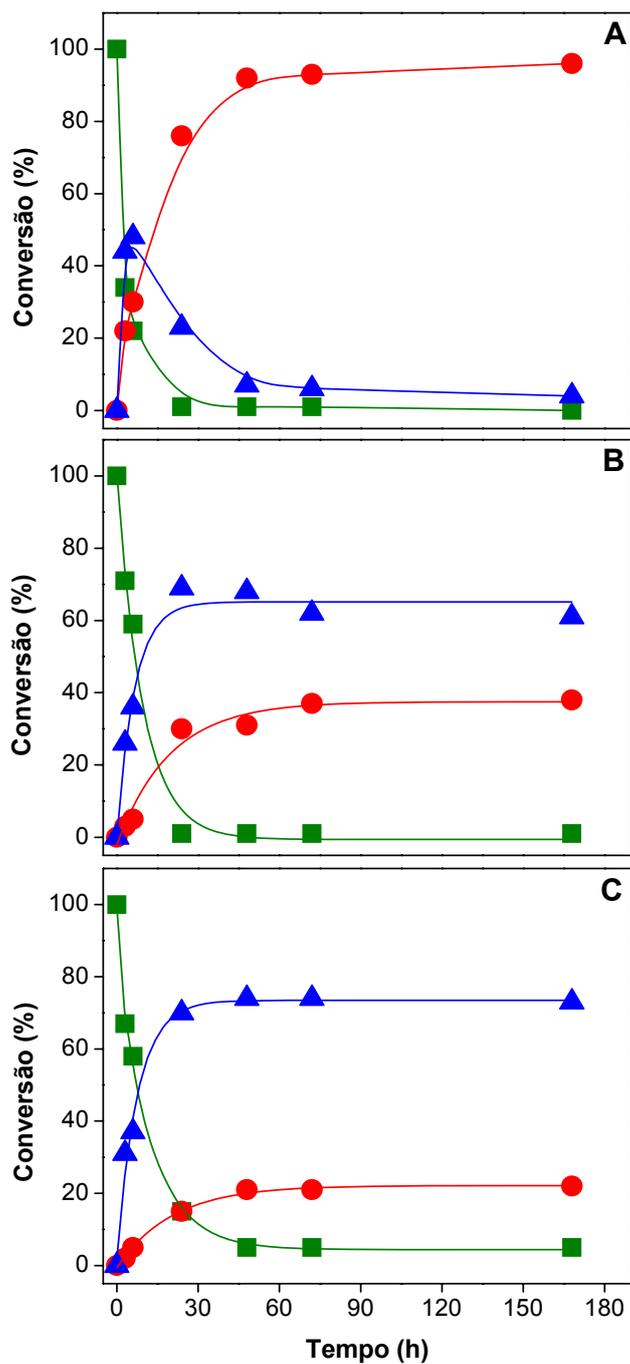


Figura 54- Efeito do sistema biocatalítico na reação de bio-hidrogenação de **16** mediada por FP, em sistema bifásico (**A**), com adição de trealose (**B**) e com adição de sacarose (**C**), produto **22** (—▲—), produto **23** (—●—) e substrato (—■—). [condições reacionais: 234,0 mg (1,0 mmol) substrato, 6 g FP, 30 mL de *n*-hexano, 2,5 mL Trealose (10%), 2,5 mL Sacarose (10%), 30 mL de solução tampão K₂HPO₄/ácido cítrico (0,2 M/0,1 M, pH 4,5), 25 °C, agitação magnética, conversão determinada por CG-Quiral]

5. CONCLUSÕES

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

- Todos os compostos carbonílicos α,β -insaturados (**15a-i** e **16**) foram obtidos com bons rendimentos, variando de 50-94%;
- Os álcoois racêmicos (**17a-i** e **18**) foram obtidos com rendimentos de 65-88%, e apresentaram rotação ótica ($[\alpha]_D$) igual a zero;
- O único produto formado na biotransformação das chalconas **15a-i** mediadas por leveduras, foram os produtos da hidrogenação da ligação dupla carbono-carbono, denominadas de dehidrochalconas **19a-i**;
- O sistema bifásico foi o método de imobilização e/ou proteção celular mais eficiente na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** e dos outros compostos carbonílicos, mediada por **FP**;
- As maiores conversões em **19a** foram obtidas com 100 gL⁻¹ das leveduras *S. cerevisiae* (**FP**, **CAT-1** e **PE-2**), sendo > 90% após 24 h;
- A agitação magnética foi a mais adequada para realizar as reações;
- As maiores conversões em **19a** foram obtidas a 30-45 °C e 35-45 °C para as leveduras **CAT-1** e **PE-2** e para o **FP**, respectivamente;
- Em pHs acima de 5,5, as conversões em **19a** foram quantitativas, utilizando as três leveduras;
- Com 83,3 gL⁻¹ de substrato ocorreu uma pequena inibição das enzimas presentes nos microorganismos;
- As maiores conversões em **19a** foram obtidas em *n*-heptano (log P 4,0), *n*-hexano (log P 3,5) e cicloexano (log P 3,2), sendo de 99, 98 e 98%, respectivamente;
- O volume da fase aquosa foi importante para manter a atividade catalítica das enzimas presentes nos microorganismos;
- Os efeitos eletrônicos dos grupos substituintes dos anéis A e B das chalconas **15a-i** são, em geral, pequenos e não houve uma correlação dos grupos doadores e retiradores de elétrons;

- Em todos os estudos realizados, as leveduras **CAT-1** e **PE-2** apresentaram a mesma eficiência quando comparadas com o **FP**;
- O melhor meio de crescimento da levedura *C. glabrata* foi quando utilizou-se o glicerol como fonte de carbono, obtendo em média 7 gL⁻¹ de biomassa;
- As conversões em produto foram dependentes da concentração *C. glabrata*, sendo que as maiores (21 e 27%) foram obtidas com 16,7 e 33,3 gL⁻¹, respectivamente;
- A temperatura e o pH ótimo da reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a** medida pela levedura *C. glabrata* foram de 25 °C e pH 5,5;
- Em sistema bifásico, obteve-se as maiores conversões em **19a**, sendo de 53%;
- As leveduras *S. cerevisiae* e a *C. glabrata*, apresentaram praticamente a mesma eficiência na reação de bio-hidrogenação da chalcona **15a**, convertendo a dehidrochalcona **19a** quimiosseletivamente em 24 h de reação, com conversões de aproximadamente 50%;
- O produto obtido na biotransformação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por **FP** foi dependente do sistema biocatalítico utilizado.
- Em sistema bifásico, o produto majoritário foi a 1,5-difenil-3-pentanona (**23**) em 24 h (>99%);
- Com a adição de trealose e sacarose no meio reacional, obteve-se a formação de dois produtos na biotransformação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por **FP**, sendo estes a (1*E*)-1,5-difenil-1-penten-3-ona (**22**) e **23**.

A partir dos resultados apresentados, verifica-se a grande importância da otimização das condições reacionais nas biotransformações catalisadas por microorganismos.

O uso do sistema bifásico também contribuiu para o aumento das conversões das reações de bio-hidrogenação dos compostos carbonílicos α,β -

insaturados, apresentando um excelente potencial para ser empregado como meio reacional na obtenção de compostos de interesse sintético.

De maneira geral, obteve-se resultados bastante promissores na hidrogenação quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono ativada mediada pelas leveduras *S. cerevisiae* e *C. glabrata*.

6. PERSPECTIVAS

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

- Avaliar a atividade biológica dos produtos obtidos nas reações de bio-hidrogenação das chalconas **15a-i** mediada por leveduras;
- Realizar reações de biotransformação de outros compostos de interesse tais como, iminas, compostos carbonílicos α,β -insaturados substituídos no carbono alfa ou no beta e (2*E*,4*E*)-1,5-difenil-2,4-pentadien-1-ona;
- Realizar as reações de biotransformação em sistemas trifásicos formados por água/solvente orgânico/líquidos iônicos;
- Testar outros microorganismos na biotransformação de compostos carbonílicos α,β -insaturados de interesse biológico.
- Preparar chalconas com outros grupos substituintes, e/ou mais de um grupo nos dois anéis.

7. REFERÊNCIAS

1. J. A. R. Rodrigues, P. J. S. Moran, Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão, *Quim. Nova*, 24(6), **2001**, 893-897.
2. (a) D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3ª ed., Worth Publishers: New York, 2000. (b) R. Wolfenden, M. J. Snider, The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts, *Acc. Chem. Res.*, 34(12), **2001**, 938-945.
3. M. Cygler, J. D. Schrag, Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1441, **1999**, 205-214.
4. <http://www.rcsb.org/pdb>, acessada em 22/01/2009.
5. M. K. Campbell, *Biochemistry*, 2ª ed., Saunders College Publication, **1995**.
6. T. W. G. Solomons, *Orgânica Chemistry*, 6ª ed., John Wiley & Sons, Inc., Canadá, **1996**.
7. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 2ª ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, **1994**.
8. R. De Conti, J. A. R. Rodrigues, P. J. S. Moran, Biocatálise: Avanços recentes, *Quim. Nova*, 24(5), **2001**, 672-675.
9. A. Ghanem, Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds, *Tetrahedron*, 63, **2007**, 1721-1754.
10. E. E. Jacobsen, B. H. Hoff, A. R. Moen, T. Anthonsen, Enantioselective enzymatic preparation of chiral glutaric monocarboxylic acids and amides, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 21, **2003**, 55-58.
11. K. Faber, *Biotransformation in Organic Chemistry.*, 3ª ed., Springer-Verlag: Berlin, **1997**.
12. G. D. Haki, S. K. Rakshit, Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresour. Technol.*, 89, **2003**, 17-34.
13. F. Hasan, A. A. Shah, Industrial applications of microbial lipases Hameed, A., *Enzyme Microb. Technol.*, 39, **2006**, 235-251.

14. C. Pilissão, M. G. Nascimento, Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (*RS*)-methyl mandelate catalyzed by lipases, *Tetrahedron: Asymmetry*, 17, **2006**, 428–433
15. A. W. Munro, P. Taylor, M. D. Walkinshaw, Structure of redox enzymes, *Cur. Opin. Biotechnol*, 11, **2000**, 369-376.
16. J. B. Ribeiro, M. C. K. V. Ramos, F. R. A. Neto, S. G. F. Leite, O. A. C. Antunes, Microbiological enantioselective reduction of ethyl acetoacetate, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 24-25, **2003**, 121-124.
17. A. Wolfson, C. Dlugy, D. Tavor, J. Blumenfeld, Y. Shotland, Baker's yeast catalyzed asymmetric reduction in glycerol, *Tetrahedron: Asymmetry*, 17, **2006**, 2043-2045.
18. M. Zagozda, J. Plenkiewicz, Enantioselective reduction of α,β -unsaturated ketone by *Geotrichum candidum*, *Mortierella isabelina* and *Rhodotorula rubra* yeast, *Tetrahedron: Asymmetry*, 17, **2006**, 1958-1692.
19. Y. Kawai, K. Saitou, K. Hida, D. H. Dao, A. Ohno, Stereochemical control in microbial reduction. XXVII. Asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with bakers' yeast, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69, **1996**, 2633-2638.
20. P. Ferraboschi, S. Reza-Elahi, E. Verza, E. Santaniello, Baker's yeast mediated biohydrogenation of unsaturated compounds containing a methylene group: enantioselective preparation of 2-methyl alkanol from 2-substituted acrolein acetals, *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, **1999**, 2639-2642.
21. E. P. S. Filho, J. A. R. Rodrigues, P. J. S. Moran, Baker's yeast reduction of α -methylene ketones, *Tetrahedron: Asymmetry*, 12, **2001**, 847-852.
22. A. Muller, B. Hauer, B. Rosche, Enzymatic reduction of the α,β -unsaturated carbon bond in citral, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 38, **2006**, 126-130.
23. T. Vaijayanthi, A. Chadha, Asymmetric reduction of aryl imines using *Candida parapsilosis* ATCC 7330, *Tetrahedron: Asymmetry*, 19, **2008**, 93–96.

24. P. M. Albuquerque, M. A. Witt, B. U. Stambuk, M. G. Nascimento, Influence of sugar on enantioselective reduction using *Saccharomyces cerevisiae* in organic solvent, *Process Biochem.*, 42, **2007**, 141-147.
25. B. Barkakaty, Y. Takaguchi, S. Tsuboi, New synthetic routes towards various α -fluorinated aryl ketones and their enantioselective reduction using baker's yeast, *Tetrahedron*, 63, **2007**, 970-976.
26. R. S. Pereira, Fermento biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) e seu uso em síntese assimétricas, *Quim. Nova*, 18(5), **1995**, 452-459.
27. M. J. Homann, R. B. Vail, E. Previte, M. Tamarez, B. Morgan, D. R. Dodds, A. Zaks, Rapid identification of enantioselective ketone reduction using targeted microbial libraries, *Tetrahedron*, 60, **2004**, 789-797.
28. W. Wang, M. H. Zong, W. Y. Lou, Use of an ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4'-methoxyacetophenone catalyzed by immobilized *Rhodotorula* sp. AS2.2241 cells, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 56, **2009**, 70-76
29. Y. Huang, F. Zhang, Y. Gong, A convenient approach to (S)-2-ethylhexan-1-ol mediated by baker's yeast, *Tetrahedron Lett.*, 46, **2005**, 7217-7219.
30. C. Fuganti, J. Minut, G. P. Fantoni, S. Servi, On the microbial transformation of α,β -unsaturated aryl ketones by the fungus *Beauveria bassiana*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 4, **1998**, 47-52
31. G. J. Andrade, P. J. S. Moran, J. A. R. Rodrigues, Highly efficient extractive biocatalysis in the asymmetric reduction of an acyclic enone by the yeast *Pichia stipitis*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 14, **2003**, 43-45.
32. Y. Chu, B. L. Zhang, V. Silvestre, J. P. Cheng, Hydrogen transfer pathways of the asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketone mediated by baker's yeast, *Bioorg. Chem.*, 34, **2006**, 159-166.
33. Y. Kawai, M. Hayashi, Y. Inaba, K. Saitou, A. Ohno, Asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with a carbon-carbon double-bond reductase from baker's yeast, *Tetrahedron Lett.*, 39, **1998**, 5225-5228.

34. P. T. Baraldi, A. G. Corrêa, O emprego de fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae*, na síntese de feromônios, *Quim. Nova*, 27(3), **2004**, 421-431.
35. J. D. Stewart, Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, **2000**, 363–368.
36. E. Z. Duda, M. K. Ochab, P. Kafarski, B. Lejczak, Stereochemical control of biocatalytic asymmetric reduction of diethyl 2-oxopropylphosphonate employing yeasts, *J. Organomet. Chem.*, 690, **2005**, 2593–2596.
38. L. C. Basso, H. V. Amorim, A. J. Oliveira, M. L. Lopes, Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil, *FEMS Yeast res.*, 8, **2008**, 1155-1163.
39. <http://www.fermentec.com.br/br/news/Fermentec%20News%2002%20-&202007.pdf>, acessada em 15/janeiro/2009.
40. Y. Li, J. Chen, S. Y. Lun, Biotechnological production of pyruvic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, **2001**, 451-459.
41. P. L. Fidel, J. A. Vazquez, J. D. Sobel, *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. Albicans*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(1), **1999**, 80-96.
42. R. León, P. Fernandes, H. M. Pinheiro, J. M. S. Cabral, Whole-cell biocatalysis in organic media, *Enzyme Microb. Technol.*, 23, **1998**, 483-500.
43. Y. Dong, Q. Yang, S. Jia, C. Qiao, Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Biochem. Eng. J.*, 37, **2007**, 226–230
44. Y. Luo, W. M. Li, W. Wang, Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?, *Environ. Expe. Botany*, 63, **2008**, 378-384.
45. M. A. Singer, S. Lindquist, Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose, *Trends Biotechnol.*, 16, **1998**, 460-468.
46. B. U. Stambuk, J. H. Crowe, L. M. Crowe, A. D. Panet, P. S. Araujo, A dependable method for the synthesis of [¹⁴C]trehalose, *Anal. Biochem.*, 212, **1993**, 150-153.

47. R. Dalla-Vecchia, D. Sebrão, M. G. Nascimento, V. Soldi, Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization, *Process. Biochem.*, 40, **2005**, 2677–2682.
48. A. M. P. Koskinen, A. M. Klivanov, *Enzymatic Reaction in Organic Media*, 1^a ed. Glasgow: Blakie Academic & Professional, **1996**.
49. D. T. Santos, B. F. Sarrouh, J. D. Rivaldi, A. Converti, S. S. Silva, Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production, *J. Food Eng.*, 86, **2008**, 542–548.
50. P. G. Dumanski, P. Florey, M. Knetting, A. J. Smallridge, M. A. Trehwella, The baker's yeast-mediated reduction of conjugated methylene groups in an organic solvent, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 11, **2001**, 905-908.
51. Z. G. Wang, L. S. Wan, Z. M. Liu, X. J. Huang, Z. K. Xu, Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 56, **2009**, 189–195
52. P. Villeneuve, J. M. Muderhwa, J. Graille, M. J. Haas, Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 9, **2000**, 113–148.
53. M. B. A. Rahman, S. M. Tajudin, M. Z. Hussein, R. N. Z. R. A. Rahman, A. B. Salleh, M. Basri, Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification, *Appl. Clay Sci.*, 29, **2005**, 111-116.
54. L. D. S. Marquez , B. V. Cabral, F. F. Freitas, V. L. Cardoso, E. J. Ribeiro, Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 51, **2008**, 86-92.
55. G. Y. Li, K.L. Huang, Y. R. Jiang, P. Ding, Production of (*R*)-mandelic acid by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* on chitosan carrier, *Process Biochem.*, 42, **2007**, 1465-1469
56. P. Grunwald, Experimental treatment of the laws of heterogeneous catalysis with immobilized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*), *Biochem. Educ.*, 28, **2000**, 96-99.

57. R. Dalla-Vecchia, M. G. Nascimento, V. Soldi, Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros, *Quim. Nova*, 27(4), **2004**, 623-630.
58. F. Secundo, J. Miehé-Brendlé, C. Chelaru, E. E. Ferrandi, E. Dumitriu, Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition, *Microporous Mesoporous Mater.*, 109, **2008**, 350-361.
59. D. Sebrão, V. D. Silva, M. G. Nascimento, M. A. Moreira, Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres, *Quim. Nova*, 30(5), **2007**, 1182-1187.
60. Y. Zhang, J. Li, D. Han, H. Zhang, P. Liu, C. Li, An efficient resolution of racemic secondary alcohols on magnetically separable biocatalyst, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365, **2008**, 609-613.
61. M. A. Moreira, T. B. Bitencourt, M. G. Nascimento, Optimization of chemo-enzymatic epoxidation of cyclohexene mediated by lipases, *Synth. Commun.*, 5, **2005**, 2107-2114.
62. J. Y. He, Z. H. Sun, W. Q. Ruan, Y. Xu, Biocatalytic synthesis of ethyl (S)-4-cloro-3-hydroxy-butanoate in an aqueous-organic solvent biphasic system using *Aureobasidium pullulans* CGMCC 1244, *Process biochem.*, 41, **2006**, 244-249.
63. A. C. Spie, W. Eberhard, M. Peters, M. F. Eckstein, L. Greiner, J. Buchs, 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.
64. P. Costa, R. Pilli, S. Pinheiro, M. Vasconcellos, *Substâncias carboniladas e derivados*, Porto Alegre: Bookman, **2003**.
65. J. T. Li, W. Z. Yang, S. X. Wang, S. H. Li, T. S. Li, Improved synthesis of chalcones under ultrasound irradiation, *Ultrason. Sonochem.*, 9, **2002**, 237-239.
- 66 O. Petrov, Y. Ivanova, M. Gerova, SOCl₂/EtOH: catalytic system for synthesis of chalcones, *Catal. Commun.*, 9, **2008**, 315-316.
67. L. Santos, R. C. Pedrosa, R. Correa, V. C. Filho, R. J. Nunes, R. A. Yunes, Biological evaluation of chalcones and analogues as hypolipidemic agents, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 339, **2006**, 541-546.

