



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DANIELE ALVES FERREIRA

REAÇÕES BIOCATALÍTICAS USANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *LENS*
***CULINARIS* (LENTILHA)**

FORTALEZA
2012

DANIELE ALVES FERREIRA

REAÇÕES BIOCATALÍTICAS USANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *LENS*
CULINARIS (LENTILHA)

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Química do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte

Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Física

F44r Ferreira, Daniele Alves.

Reações Biocatalíticas Usando Células Íntegras de LENS CULINARIS (Lentilha) / Daniele Alves Ferreira. – Fortaleza, 2012.

144 f.: il., enc.; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.

1. Lens culinaris. 2. Biorredução. 3. Enzimas. I. Título.

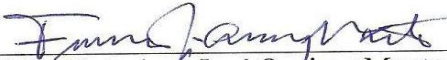
CDD 631.521

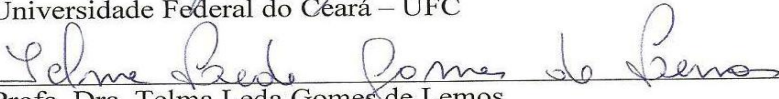
Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

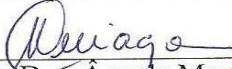

Daniele Alves Ferreira


TESE APROVADA EM: 23/10/2012

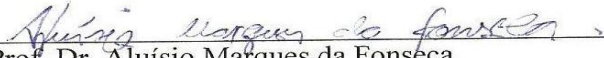
EXAMINADORES:


Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profa. Dra. Angela Martha Campos Arriaga
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese
Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS


Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e oportunidade de concluir mais uma etapa.

Aos meus Pais (Dulcineia e Antônio) e meus irmãos (maternos e paternos), Patrícia, Ricardo, Neta, Panty, Clarisse e Toni, pelo apoio e motivação. Principalmente à minha mãe que se sacrificou por seus filhos incentivando-os a estudar e com a certeza de dever cumprido, pela dedicação, pelo apoio, pela atenção, carinho e principalmente, por todos os ensinamentos sempre coerentes e indispensáveis, fornecidos durante toda a minha vida.

Ao meu noivo, Paulo Ernesto, pelo seu carinho, companheirismo, incentivo e atenção. E sua família, em especial aos meus sogros, Ana Maria e Ernando que colaboraram na minha tese.

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte, por toda sua atenção, pela amizade, dedicação, sugestões e conhecimentos valiosos que transmitiu e me ajudaram para o aprimoramento desta tese.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Química Orgânica. Aos meus colegas de bancada - LAFIPLAM II, LBPN, LABS e aos meus colegas da Pós-Graduação: Karen, Tassio, Eduardo, Ivan, Pedro Hermano, Leila, Reinaldo, Juliana, Felipe, Luciana Bertini, Leonardo Alcântara e Izabel.

Aos funcionários do departamento, principalmente a Mundinha, Lana, Sr. Paulo e Célia.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Química.

À CAPES pela bolsa concedida, CNPq e FUNCAP pelo suporte financeiro que viabilizou este trabalho.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na conclusão deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Soro Albumina Bovina
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
CENAUREM	Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CH_2Cl_2	Diclorometano
CHCl_3	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMAP	Dimetil-aminopiridíneo
ee	Excesso enantiomérico
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
LC	<i>Lens culinaris</i>
MeOH	Metanol
NADH/NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP/NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Fosfato
Na_2SO_4	Sulfato de sódio
NaHCO_3	Carbonato de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotações por minuto

THF	Tetrahidrofurano
tr	Tempo de retenção
UV-Vís	Ultra-violeta e no Visível
δ	Deslocamento Químico
$[\alpha]_D^T$	Rotação específica
Φ	Diâmetro