68. E. H. Alberton, R. G. Damazio, L. H. Cazarolli, L. D. Chiaradia, P. C. Leal, R. J. Nunes, R. A. Yunes, F. R. M. B. Silva, Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats, *Chem.-Biol. Interact.*, 171, **2008**, 355–362.
69. C. B. G. Botolli, I. C. S. F. Jardim, C. H. Collins, *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo: Artliber Editora, 2004.
70. A Guide to using Cyclodextrin Bonded Phases for Chiral Separations by Capillary Gas Chromatography. ChiralDex Handbook. Advanced Separation Technologies Inc. 5^a Ed., USA, 1996-1997.
71. Y. Machida, H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether, *J. Chromatogr. A.*, 805, 1998, 85-92.
72. C. H. Collins, G. L. Braga, P. S. Bonato, *Fundamentos de Cromatografia*, Ed. Unicamp, **2006**.
73. R. A. Aitken, S. N. Kilényi, *Asymmetric Synthesis*. London: Blackie Academic & Professional, 1992.
74. D. G. Batt, R. Goodman, D. G. Jones, J. S. Kerr, L. R. Mantegna, C. McAllister, R. C. Newton, S. Nurnberg, P. K. Welch, M. B. Covington, 2'-Substituted chalcone derivatives as inhibitors of interleukin-1 biosynthesis, *J. Med. Chem.*, 36, **1993**, 1434-1442.
75. V. Dauksas, P. Gaidelis, O. Petrauskas, E. Udrenaite, G. Gasperaviciene, N. Raguotiene, Synthesis and antiinflammatory activity of acyl-substituted benzaxa-and benzodioxaheterocycles and their acyclic analogs, *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* 21(5), **1987**, 569-573.
76. A. I. Vogel, *Química Orgânica Análise Orgânica Qualitativa*, v. 2, 3^a Ed., Ao livro técnico S. A., Rio de Janeiro, **1971**.
77. B. Zeynizadeh, T. Behyar, Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with $\text{NABH}_4/\text{wet SiO}_3$ under solvent free condition, *J. Braz. Chem. Soc.*, 16(6A), **2005**, 1200-1209;
78. A. M. Easton, M. J. A. Habib, J. Park, Stable carbonium ions. Part III. Reactions

involving 1,3-diarylallyl and 1-ferrocenyl-3-arylallyl cations, *J. Chem. Soc. Perkin II*, 15, **1972**, 2290-2297.

79. B. C. Ranu, S. Samanta, Reduction of activated conjugated alkenes by the InCl_3 - NaBH_4 reagent system, *Tetrahedron*, 59, **2003**, 7901-7906;

80. J. G. Dinwiddie, H. M. White, The geometrical isomers of 1,5-diphenylpentadien-3-ol, *J. Org. Chem.*, 33(11), **1968**, 4309-4312;

81. B. U. Stambuk, A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction *versus* repression of yeast α -glucosidase, *Biochem. Educ.*, 27, **1999**, 177-180.

82. S. P. Zanotto, Utilização de Enzimas e Microrganismos para a Obtenção de Compostos Ópticamente Ativos. Florianópolis, **2003**. 115 p. Tese (doutorado), Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

83. T. Morita, R. M. V. Assumpção, *Manual de Soluções, Reagentes & Solventes*. 2ª ed. São Paulo: Edgar Blücher Ltda, **1995**.

84. D. H. Williams, I. Fleming, *Spectroscopic methods in organic chemistry*, 4ª ed., McGraw-Hill Book company (UK) Limited, England, **1987**.

85. K. Yoshizawa, T. Shioiri, Convenient stereoselective synthesis of (*Z*)-chalcone derivatives from 1,3-diaryl-2-propynyl silyl ethers, *Tetrahedron Lett.*, 47, **2006**, 4943-4945.

86. L. Y. Jayasinghe, D. Kodituwakku, A. J. Smallridge, M. A. Trehwella, The use of organic solvent systems in the yeast mediated reduction of ethyl acetoacetate. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 67(9), **1994**, 2528-2531.

87. C. Medson, A. J. Smallridge, M. A. Trehwella, The stereoselective preparation of β -hydroxy esters using a yeast reduction in an organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(7), **1997**, 1049-1054.

88. A. Cruz, P. Fernandes, J. M. S. Cabral, H. M. Pinheiro, Whole-cell bioconversion of β -sitosterol in aqueous-organic two-phase systems, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 11, **2001**, 579-585

89. W.Y. Lou, M.H. Zong, Y.Y. Zhang, H. Wu, Efficient synthesis of optically active organosilyl alcohol via asymmetric reduction of acyl silane with immobilized yeast, *Enzyme Microb. Technol.*, 35, **2004**, 190-196.
90. J. March, *Advanced organic chemistry reactions, mechanisms, and structure*, 3^a ed, Wiley-Interscience, **1985**
91. D. X. Lee, W. S. Xia, J. L. Zhang, Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase, *Food Chem.*, 111, **2008**, 291–295.
92. T. Matsuda, R. Marukado, M. Mukouyama, T. Harada, K. Nakamura, Asymmetric reduction of ketones by *Geotrichum candidum*: immobilization and application to reactions using supercritical carbon dioxide, *Tetrahedron: Asymmetry*, 19, **2008**, 2272-2275.
- 93 P. D'Arrigo, G. P. Fantoni, S. Servi, A. Strini, The effect of absorbing resins on substrate concentration and enantiomeric excess in yeast reduction, *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(14), **1997**, 2375-2379.
- 94 [31] B. Wipf, E. Kupfer, R. Bertazzi, H. G. W. Leuenberger, Production of (+)-(S)-ethyl 3-hydroxybutyrate and (-)-(R)-ethyl 3-hydroxybutyrate by microbial reduction of ethyl acetoacetate, *Helv. Chim. Acta*, 66(2), **1983**, 485-488.
- 95 H. M. S. Milagre, C. D. F. Milagre, P. J. S. Moran, M. H. A. Santana, J. A. R. Rodrigues, Reduction of ethyl benzoylformate mediated by *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in alginate fibers with double gel layers in a continuously operated reactor, *Enzyme Microb. Technol.*, 37, **2005**, 121–125.
96. C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, Rules for the optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.*, 30, **1987**, 81-87.
97. Y.N. Li, X. A. Shi, M. H. Zong, C. Meng, Y. Q. Dong, Y. H. Guo, Asymmetric reduction of 2-octanone in water/organic solvent biphasic system with Baker's yeast FD-12, *Enzyme Microb. Technol.*, 40, **2007**, 1305-13110.
98. S. Bie, F. Lu, L. Du, Q. Qiu, Y. Zhang, Effect of phase composition on the bioconversion of methyltestosterone in a biphasic system. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 55, **2008**, 1–5

99. H. Ohta, J. Konishi, G. I. Tsuchihashi, Selective hydrogenation of carbon-carbon double bond of chalcones by the aid of microorganism, *Chem. Lett.*, **1983**, 1895-1896.
100. P. M. Albuquerque, Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na redução de substratos carbonílicos. Florianópolis, **2007**. 161 p. Tese (doutorado), Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

8. ANEXO

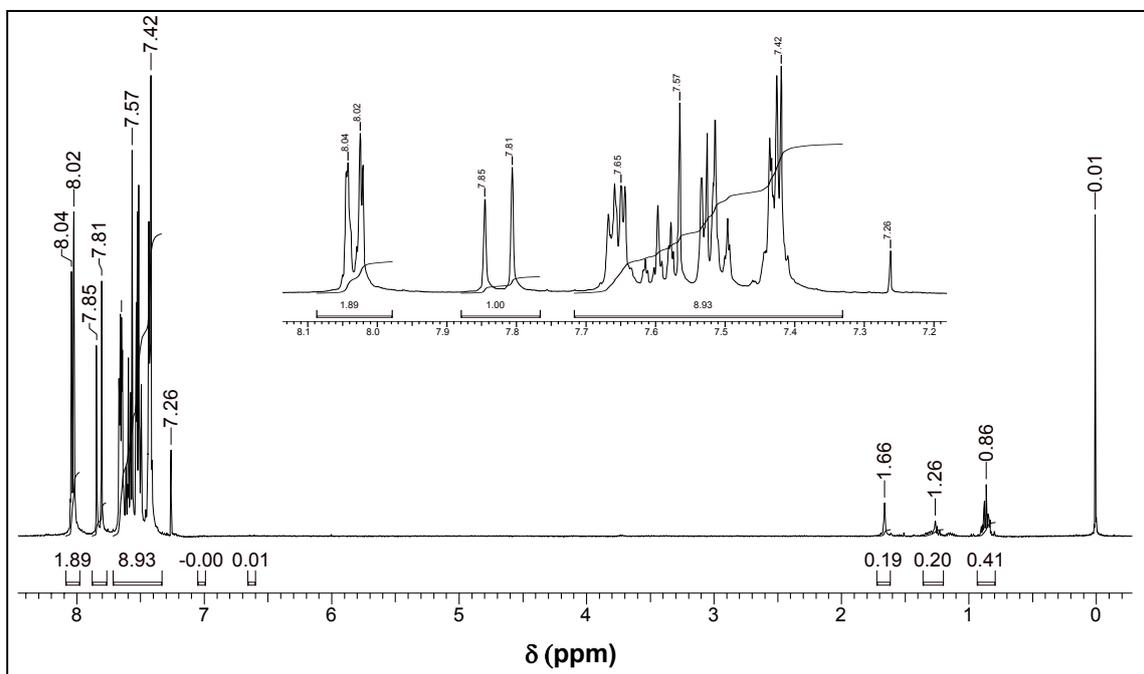


Figura 55- Espectro de RMN-¹H da chalcona 15a. [CDCl₃, 400 MHz]

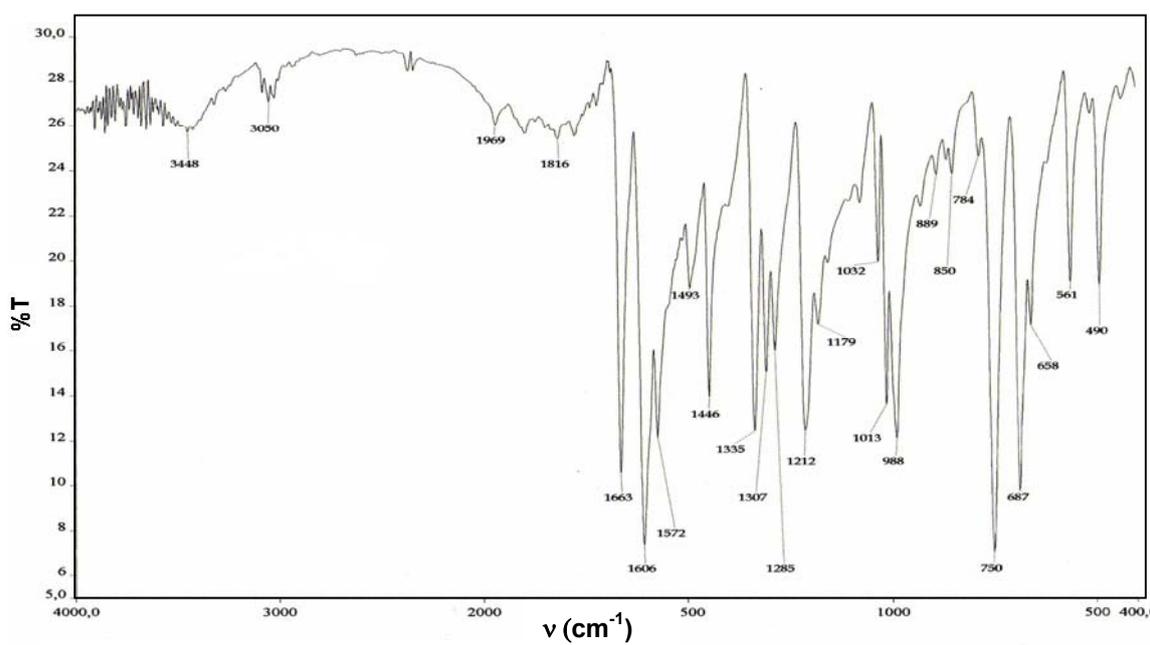


Figura 56- Espectro de IV da chalcona 15a. [pastilha de KBr]

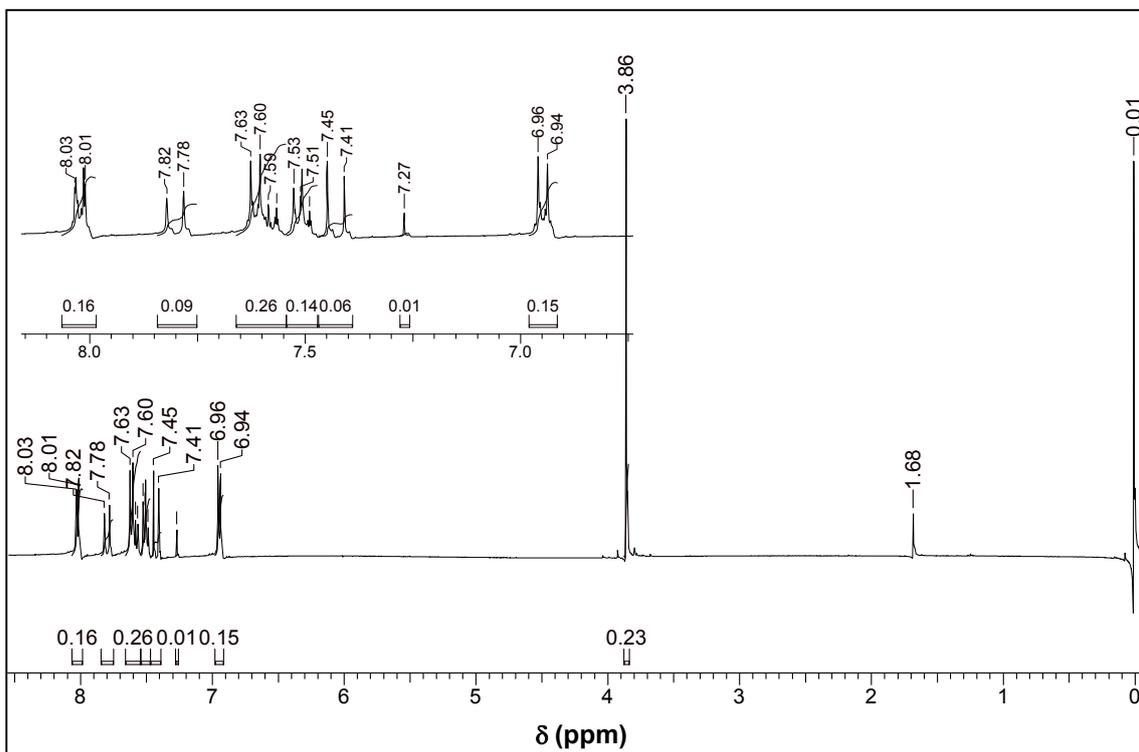


Figura 57- Espectro de RMN-¹H da chalcona **15b**. [CDCl₃, 400 MHz]

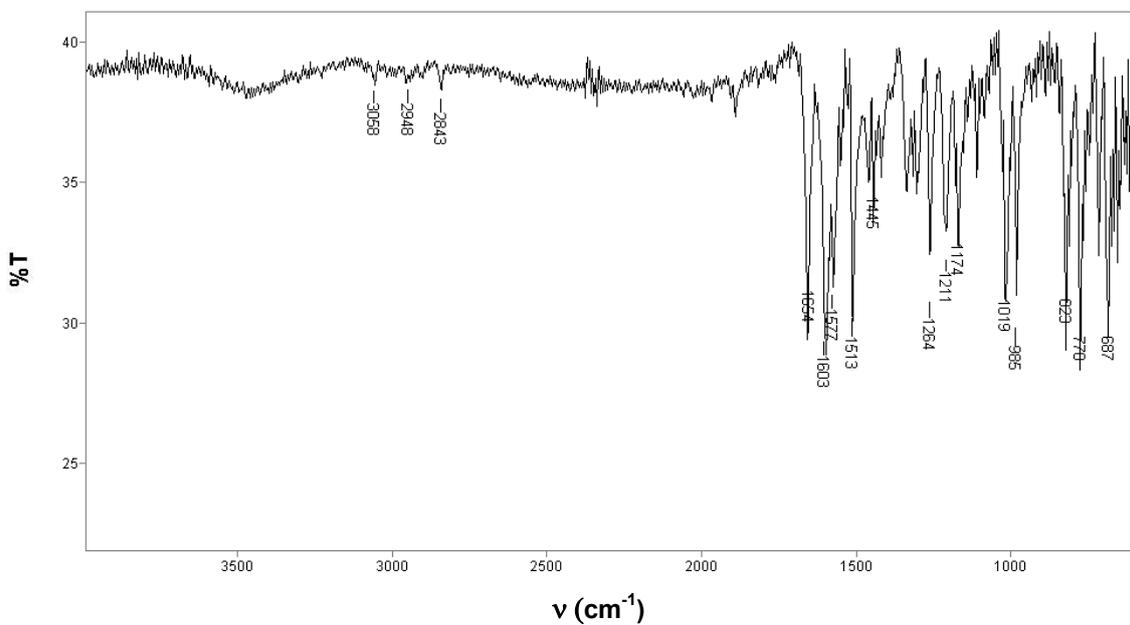


Figura 58- Espectro de IV da chalcona **15b**. [pastilha de KBr]

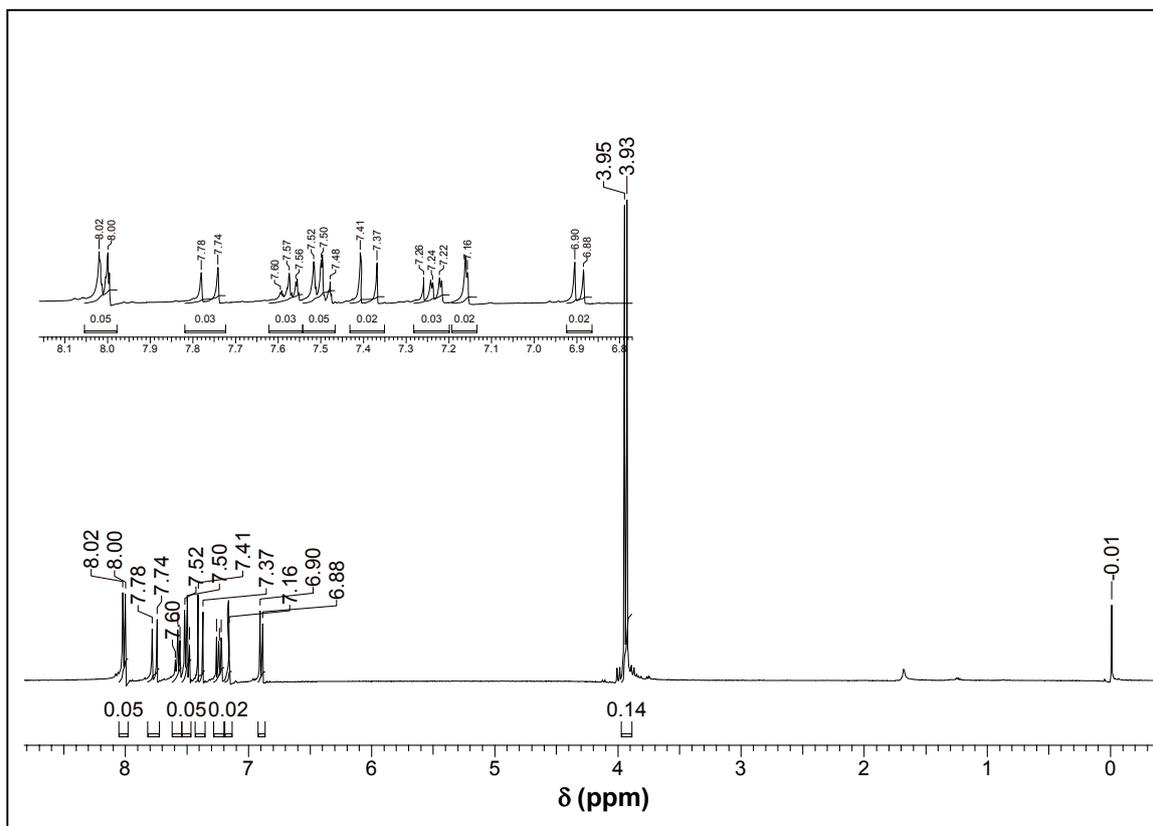


Figura 59- Espectro de RMN-¹H da chalcona **15c**. [CDCl₃, 400 MHz]

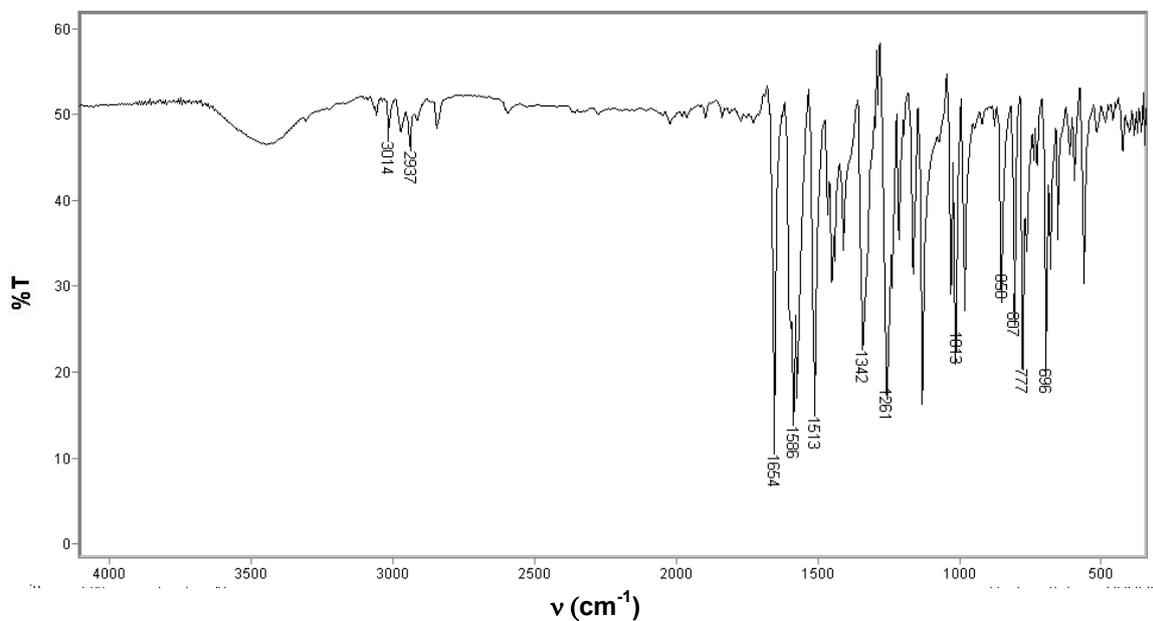


Figura 60- Espectro de IV da chalcona **15c**. [pastilha de KBr]

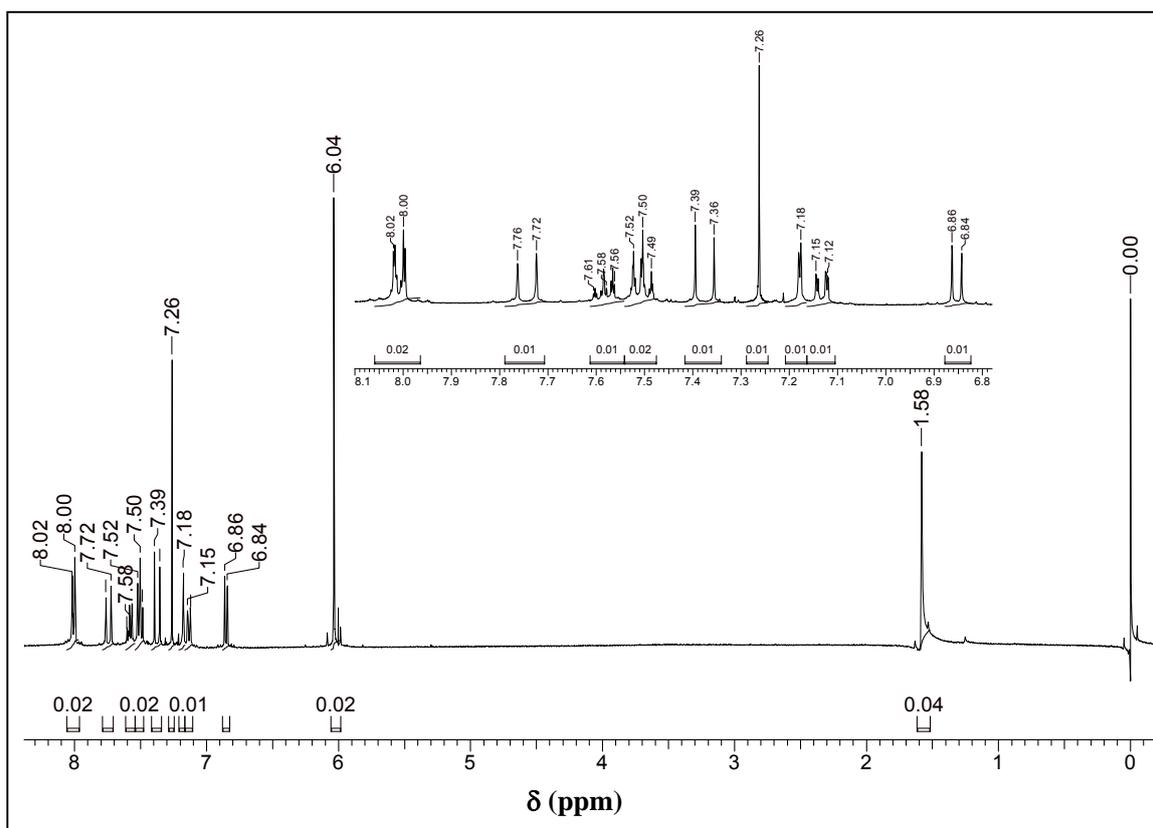


Figura 61- Espectro de RMN-¹H da chalcona **15d**. [CDCl₃, 400 MHz]

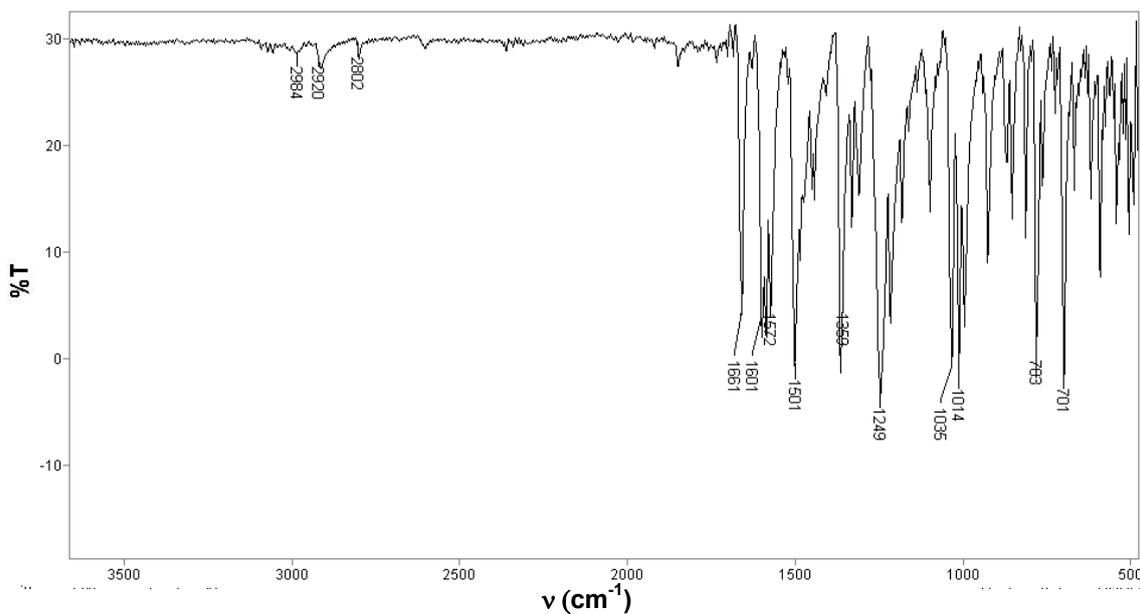


Figura 62- Espectro de IV da chalcona **15d**. [pastilha de KBr]

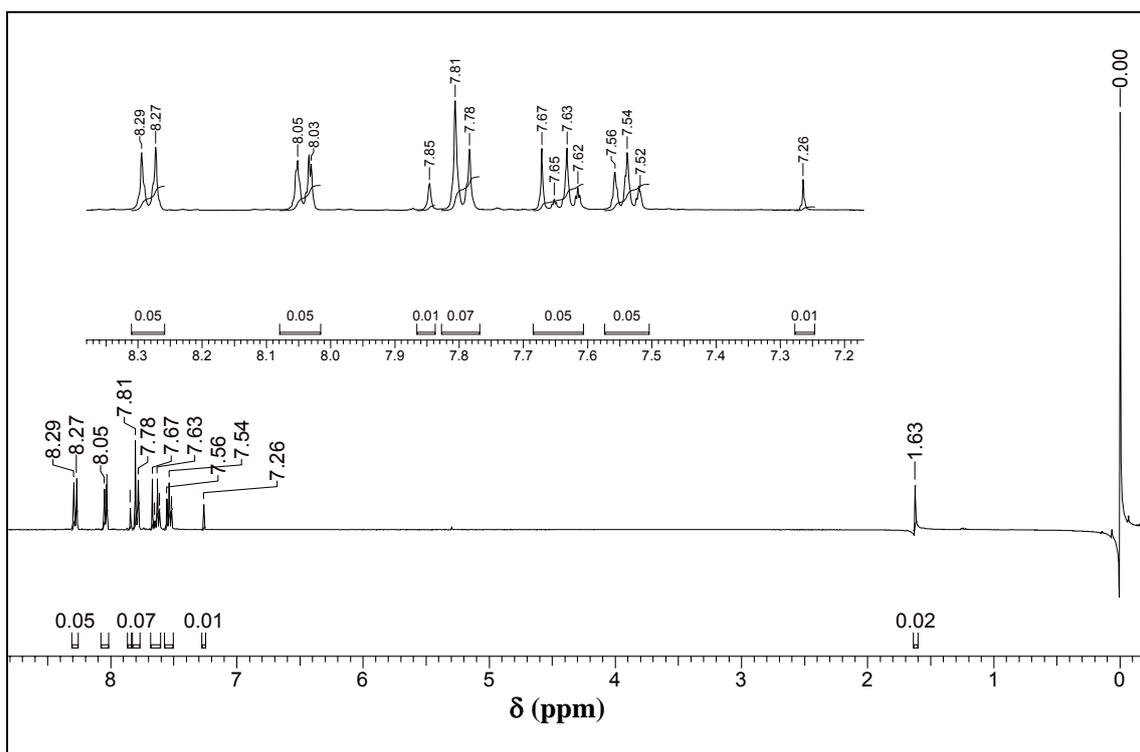


Figura 63- Espectro de RMN-¹H da chalcona **15e**. [CDCl₃, 400 MHz]

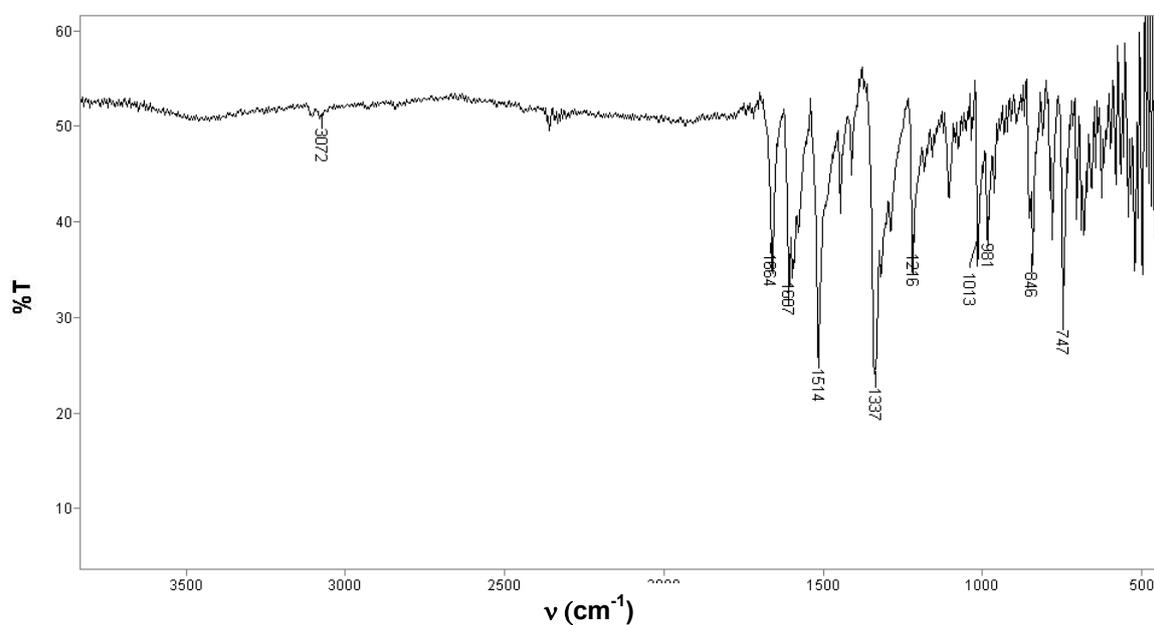


Figura 64- Espectro de IV da chalcona **15e**. [pastilha de KBr]

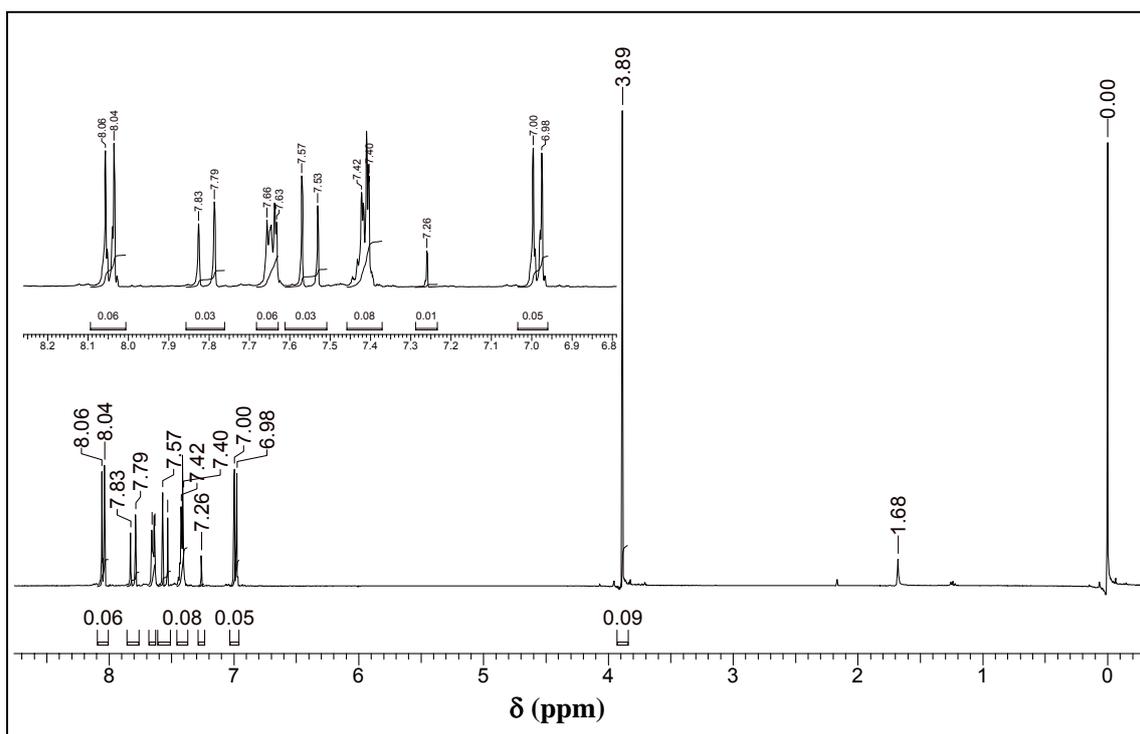


Figura 65- Espectro de RMN- ^1H da chalcona **15f**. [CDCl_3 , 400 MHz]

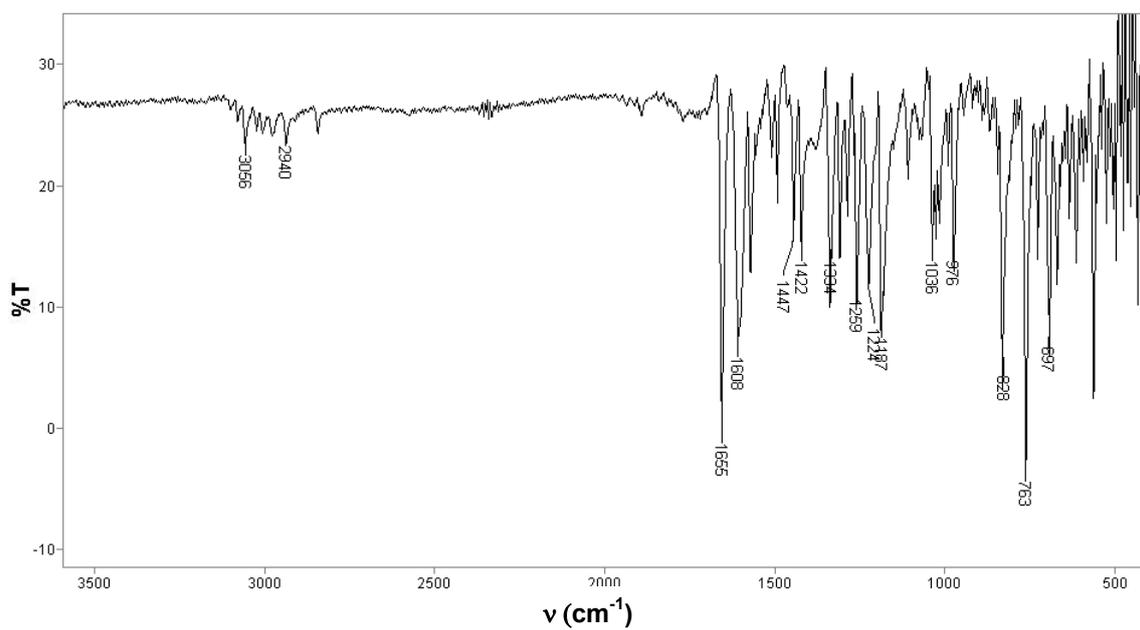


Figura 66- Espectro de IV da chalcona **15f**. [pastilha de KBr]

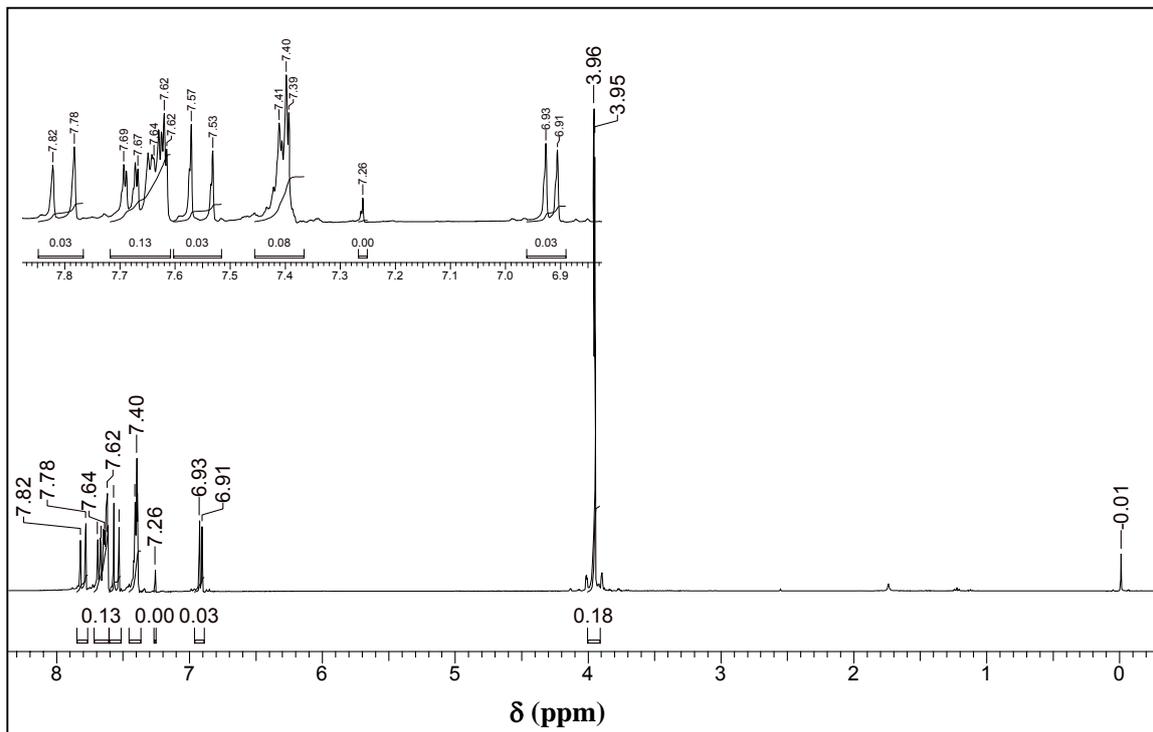


Figura 67- Espectro de RMN-¹H da chalcona **15g**. [CDCl₃, 400 MHz]