RESUMO

Este trabalho relata a utilização das sementes de lentilha (*Lens culinaris*) como sistema íntegro de planta em reações biocatalíticas de redução e hidrólise. Inicialmente, algumas fontes vegetais foram avaliadas quanto sua ação biocatalítica na redução da cetona aromática acetofenona. Os vegetais que revelaram resultados positivos na reação de redução foram submetidos à determinação do seu teor de proteínas através dos métodos de Lowry e Bradford. *Lens culinaris* foi a espécie vegetal que revelou atividade biocatalítica mais relevante, em acordo com seu alto teor de proteína (1,33 mg/mL e 1,07 mg/mL, segundo os métodos de Bradford e Lowry, respectivamente), e assim, foi o vegetal selecionado para estudos mais aprofundados. Posteriormente, utilizando sempre a acetofenona como substrato modelo foram otimizados os parâmetros reacionais: concentração do biocatalisador; cinética de reação; velocidade de agitação e meio reacional. Após seleção desses parâmetros, as reações de biorredução foram estendidas a outros derivados pró-quirais da acetofenona, onde foram observadas bioconversões com rendimentos e excessos enantioméricos (ee) que variaram de baixas a elevadas porcentagens. De modo geral, foram observadas influências eletrônica e estérica devidas ao tipo e a posição relativa dos diferentes substituintes nos compostos aromáticos. No caso de substratos contendo dois grupos funcionais diferentes suscetíveis de redução, foi observada baixa quimiosseletividade. Foram investigados também outros compostos carbonílicos, como: cetonas alifáticas e aromáticas, aldeídos aromáticos e nitrocompostos aromáticos. Em adição foi investigado a possibilidade de ação hidrolítica a partir de compostos pertencente às funções ésteres, amidas e nitrilas. Os rendimentos das reações foram calculados utilizando Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H). Os excessos enantioméricos (ee) foram determinados através de Cromatografia Líquido de Alta Eficiência (CLAE) equipada com colunas quirais.

Palavras-chave: *Lens culinaris*, biorredução, enzimas, acetofenona.

ABSTRACT

This paper describes the use of seeds of lentil (*Lens culinaris*) as intact plant system in biocatalytic reactions of reduction and hydrolysis. Initially, some plant sources were evaluated for their action in the biocatalytic reduction of aromatic ketone acetophenone. The plants that showed positive results in the reduction reaction underwent determination of their protein content by the methods of Lowry and Bradford. *Lens culinaris* was plant species revealed that most relevant biocatalytic activity, in agreement with their high protein content (1.33 mg / mL and 1.07 mg / mL according to Bradford and Lowry methods, respectively), and thus The plant was selected for further study. Subsequently, always using the model substrate acetophenone as the reaction parameters were optimized: concentration of biocatalyst; reaction kinetics; stirring speed the reaction medium. After selecting these parameters, the bioreduction reactions were extended to other derivatives of prochiral acetophenone, which were observed with bioconversions yields and enantiomeric excess (*ee*) ranging from low to high percentages. Generally, were observed steric and electronic influences due to the type and relative position of the various substituents on aromatic compounds. In the case of substrates containing two different functional groups susceptible to reduction, low chemoselectivity observed. Investigated also other carbonyl compounds such as aliphatic and aromatic ketones, aromatic aldehydes and aromatic nitro compounds. In addition investigated the possibility that hydrolytic action from compounds belonging functions esters, amides and nitriles. The yields of the reactions were calculated using Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS) and Nuclear Magnetic Resonance Hydrogen (^1H NMR). The enantiomeric excess (*ee*) were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipped with chiral columns.