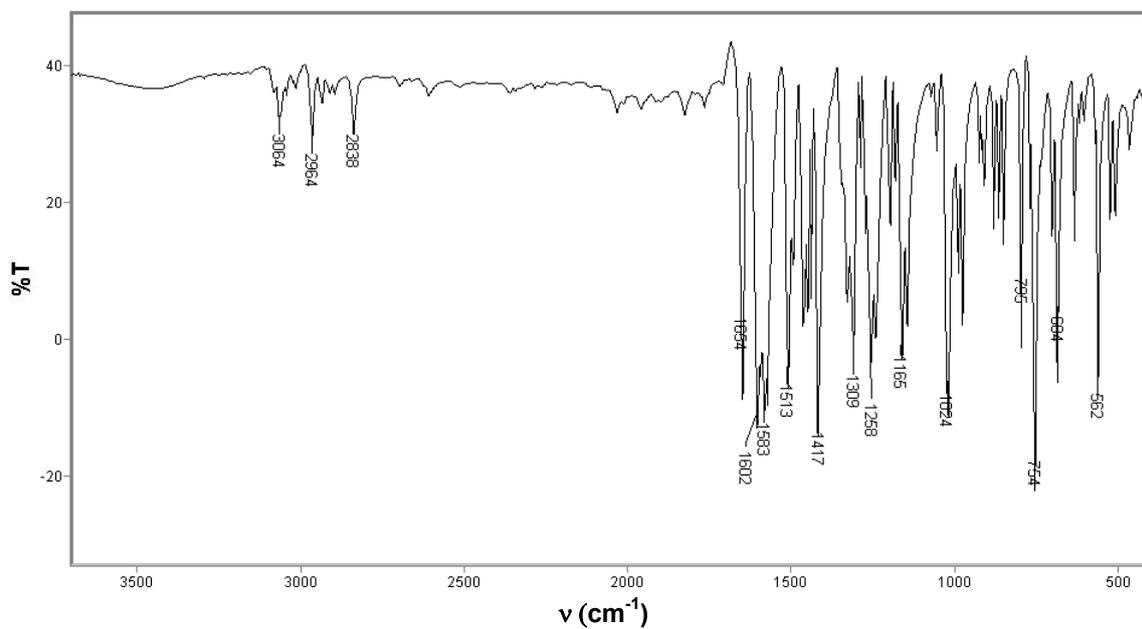


Figura 68- Espectro de IV da chalcona **15g**. [pastilha de KBr]

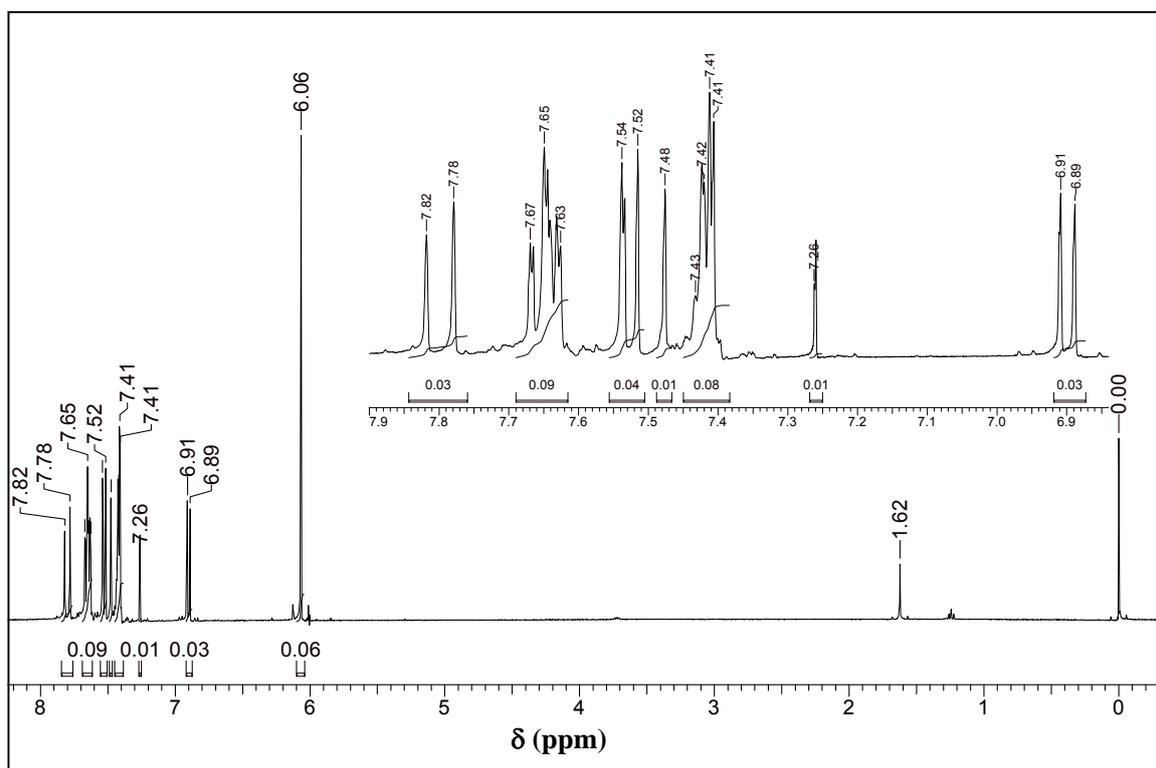


Figura 69- Espectro de RMN-¹H da chalcona **15h**. [CDCl₃, 400 MHz]

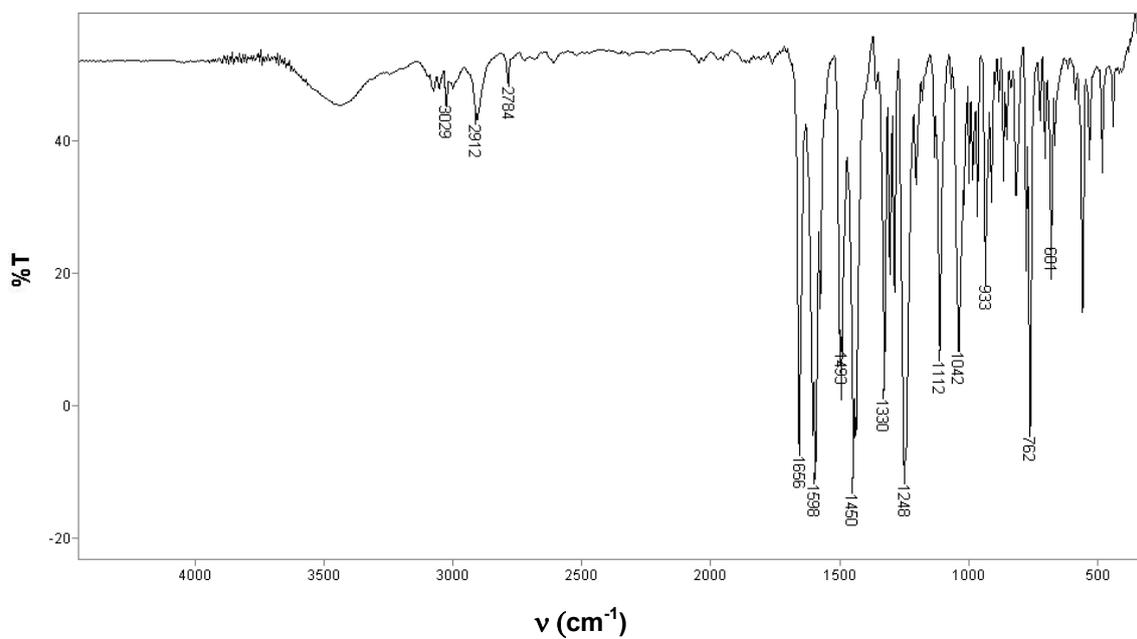


Figura 70- Espectro de IV da chalcona **15h**. [pastilha de KBr]

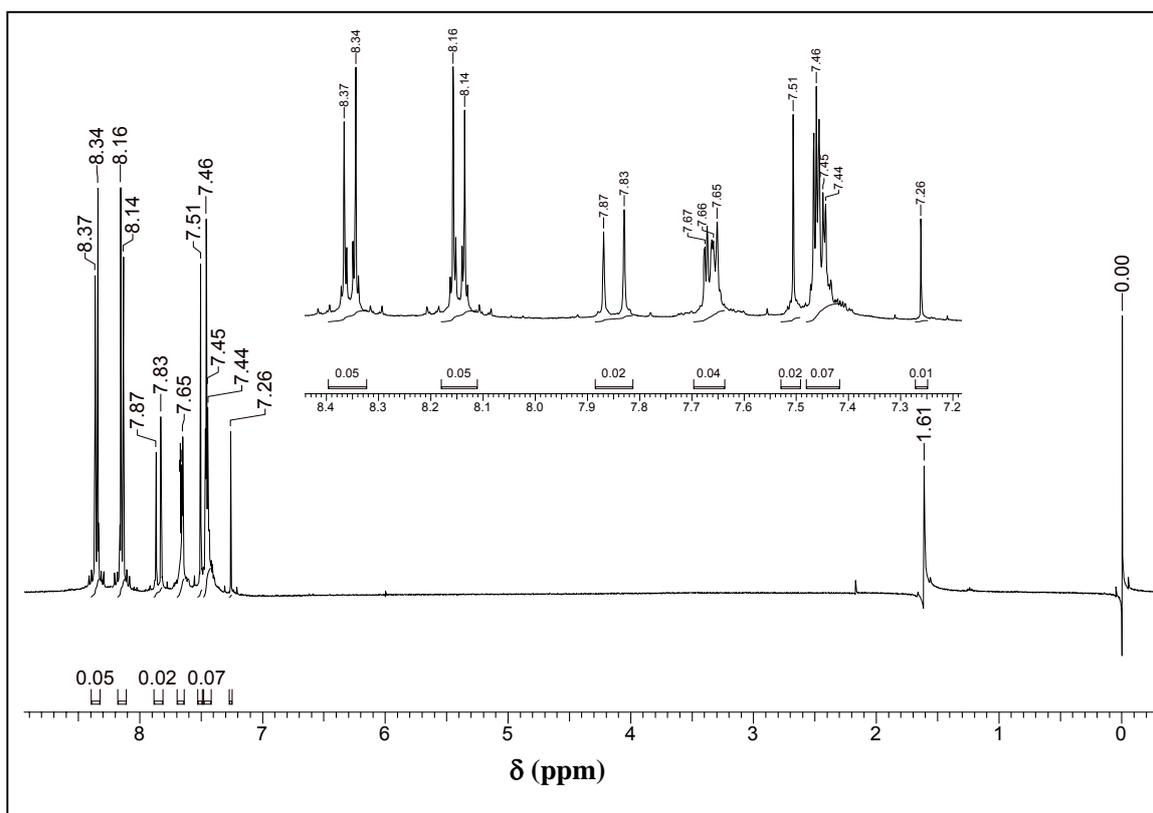


Figura 71- Espectro de RMN-¹H da chalcona **15i**. [CDCl₃, 400 MHz]

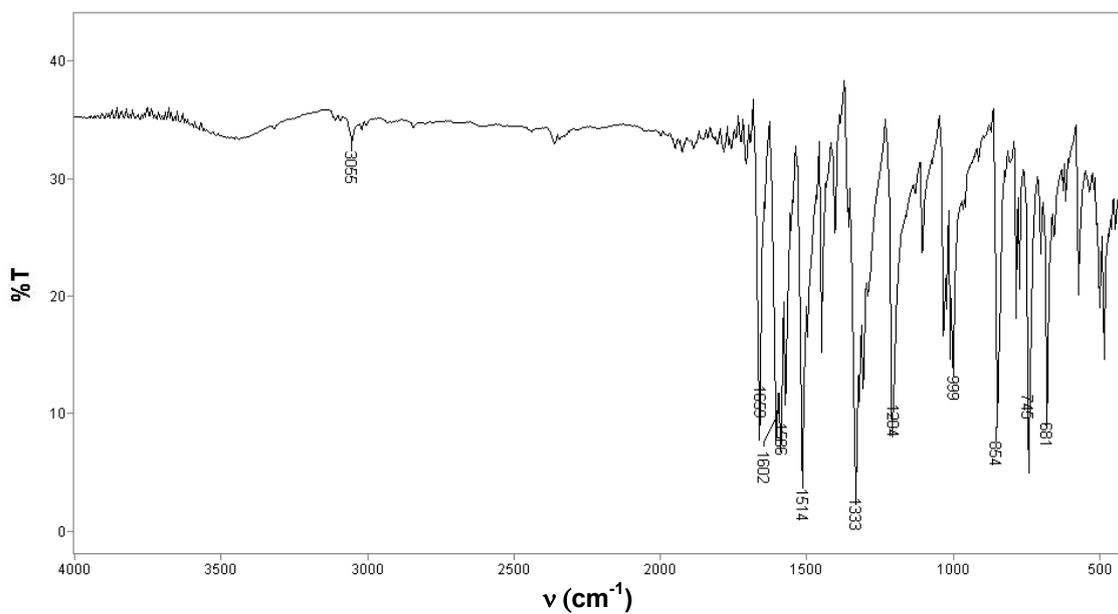


Figura 72- Espectro de IV da chalcona **15i**. [pastilha de KBr]

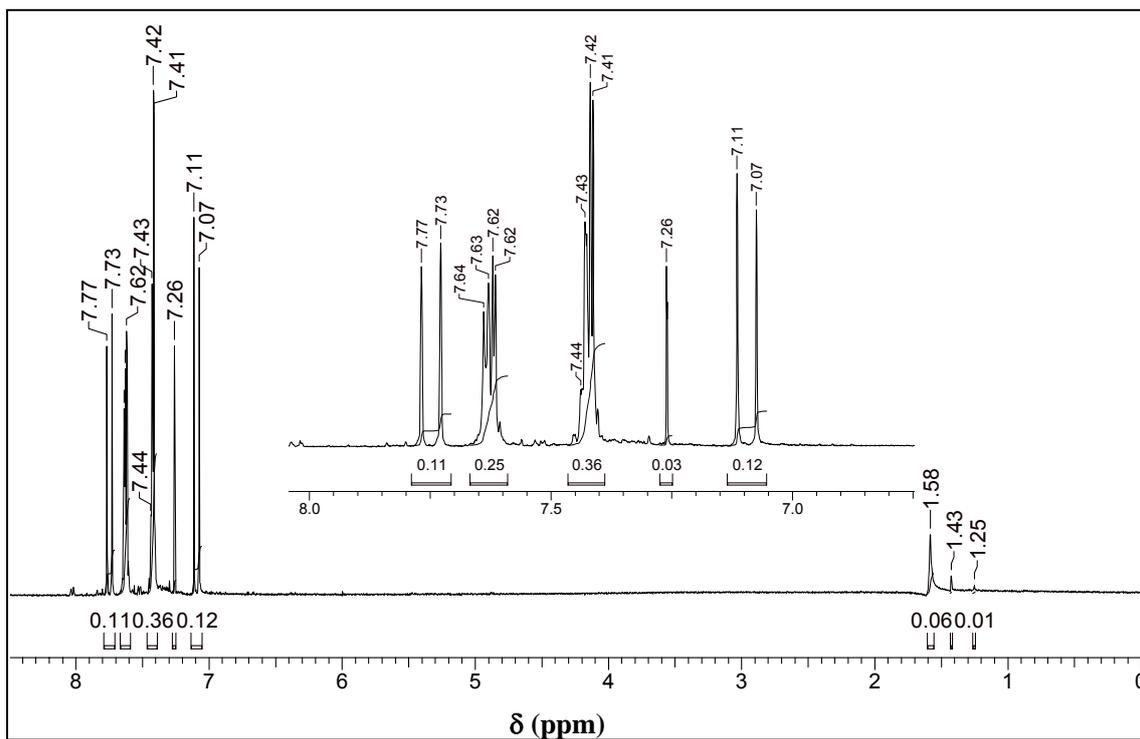


Figura 73- Espectro de RMN-¹H de 16. [CDCl₃, 400 MHz]

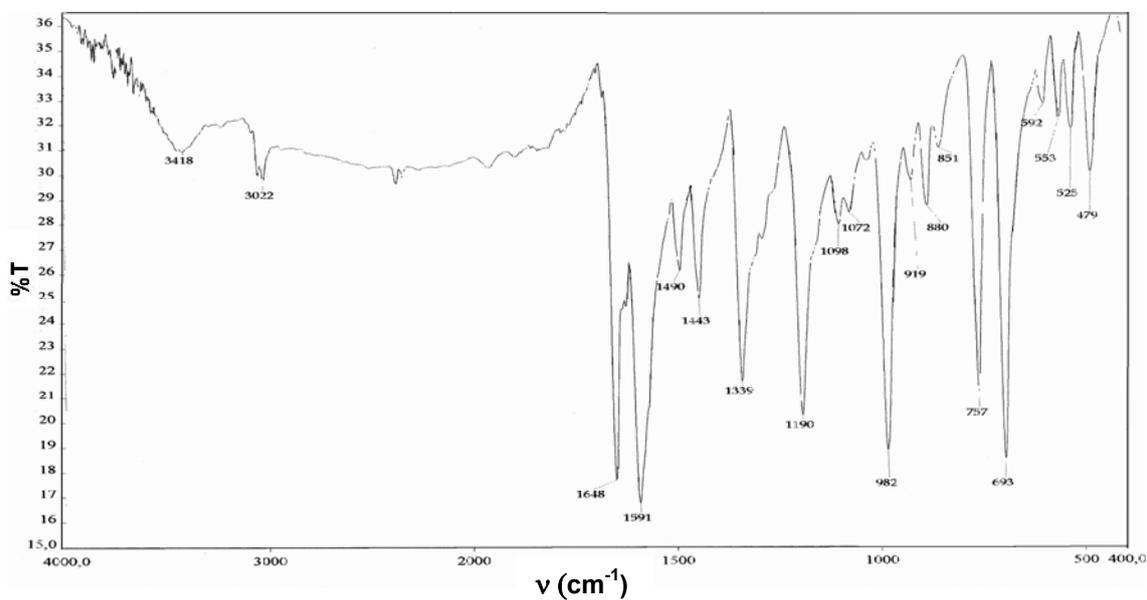


Figura 74- Espectro de IV de 16. [pastilha de KBr]