Keywords: *Lens culinaris*, bioreduction, enzymes, acetophenone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de produtos farmacêuticos.....	3
Figura 2 – Fotografia das sementes de <i>Lens culinaris</i>	4
Figura 3 – Constituintes químicos isolados de doze cultivares de lentilha.....	6
Figura 4 – Diagrama de energia de reação catalisada e não catalisada por enzima.	13
Figura 5 – Representação do modelo chave-fechadura.	14
Figura 6 – Representação do modelo do encaixe induzido.	15
Figura 7 – Representação do modelo dos três pontos.....	16
Figura 8 – Biorredução de compostos carbonílicos de acordo a regra de Prelog.	16
Figura 9 – Dois álcoois usados na síntese de Montelukast e Ácido retinóico.....	17
Figura 10 – Setores da indústria que mais utilizam processos enzimáticos.	22
Figura 11 – Redução quimiosseletiva do benzoilacetato de etila por <i>S. cerevisiae</i>	22
Figura 12 – Alguns álcoois quirais obtidos por biorredução usados na síntese de fármacos.	26
Figura 13 - Biorredução dos nitrofenóis.....	29
Figura 14 – Quimiosseletividade de (E)-3-fenilprop-2-enal.....	31
Figura 15 – Regiosseletividade de 5 α -androstan-3,17-diona.....	32
Figura 16 – Enantiosseletividade de acetofenona usando água de coco.....	32
Figura 17 – Fotografia dos vegetais usados na biorredução.....	36
Figura 18 – Esquema reacional de biorredução da acetofenona (1).	36
Figura 19 – Cromatograma CG-EM da biorredução da acetofenona (1) usando LC.	37
Figura 20 – Espectro de massa do feniletan-1-ol (1a), tr: 3,88 min.	37
Figura 21 – Espectro de massa do acetofenona (1), tr: 4,01min.....	37
Figura 22 – Cromatograma CLAE da biorredução da acetofenona (1) usando LC.	
Figura 23 – Fotografia dos extratos vegetais usados na determinação de proteínas.	40
Figura 24 – Otimização de quantidade de biocatalisador (LC).....	42

Figura 25 – Otimização da cinética da reação de 12 à 96 horas.	43
Figura 26 – Otimização da velocidade de agitação.	44
Figura 27 – Otimização do meio reacional em diferentes valores de pH's.	45
Figura 28 – Cromatograma obtido por GC-EM do produto da biorredução da 2-bromoacetofenona (2) em pH 7.0 com LC.	49
Figura 29 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução da 2-bromoacetofenona (2) em pH 7.0 com LC.	49
Figura 30 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução da 3-bromoacetofenona (3) em água destilada com LC.	50
Figura 31 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução da 3-bromoacetofenona (3) em água destilada com LC.	50
Figura 32 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução de 4-bromoacetofenona (4) em água destilada com LC.	50
Figura 33 – Espectro de massas do 4-bromoacetofenona (4), tr: 6,94 min.	51
Figura 34 – Espectro de massas do 1-(4-bromofenil)-etanol (4a), tr: 7,25 min.	51
Figura 35 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução de 4-bromoacetofenona (4) em água destilada com LC.	51
Figura 36 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução da 4-cloroacetofenona (5) em pH 7.0 com LC.	52
Figura 37 – Espectro de massas do 4-cloroacetofenona (5), tr: 7,40 min.	52
Figura 38 – Espectro de massas do 4-clorofeniletanol (5a), tr: 8,02 min.	52
Figura 39 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução da 4-cloroacetofenona (5) em pH 7.0 com LC.	52
Figura 40 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 4-fluoracetofenona (6) em água destilada com LC.	53
Figura 41 – Espectro de massas do 4-fluoracetofenona (6a), tr: 3,96 min.	53
Figura 42 – Espectro de massas do 4-fluorfeniletanol (6a), tr: 4,22 min.	53
Figura 43 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução fluoracetofenona (6) em água destilada com LC.	53
Figura 44 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 2-nitroacetofenona (7) em água destilada com LC.	56