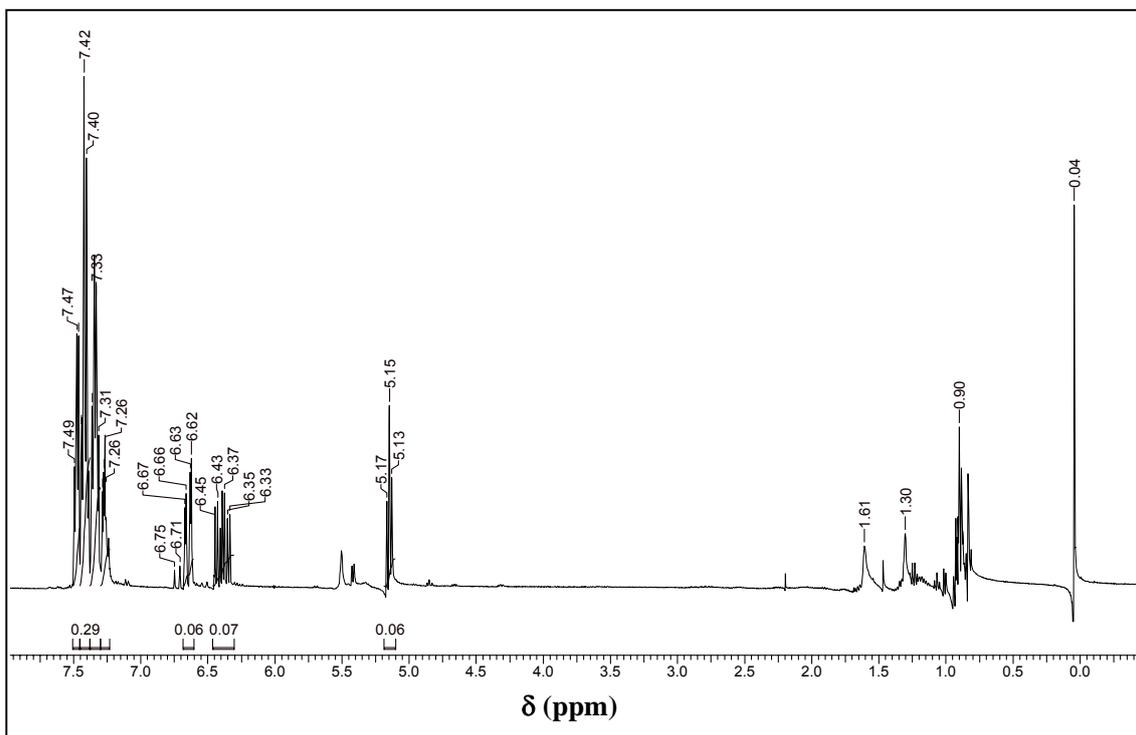


Figura 75- Espectro de RMN-¹H do álcool 17a. [CDCl₃, 400 MHz]

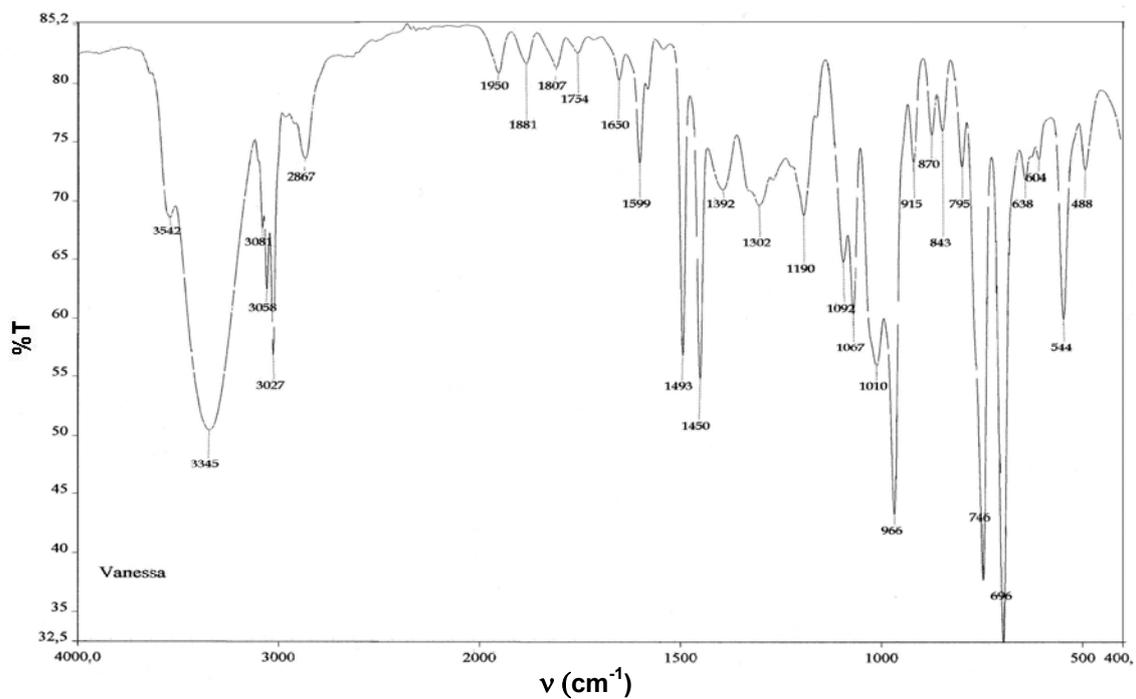


Figura 76- Espectro de IV do álcool 17a. [pastilha de KBr]

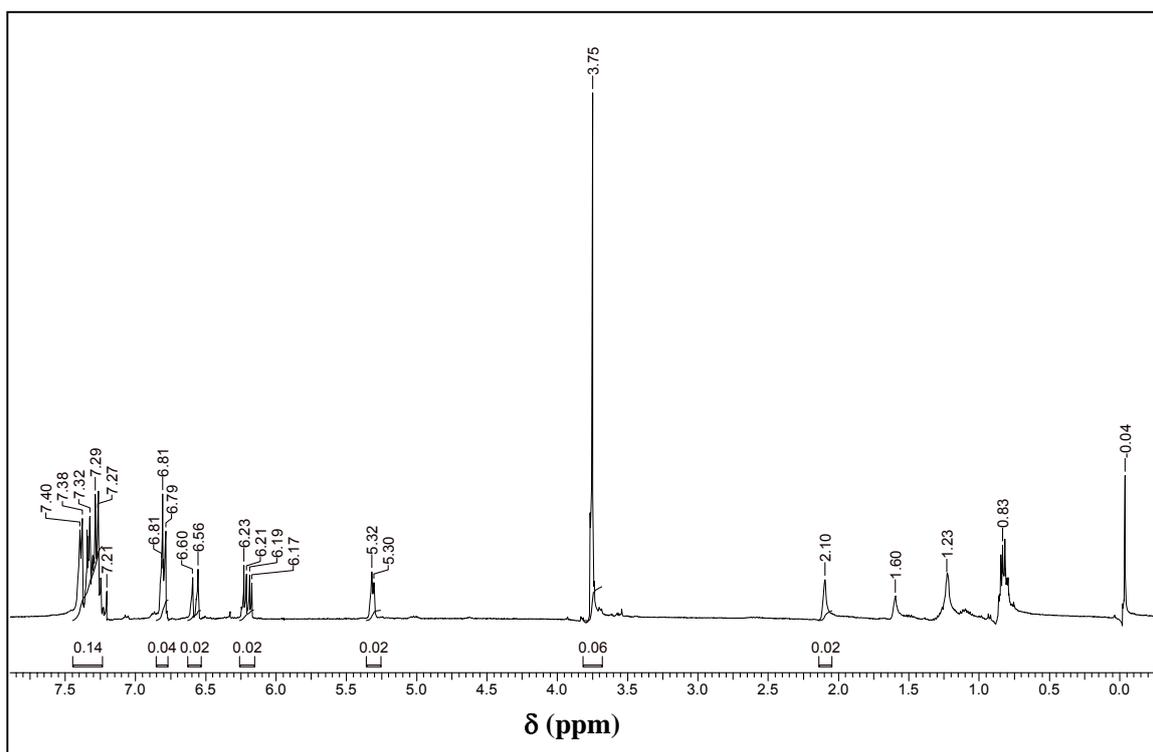


Figura 77- Espectro de RMN-¹H do álcool 17b. [CDCl₃, 400 MHz]

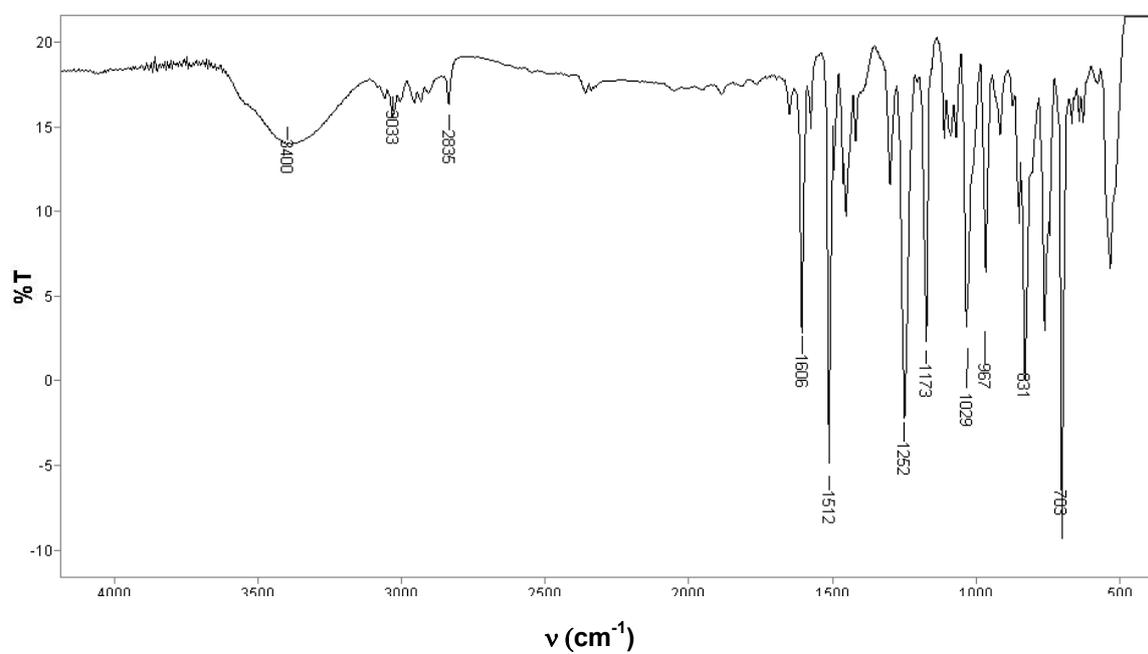


Figura 78- Espectro de IV do álcool 17b. [pastilha de KBr]

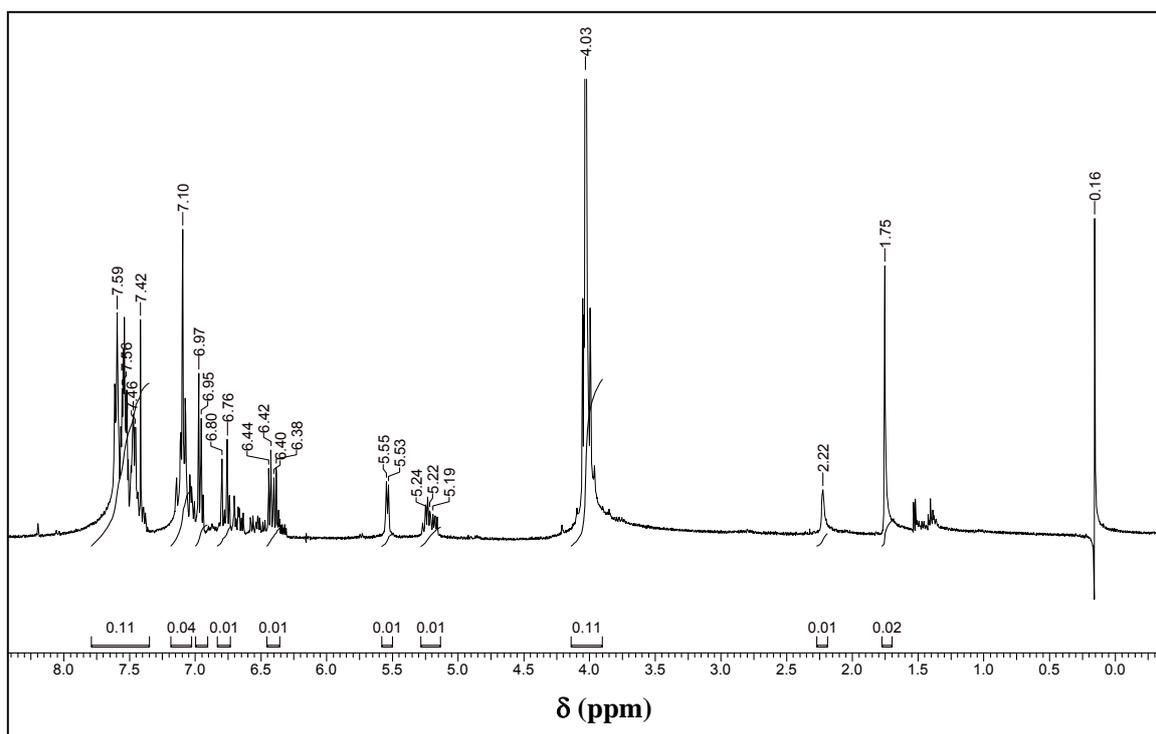


Figura 79- Espectro de RMN-¹H do álcool 17c. [CDCl₃, 400 MHz]

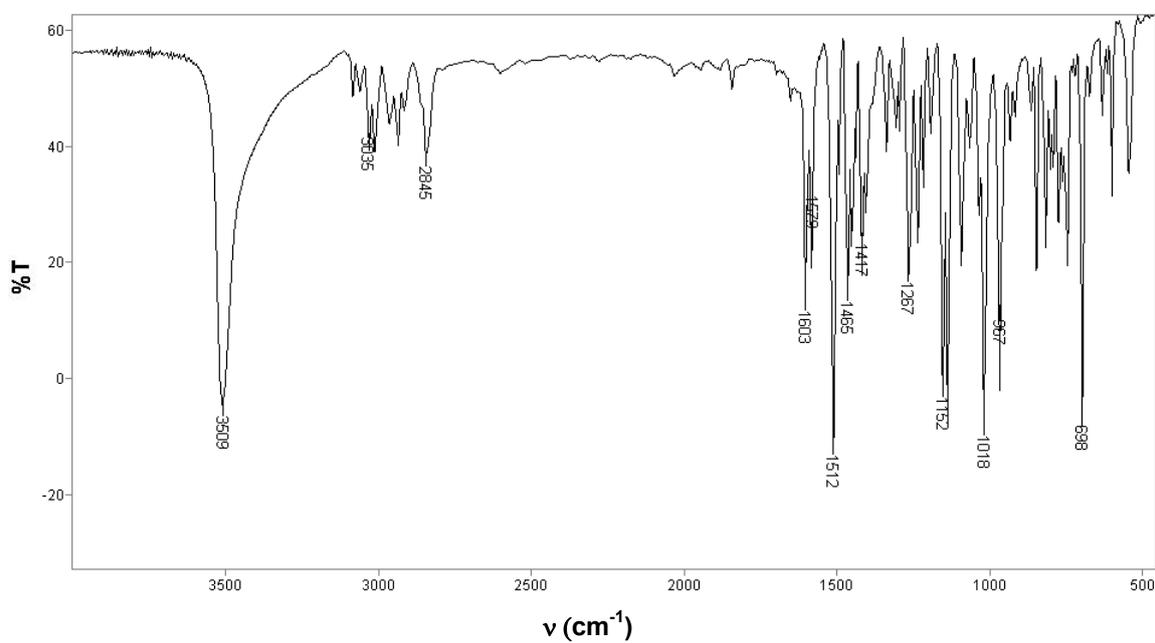


Figura 80- Espectro de IV do álcool 17c. [pastilha de KBr]

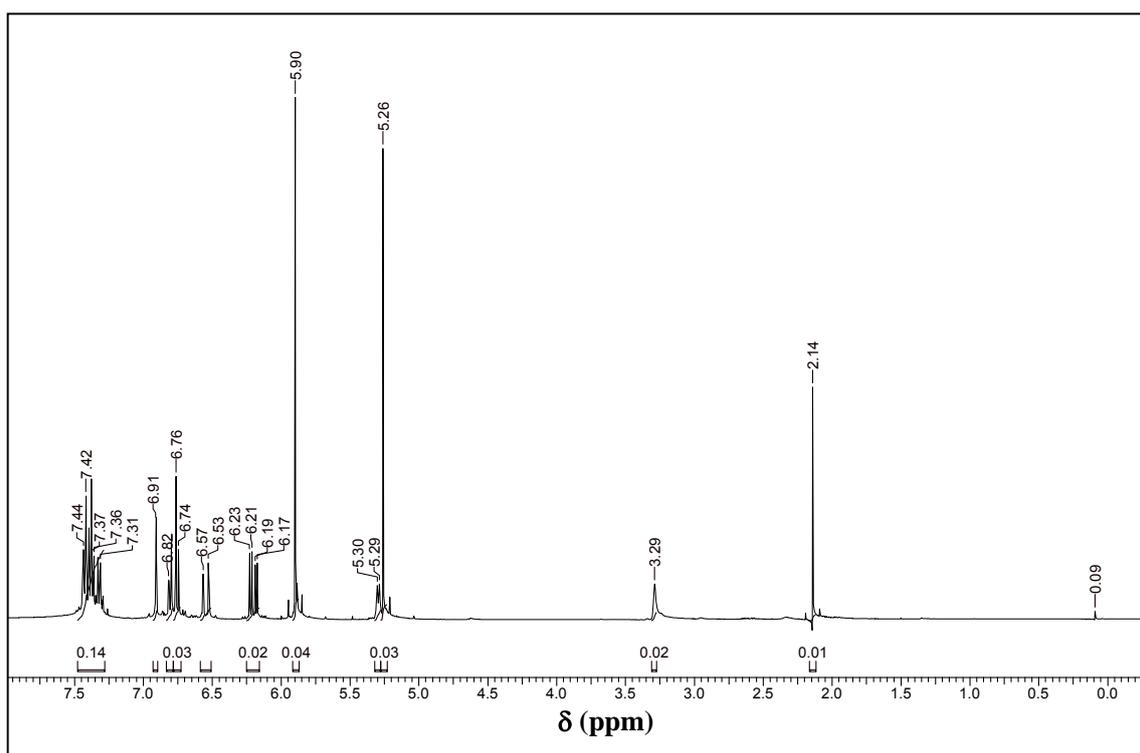


Figura 81- Espectro de RMN-¹H do álcool 17d. [CDCl₃, 400 MHz]

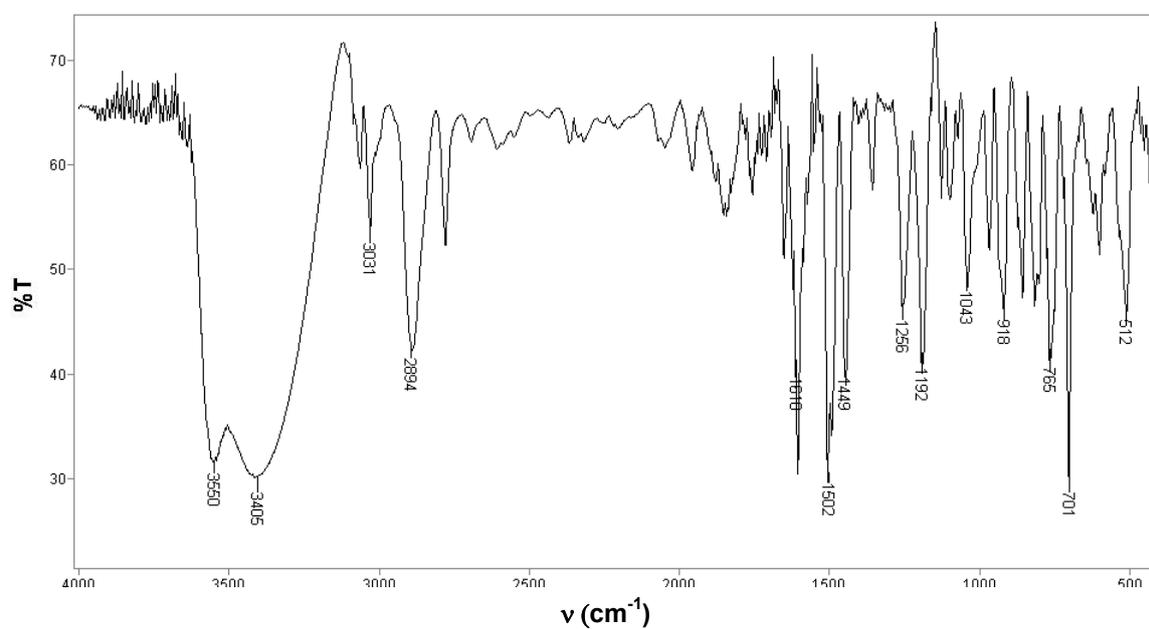


Figura 82- Espectro de IV do álcool 17d. [pastilha de KBr]

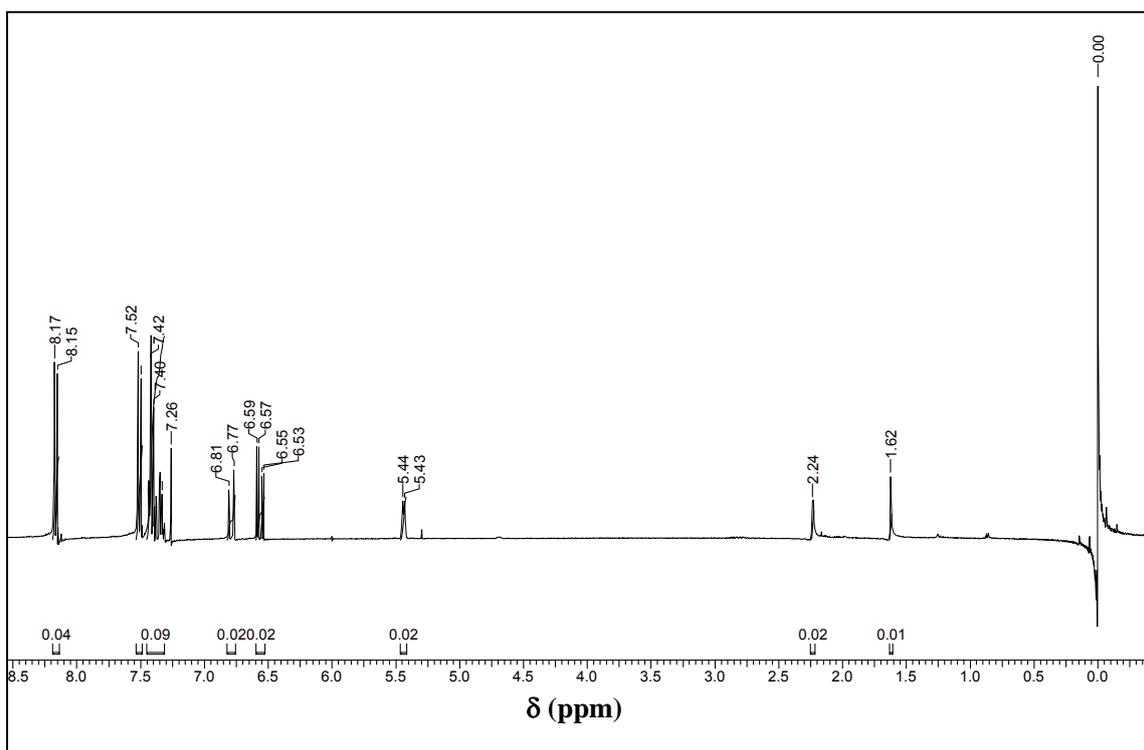


Figura 83- Espectro de RMN-¹H do álcool 17e. [CDCl₃, 400 MHz]

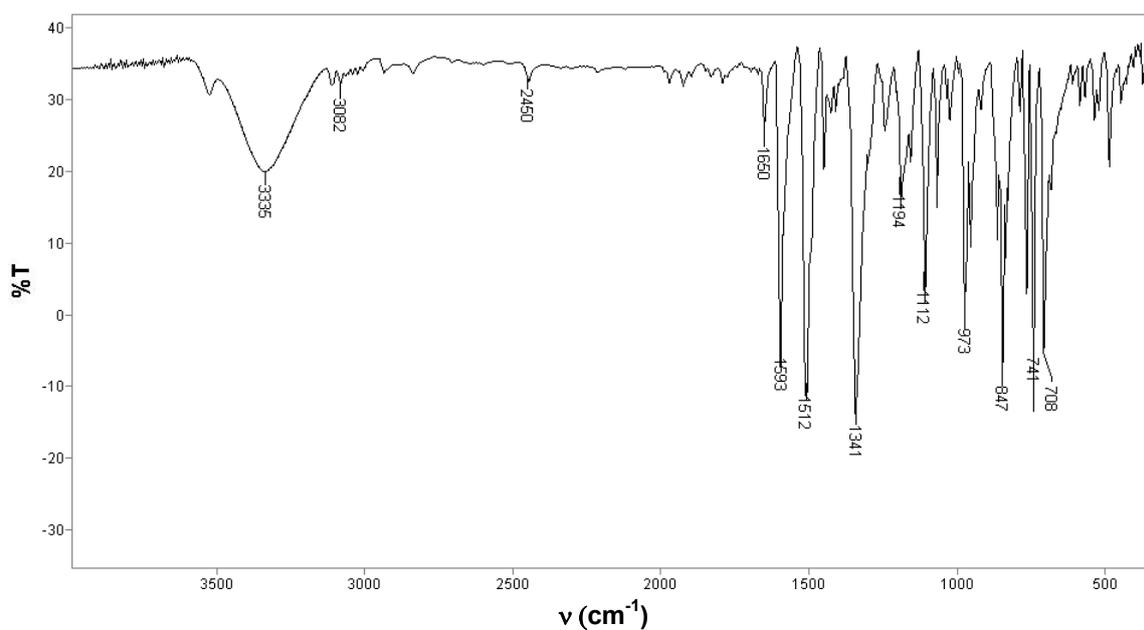


Figura 84- Espectro de IV do álcool 17e. [pastilha de KBr]

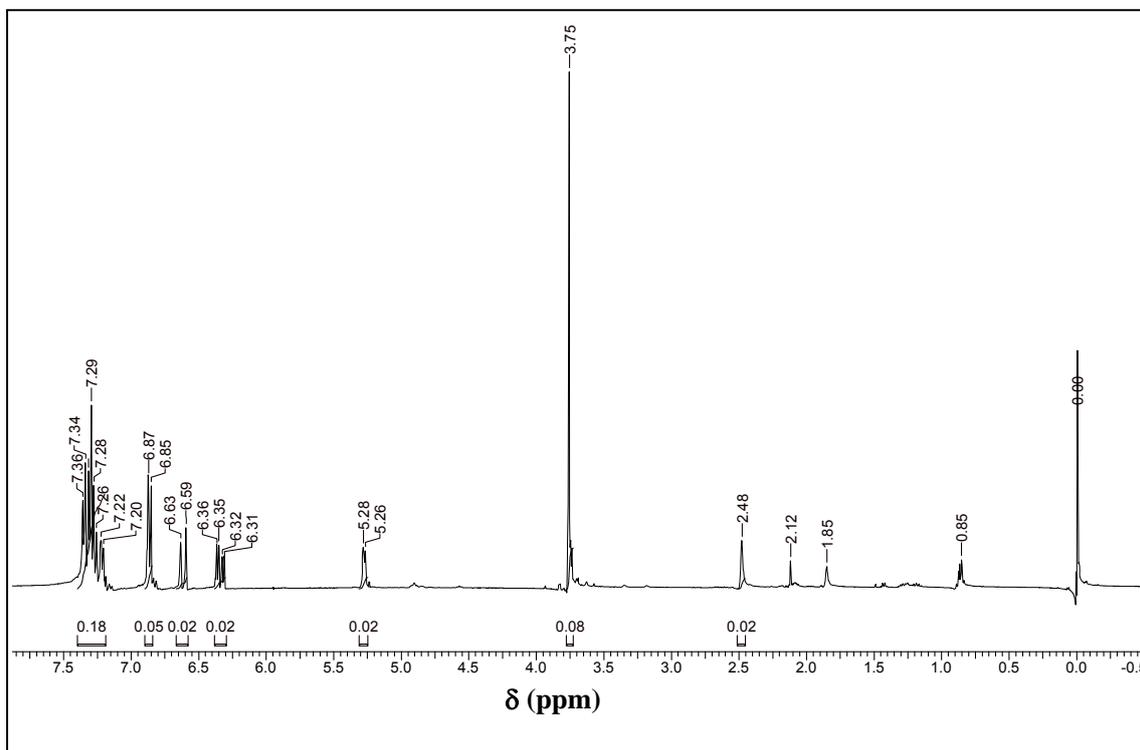


Figura 85- Espectro de RMN-¹H do álcool **17f**. [CDCl₃, 400 MHz]

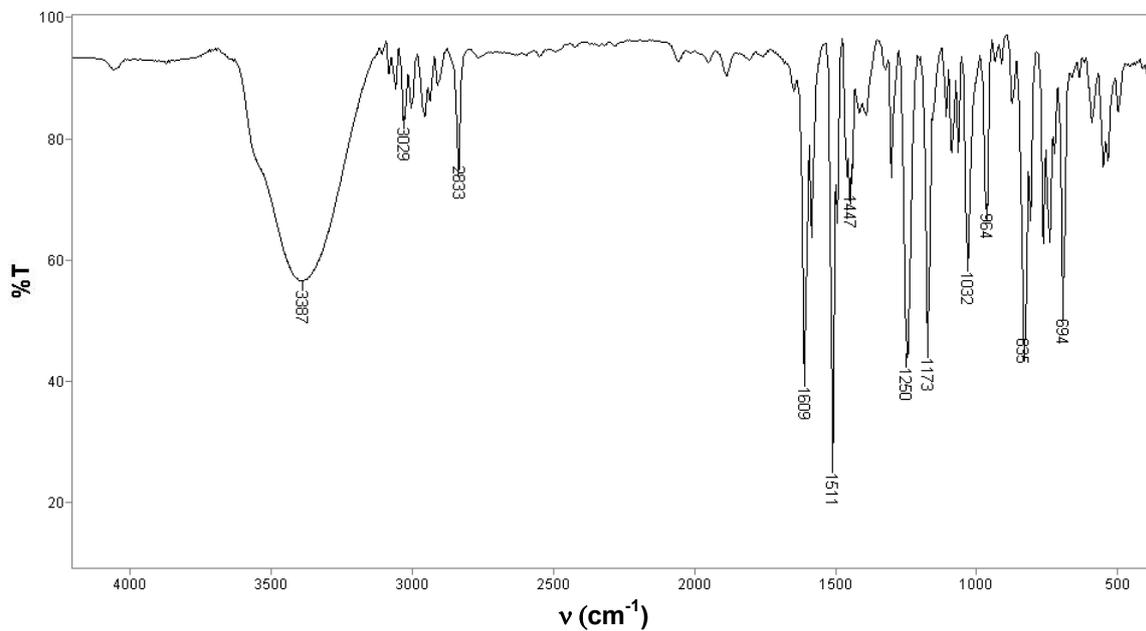


Figura 86- Espectro de IV do álcool **17f**. [pastilha de KBr]

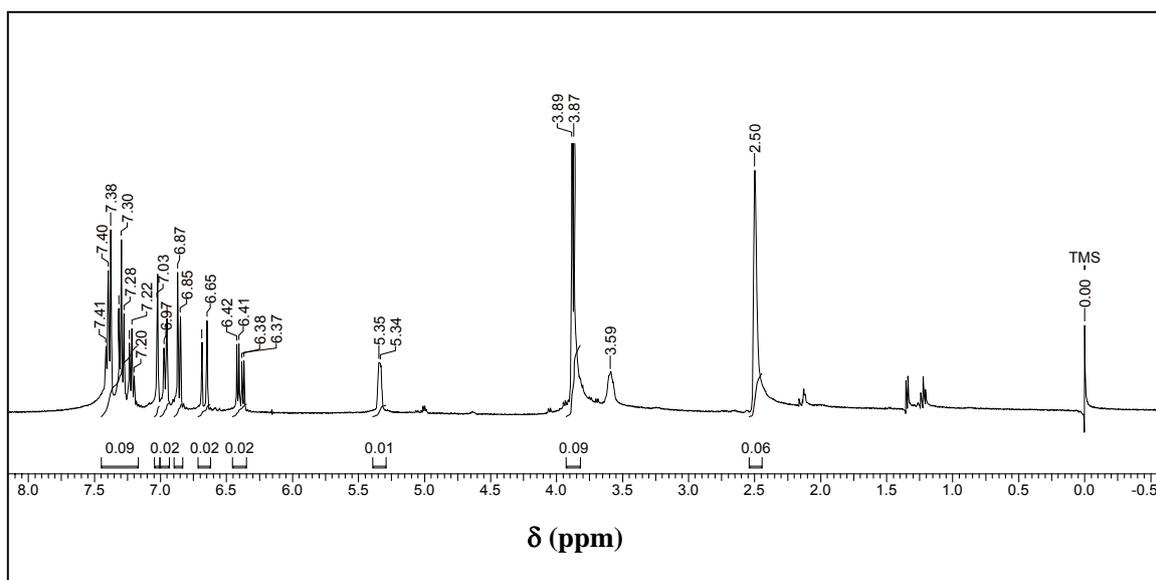


Figura 87- Espectro de RMN-¹H do álcool **17g**. [CDCl₃, 400 MHz]

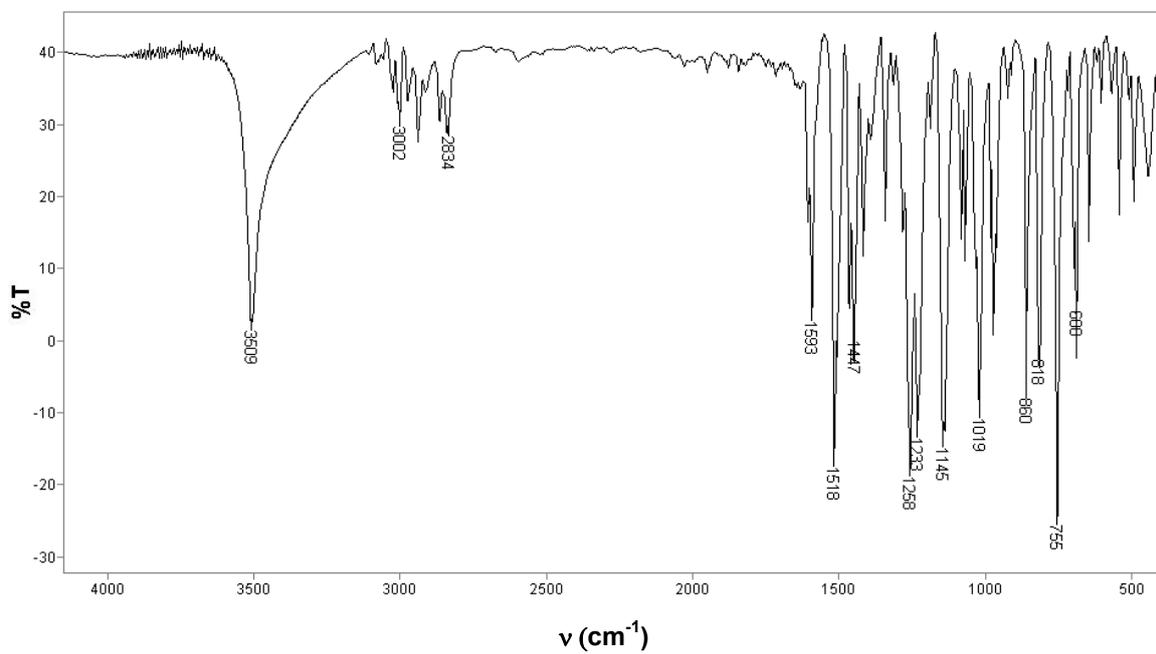


Figura 88- Espectro de IV do álcool **17g**. [pastilha de KBr]

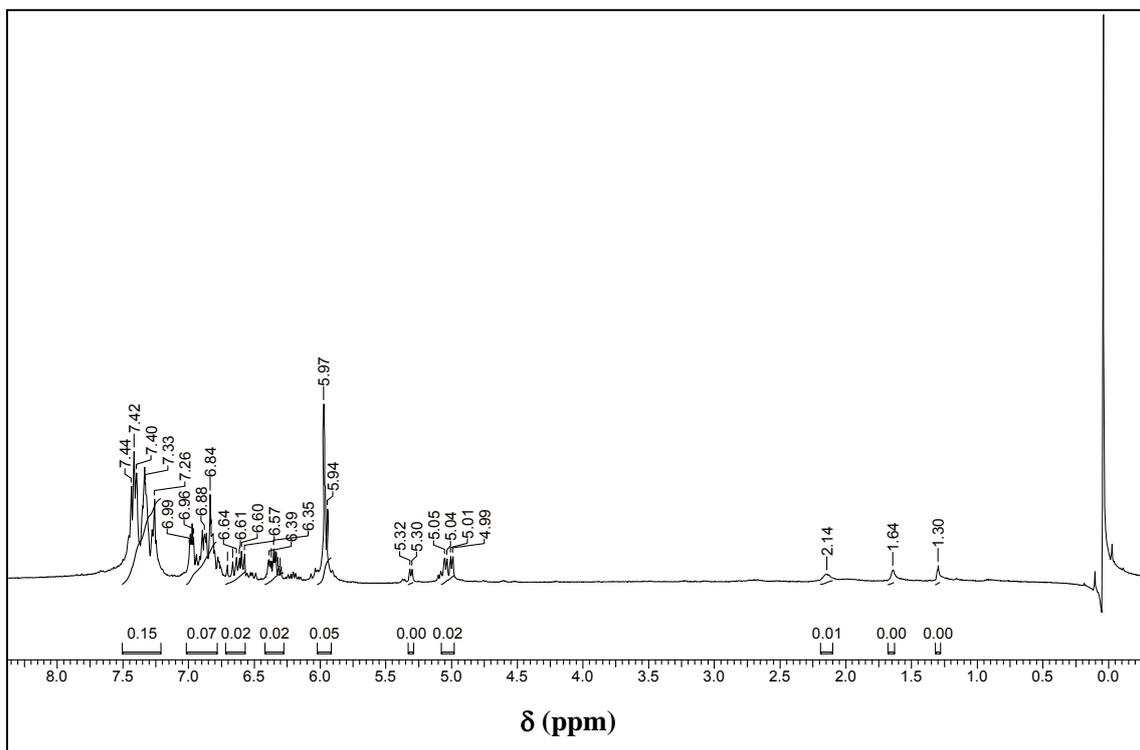


Figura 89- Espectro de RMN-¹H do álcool 17h. [CDCl₃, 400 MHz]

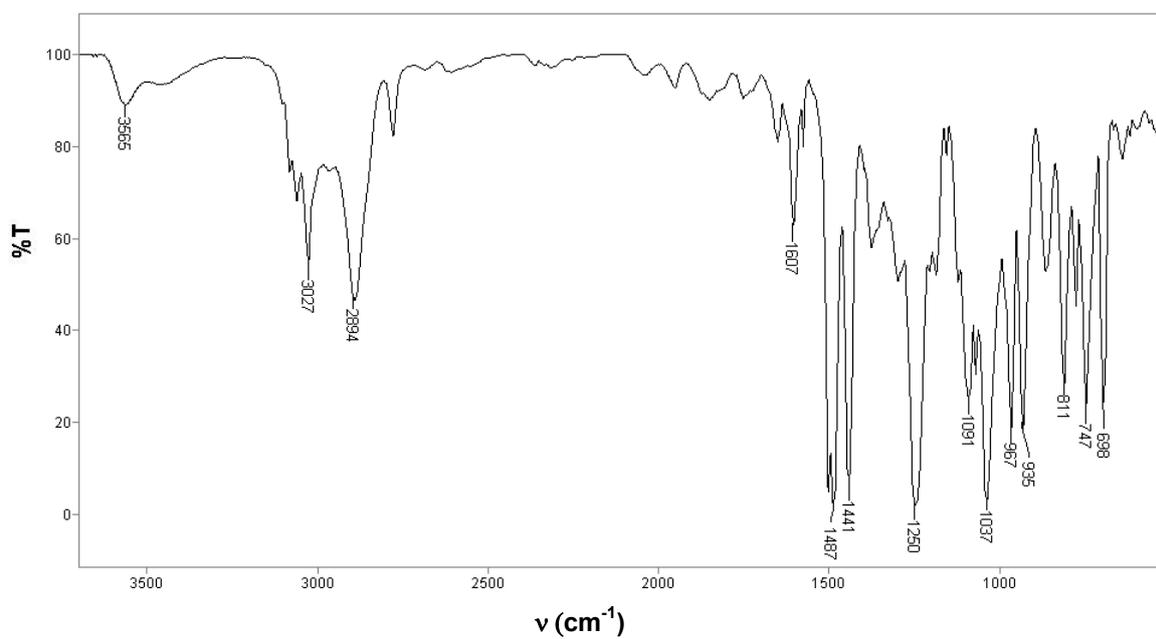


Figura 90- Espectro de IV do álcool 17h. [pastilha de KBr]