Figura 45 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução do 2-nitroacetofenona (7) em água destilada com LC.	56
Figura 46 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 3-nitroacetofenona (8) em água destilada com LC.	56
Figura 47 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução do 3-nitroacetofenona (8) em água destilada com LC.	57
Figura 48 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 4-nitroacetofenona (9) em água destilada com LC.	57
Figura 49 – Espectro de massas do 4-nitroacetofenona (9), tr: 11,85min.....	57
Figura 50 – Espectro de massas do 4-aminoacetofenona (9b), tr: 12,30 min.....	58
Figura 51 – Espectro de massas do 1-(4-nitrofenil)-etanol (9a), tr: 12,70 min.....	58
Figura 52 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução de 4-nitroacetofenona (9) em água destilada com LC.	58
Figura 53 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da biorredução em água destilada de 3-metoxiacetofenona (11).	61
Figura 54 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução de 3-metoxiacetofenona (11) em água destilada com LC.	62
Figura 55 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução de 4-metoxiacetofenona (12) em água destilada com LC.	62
Figura 56 – Espectro de massas do 1-(4-metoxifenil)-etanol (12a), tr: 9,41 min.	62
Figura 57 – Espectro de massas do 4-metoxiacetofenona (12), tr: 10,58 min.....	63
Figura 58 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução de 4-metoxiacetofenona (12) em água destilada com LC	63
Figura 59 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 2,5-dimetilfeniletanol (13) em água destilada com LC.	63
Figura 60 – Espectro de massas do 2,5-dimetilacetofenona (13), tr: 7,53 min.....	64
Figura 61 – Espectro de massas do 2,5-dimetilfeniletanol (13a), tr: 8,35 min.	64
Figura 62 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução de 2,5-dimetilfeniletanol (13) em água destilada com LC.	64
Figura 63 – Biorredução da α -tetralona com LC.....	65

Figura 64 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução da α -tetralona (17) em água destilada com LC.....	66
Figura 65 – Espectro de massas do α -tetralol (17a), tr: 13,09 min.....	66
Figura 66 – Espectro de massas da α -tetralona (17), tr: 13,32 min.....	66
Figura 67 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução da α -tetralona (17) em água destilada com LC.....	67
Figura 68 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do Benzofenona (18).....	68
Figura 69 – Biorredução de cetonas simétricas com seus respectivos rendimentos.	69
Figura 70 – Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da ciclopentanona (19).....	69
Figura 71 – Espectro de massa do ciclopentanol (19), tr: 3,97 min.	69
Figura 72 – Espectro de massa do ciclopentanona (19), tr: 4,12 min.....	70
Figura 73 – Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da ciclo-hexanona (20).....	70
Figura 74 – Espectro de massa do ciclo-hexanol (20a), tr: 5,46 min.	70
Figura 75 – Espectro de massa da ciclo-hexanona (20), tr: 5,54 min.....	70
Figura 76 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução da benzaldeído (21) com LC.....	72
Figura 77 – Espectro de massas do álcool benzílico (21a), tr: 7,93 min.	72
Figura 78 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução da 4-metoxibenzaldeído (22) com LC.....	72
Figura 79 – Espectro de massas do 4-metoxifenilmetanol (22a), tr: 6,36min.	72
Figura 80 – Espectro de massas do ácido 4-metoxibenzaldeído (22), tr: 8,13 min.....	73
Figura 81 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 3-metoxibenzaldeído (23) com LC.....	73
Figura 82 – Espectro de massas do 3-metoxifenilmetanol (23a), tr: 6,37 min.	
Figura 83 – Espectro de massas do ácido 3-metoxibenzaldeído (23), tr: 8,16 min.....	73
Figura 84 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do furfural (24) com LC.....	74

Figura 85 – Espectro de massas do álcool furfúrico (24a), tr: 4,98 min.....	74
Figura 86 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do cinamaldeído (25) com LC em 48 horas.....	76
Figura 87 – Espectro de massas do fenilpropanol (25b), tr: 7,19 min.....	76
Figura 88 – Espectro de massas do cinamaldeído (25), tr: 7,48 min.....	76
Figura 89 – Espectro de massas do 3-fenilprop-en-1-ol (25a), tr: 7,68 min.	77
Figura 90 – Espectro de massas do ácido cinâmico (25c), tr: 8,35 min.	77
Figura 91 – Biorredução dos aldeídos aromáticos com LC.	77
Figura 92 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do nitrobenzeno (26) com LC.....	79
Figura 93 – Espectro de massas do aminobenzeno (26a), tr: 3,18 min.	79
Figura 94 – Espectro de massas do nitrobenzeno (26), tr: 4,11 min.	79
Figura 95 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 4-cloronitrobenzeno (27) com LC.....	81
Figura 96 – Espectro de massas do 4-cloroaminobenzeno (27), tr: 5,26 min.....	81
Figura 97 – Espectro de massas do 4-cloronitrobenzeno (27), tr: 5,72 min.....	81
Figura 98 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do ácido 2-nitrobenzóico (28) com LC.	82
Figura 99 – Espectro de massas do ácido 2-nitrobenzóico (28), tr: 9,51min.	82
Figura 100 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do ácido 3-nitrobenzóico (29) com LC.	82
Figura 101 – Espectro de massas do ácido 3-nitrobenzóico (29), tr: 9,49min.	83
Figura 102 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do ácido 4-nitrobenzóico (30) com LC.	83
Figura 103 – Espectro de massas do ácido 4-aminobenzóico (30a), tr: 9,25 min.....	83
Figura 104 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 3-nitrotolueno (31) de LC.....	
Figura 105 – Espectro de massas do 4-aminotolueno (30a), tr: 3,99 min.....	84
Figura 106 – Espectro de massas do ácido 4-nitrotolueno (31), tr: 5,31 min.....	84