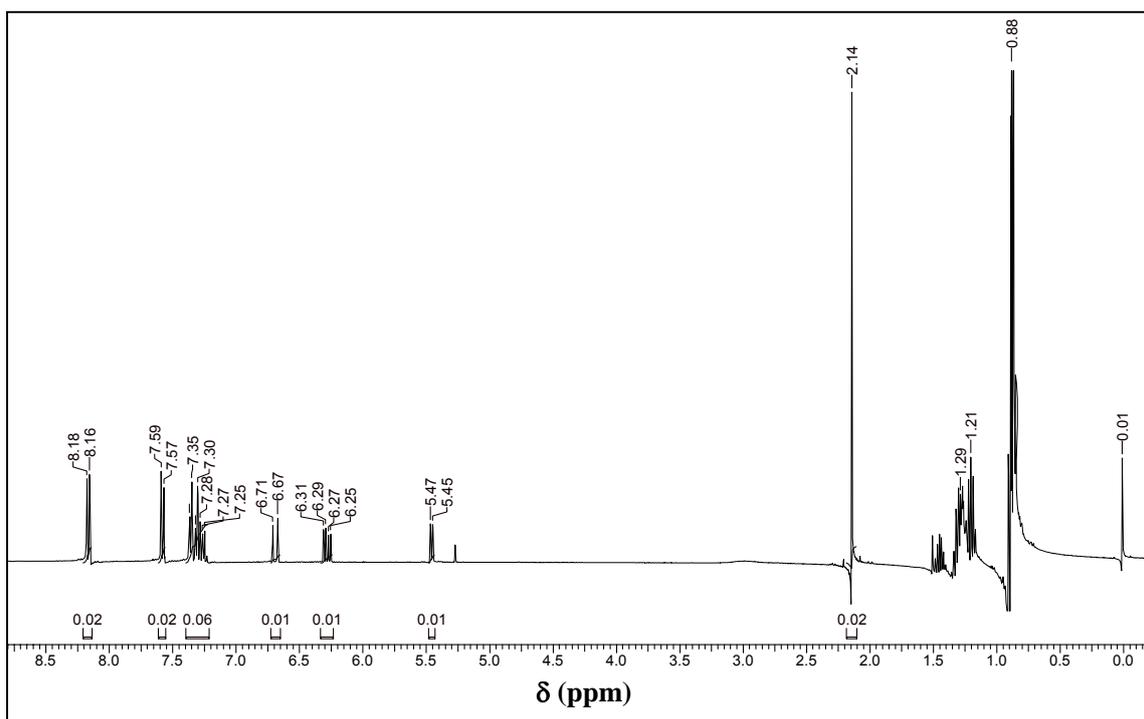


Figura 91- Espectro de RMN-¹H do álcool 17i. [CDCl₃, 400 MHz]

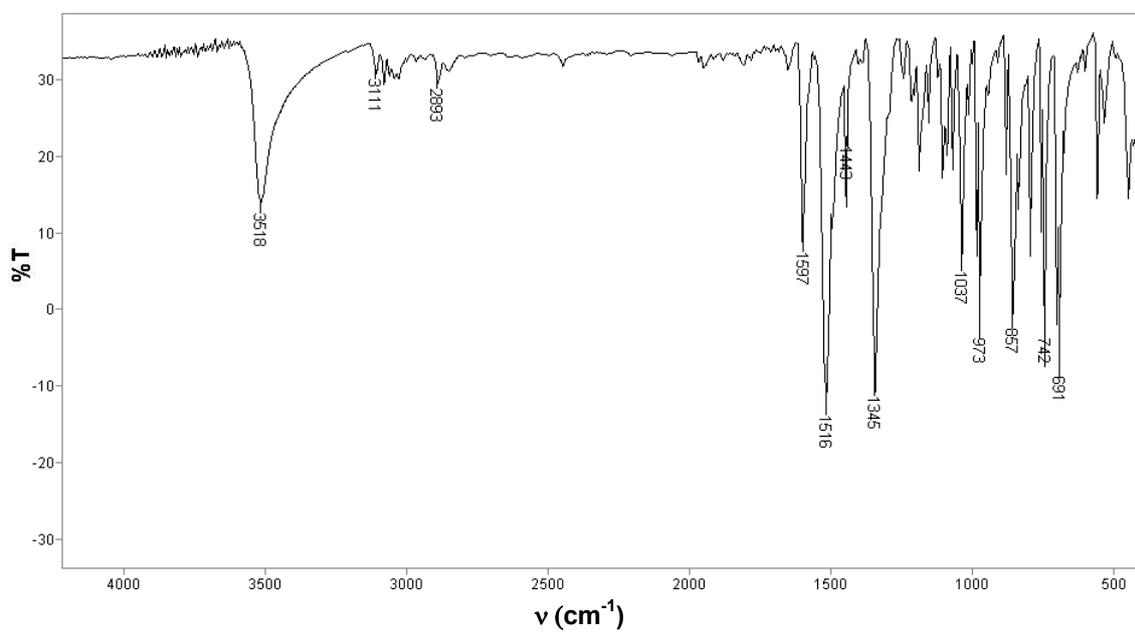


Figura 92- Espectro de IV do álcool 17i. [pastilha de KBr]

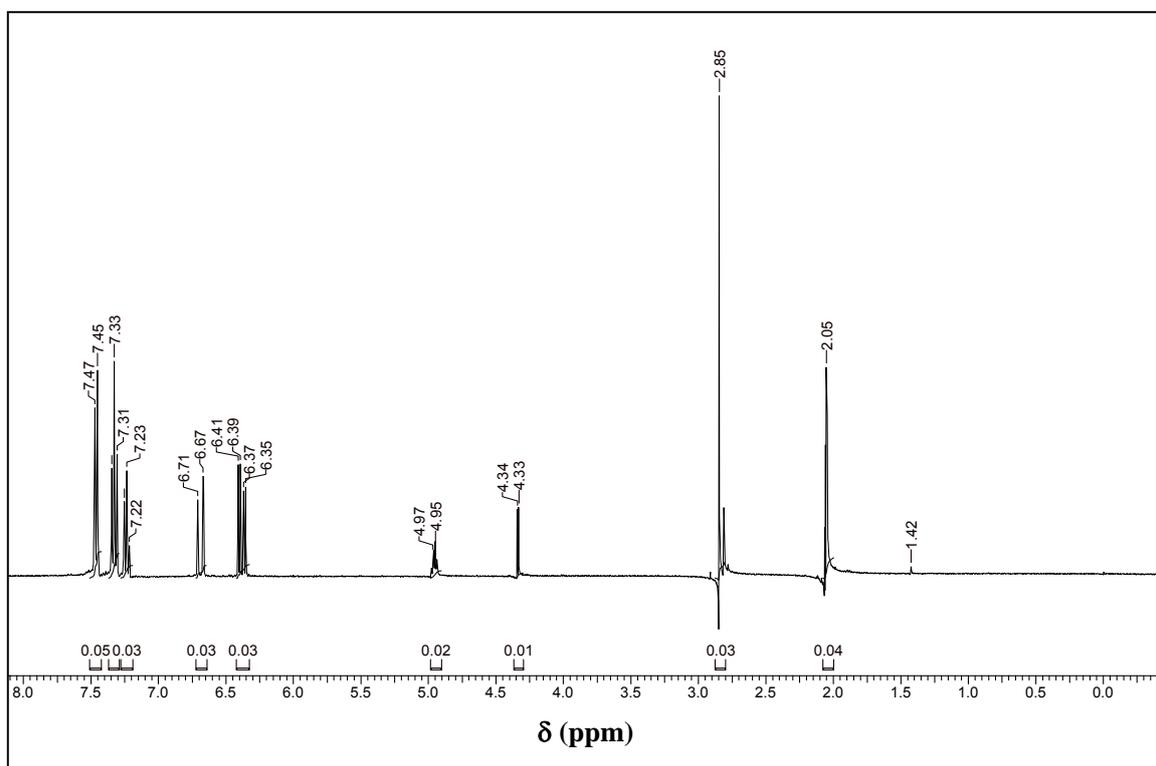


Figura 93- Espectro de RMN-¹H do álcool 18. [CDCl₃, 400 MHz]

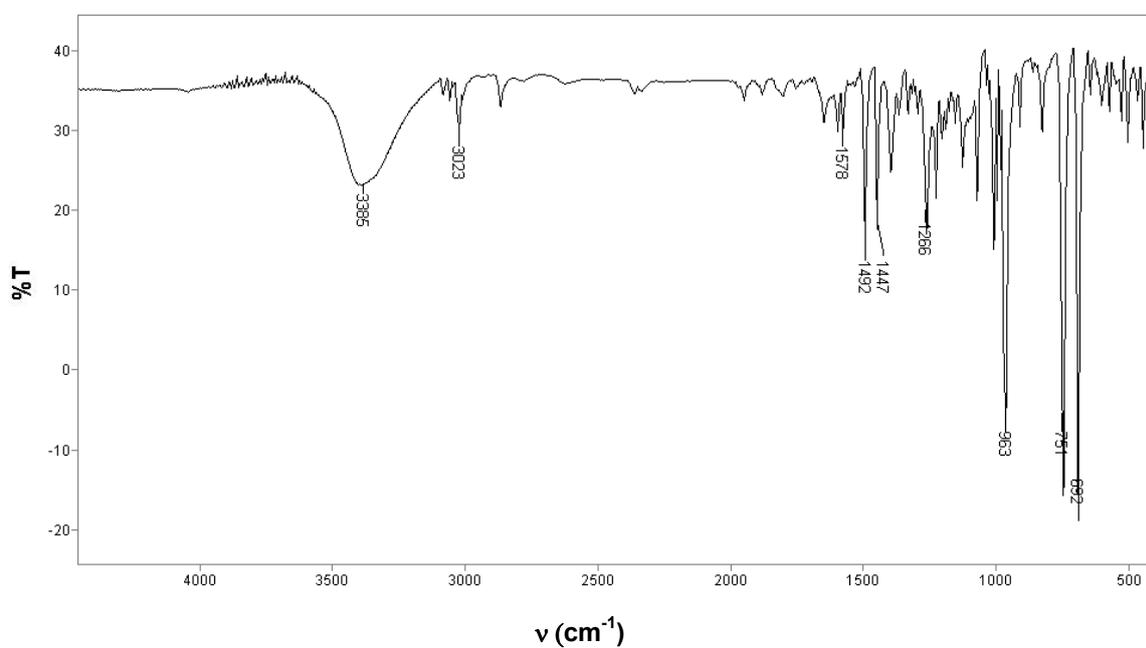


Figura 94- Espectro de IV do álcool 18. [pastilha de KBr]

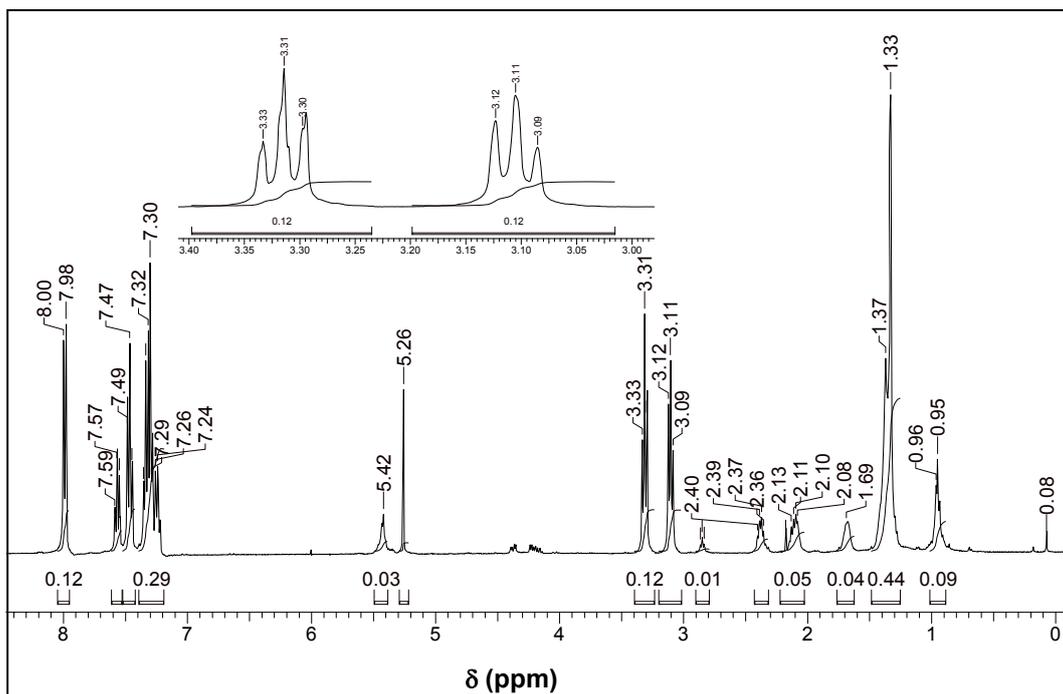


Figura 95- Espectro de RMN-¹H da dehidrochalcona **19a**. [CDCl₃, 400 MHz]

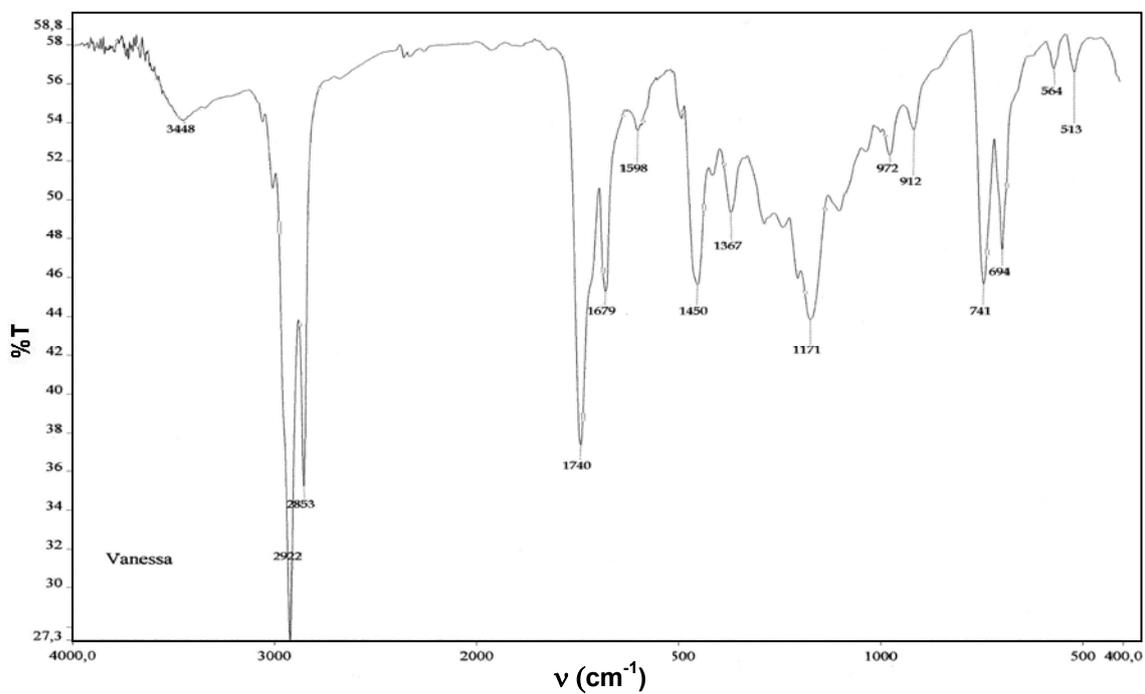


Figura 96- Espectro de IV da dehidrochalcona **19a**. [pastilha de KBr]

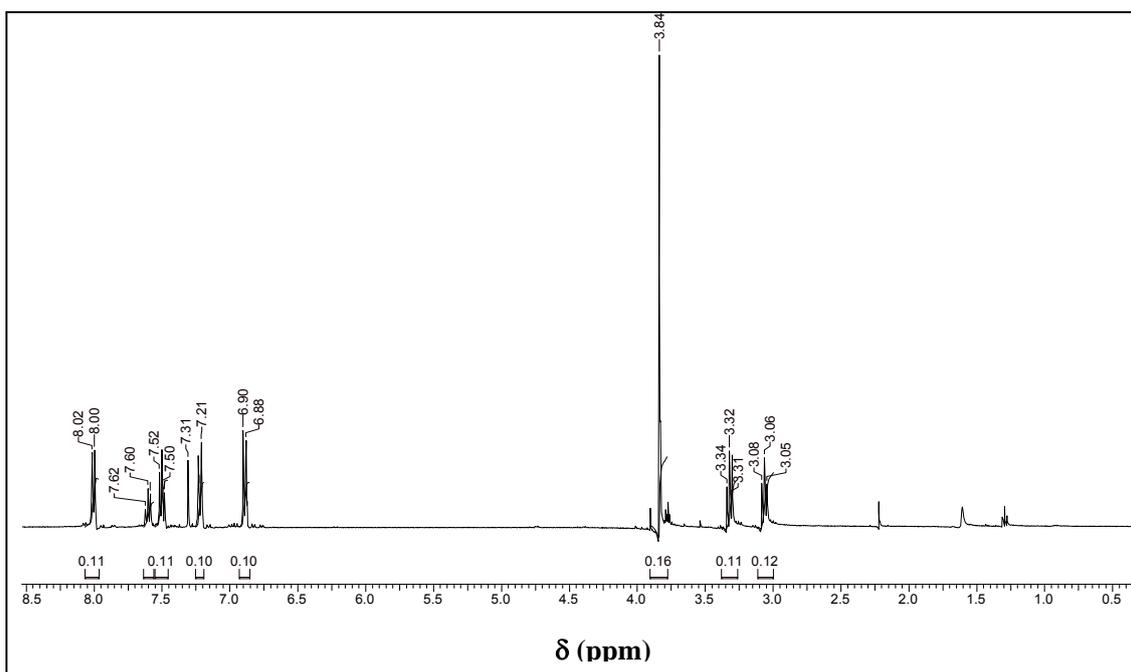


Figura 97- Espectro de RMN-¹H de uma alíquota da biotransformação de **15b**. [CDCl₃, 400 MHz]

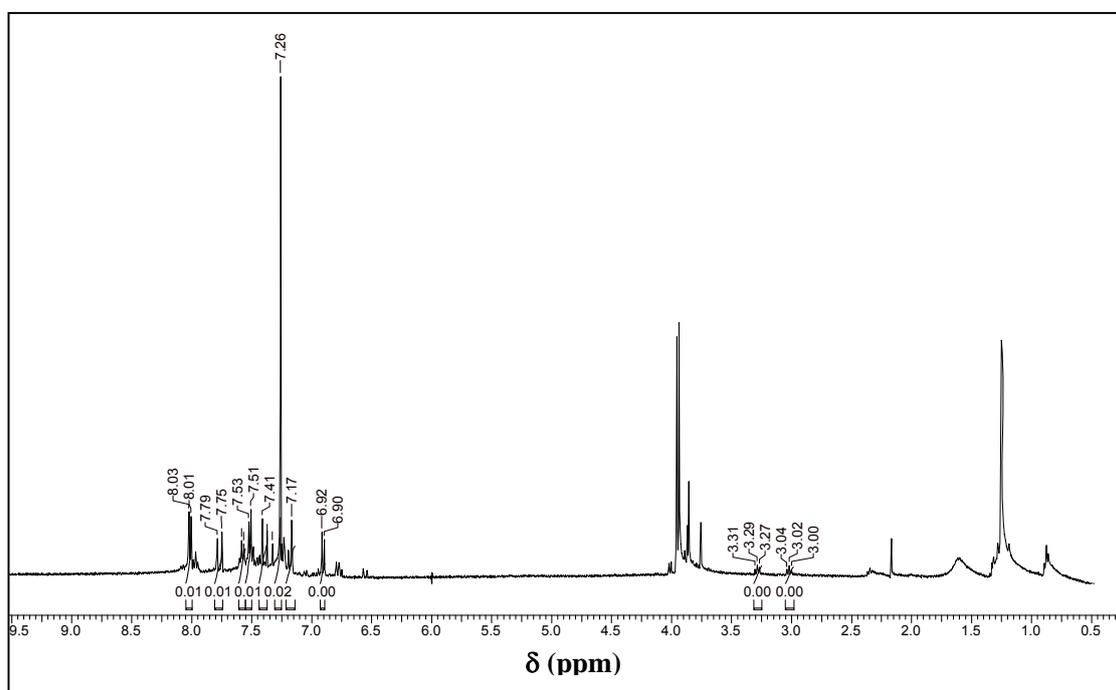


Figura 98- Espectro de RMN-¹H de uma alíquota da biotransformação de **15c**. [CDCl₃, 400 MHz]

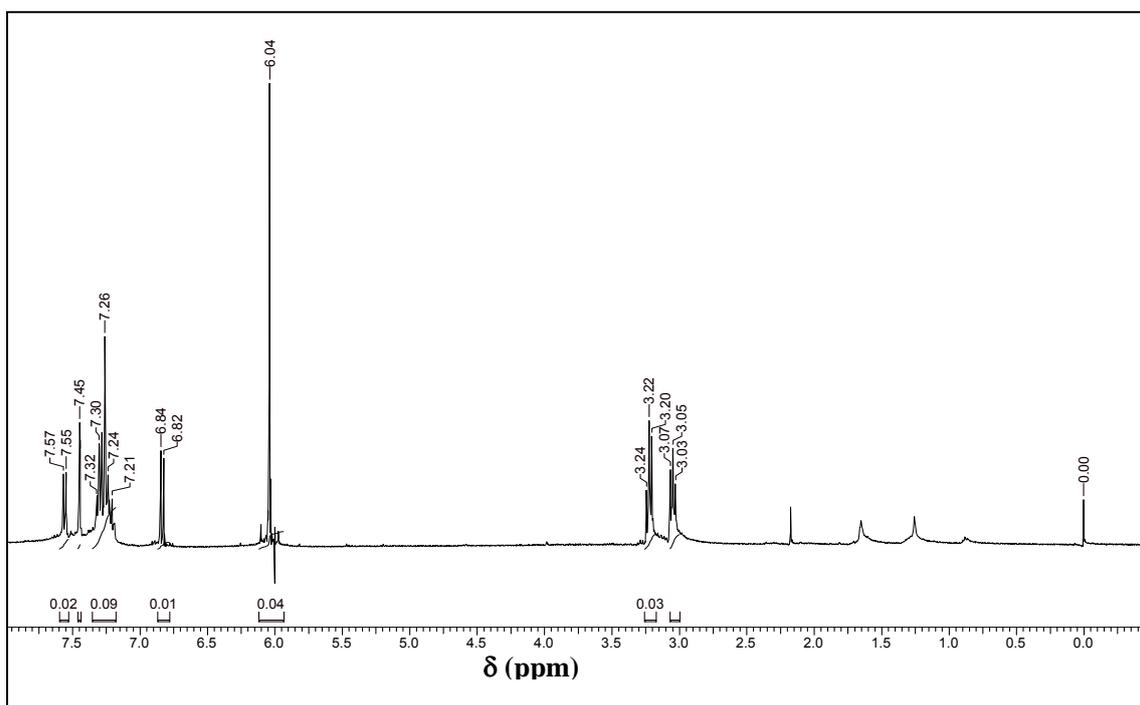


Figura 99- Espectro de RMN-¹H da de uma alíquota da biotransformação de **15d**. [CDCl₃, 400 MHz]

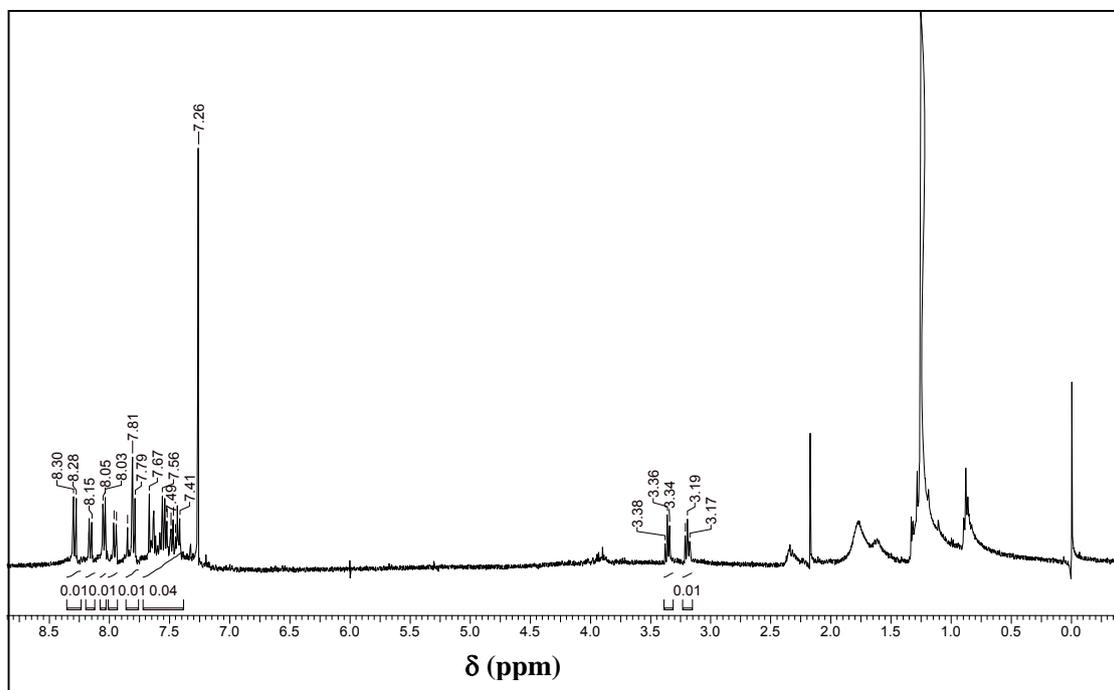


Figura 100- Espectro de RMN-¹H de uma alíquota da biotransformação de **15e**. [CDCl₃, 400 MHz]

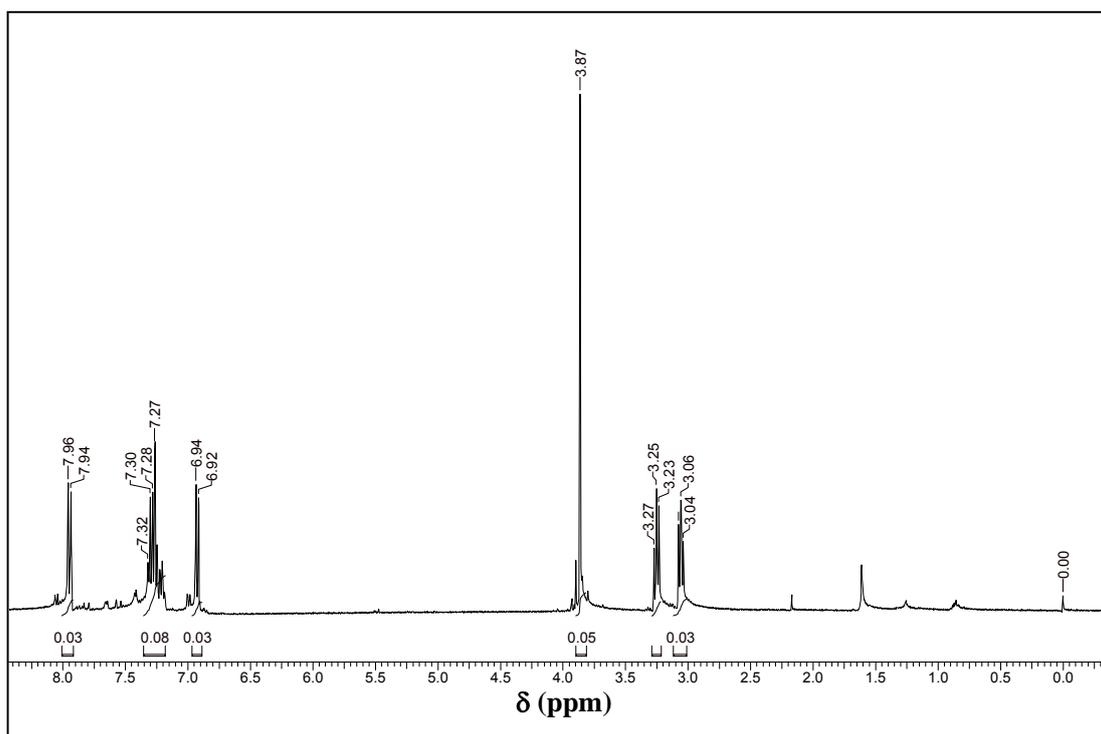


Figura 101- Espectro de RMN-¹H de uma alíquota da biotransformação de **15f**. [CDCl₃, 400 MHz]

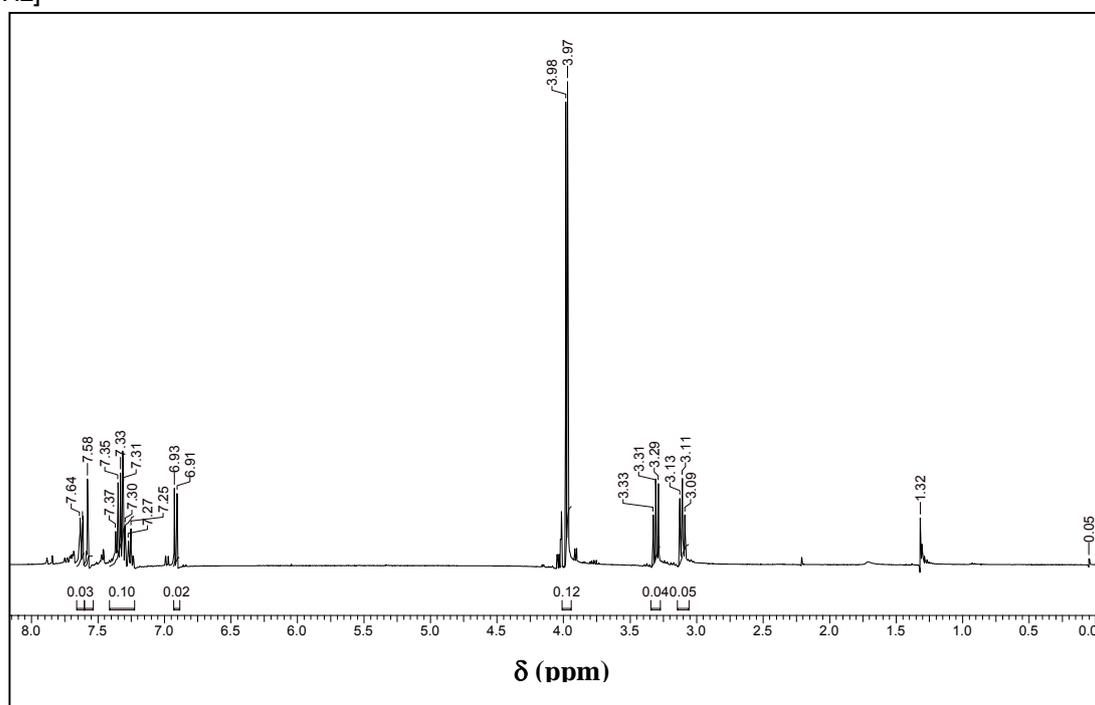


Figura 102- Espectro de RMN-¹H de uma alíquota da biotransformação de **15g**. [CDCl₃, 400 MHz]

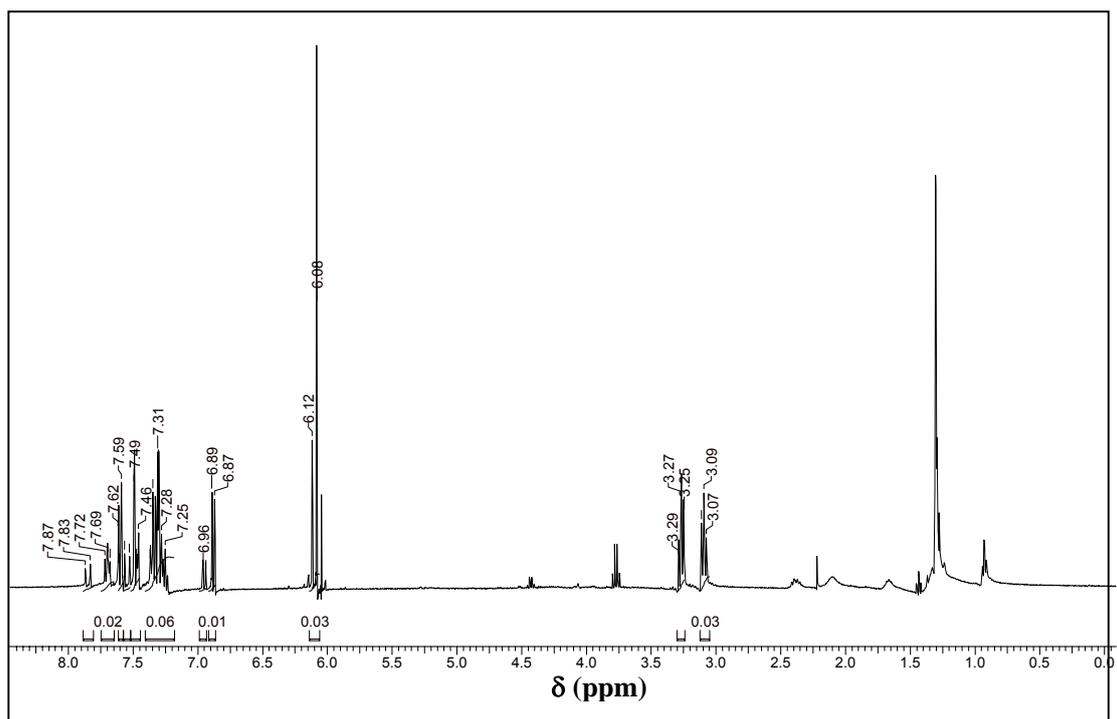


Figura 103- Espectro de RMN-¹H de uma alíquota da biotransformação de **15h**. [CDCl₃, 400 MHz]

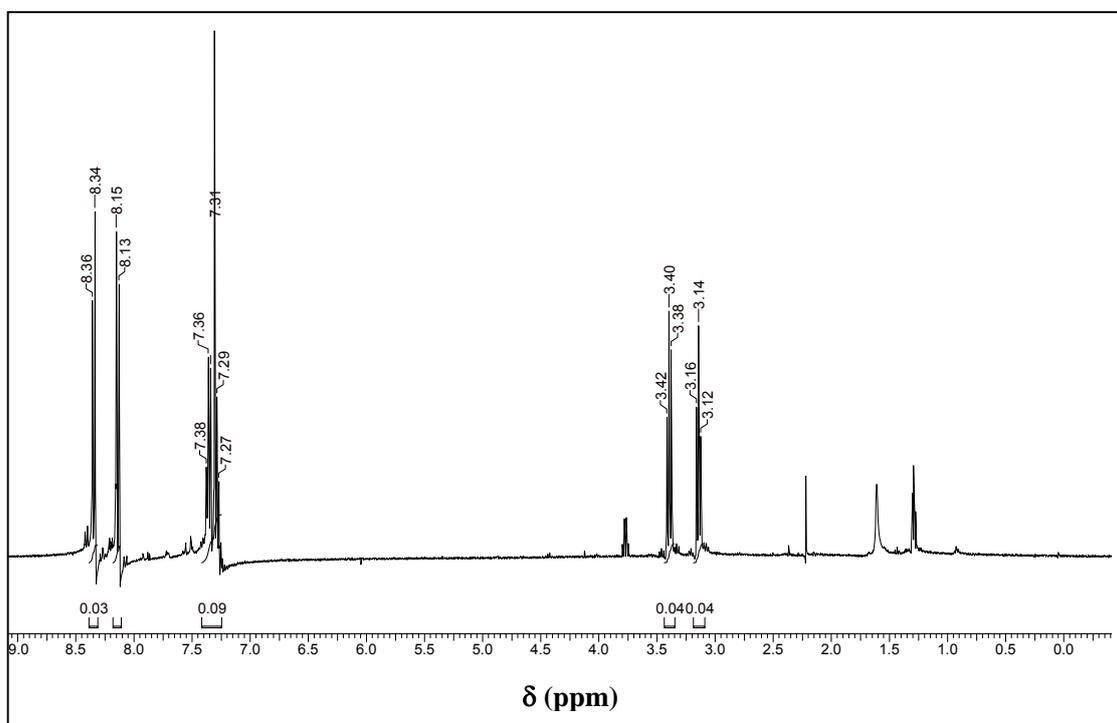


Figura 104- Espectro de RMN-¹H de uma alíquota da biotransformação de **15i**. [CDCl₃, 400 MHz]

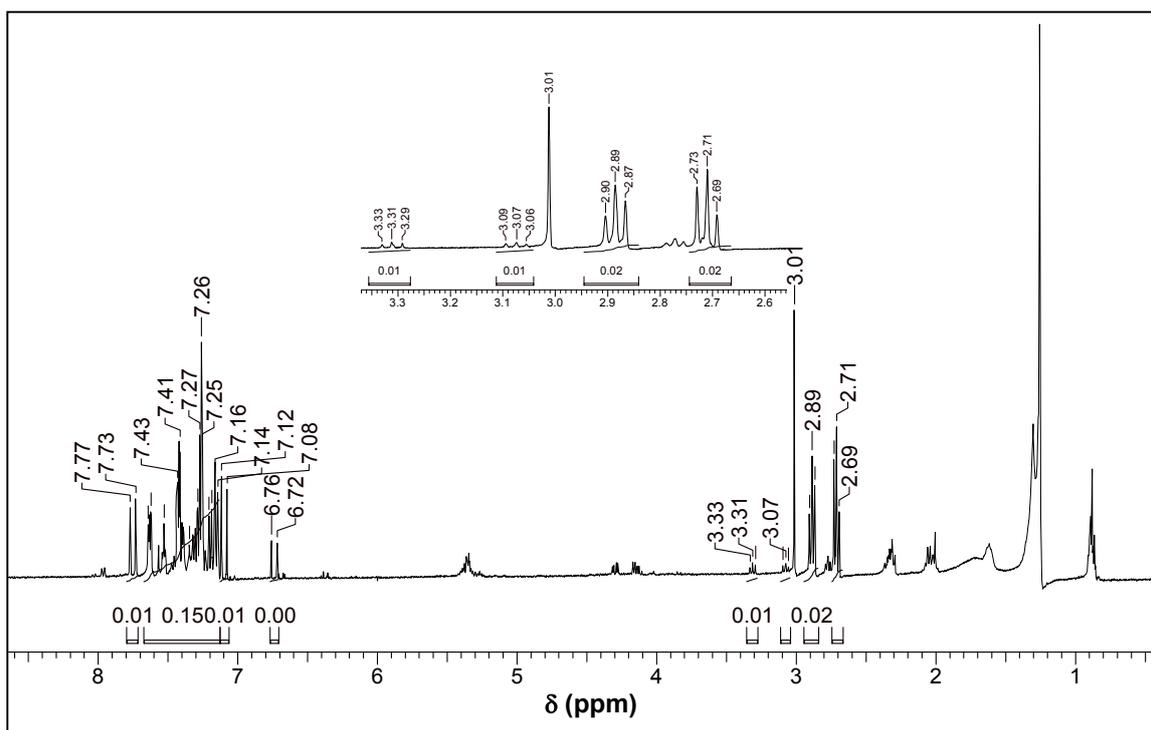


Figura 105- Espectro de RMN- ^1H de uma alíquota da biotransformação de **16**. [CDCl_3 , 400 MHz]