Figura 107 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 4-nitrotolueno (32) com LC.....	85
Figura 108 – Espectro de massas do 4-aminotolueno (32a), tr: 3,93 min.....	85
Figura 109 – Espectro de massas do 4-nitrotolueno (32), tr: 5,52 min.....	85
Figura 110 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 2-nitrofenol (33) com LC.....	86
Figura 111 – Espectro de massas do 2-nitrofenol (33), tr: 4,57 min.....	86
Figura 112 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 4-nitrofenol (34) com LC.....	86
Figura 113 – Espectro de massas do 4-nitrofenol (34), tr: 9,05 min.....	87
Figura 114 – Biorredução de nitrocompostos usando LC.....	87
Figura 115 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da reação de acetilação convencional do composto 4-nitrofenol (34).....	89
Figura 116 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da reação em branco do acetato de 4-nitrofenila (35).....	90
Figura 117 – Espectro de massas do acetato 4-nitrofenila (35), tr: 8,67 min.....	90
Figura 118 – Espectro de massas do 4-nitrofenol (35a), tr: 9,11 min.....	91
Figura 119 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto de hidrólise do acetato de 4-nitrofenila (35) com LC.....	91
Figura 120 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto de hidrólise do benzonitrila (36) com LC.....	92
Figura 121 – Espectro de massas da benzonitrila (36), tr: 3,40 min.....	92
Figura 122 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto de hidrólise da benzamida (37) com LC.....	93
Figura 123 – Espectro de massas da benzamida (37), tr: 6,80 min.....	93
Figura 124 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto de hidrólise do benzoato de etila (38) com LC.....	93
Figura 125 – Espectro de massas do benzoato de etila (38), tr: 5,51 min.....	
Figura 126 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto de hidrólise do benzoato de etila (39) com LC.....	94
Figura 127 – Espectro de massas do benzoato de metila (39), tr: 4,59 min.....	94

Figura 128 – Espectro de massas do ácido benzóico (39a), tr: 5,59 min.....	94
Figura 129 – Fotografia dos quatros microorganismo repicados individualmente.....	96
Figura 130 – Fotografia dos quatros microorganismos sem irradiação UV para o teste de lipase.....	97
Figura 131 – Fotografia dos quatros microorganismos sob irradiação UV para o teste de lipase.....	97
Figura 132 – Empacotamento das colunas quirais (OB-H e OD-H).....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas em classe e subclasses de acordo com suas funções.	10
Tabela 2 – Alguns íons inorgânicos que servem de cofatores para enzimas.	11
Tabela 3 – Algumas coenzimas que servem como carregadores transitórios de átomos ou compostos químicos específicos.	12
Tabela 4 – Fontes vegetais nativa do nordeste usadas como biocatalisadores.	19
Tabela 5 – Alguns alcoóis quirais obtidos por biorredução usados como intermediários na síntese de fármacos.	25
Tabela 6 – Resultados obtidos nas biorreduções e seus respectivos biocatalisadores.	36
Tabela 7 – Configurações absolutas dos produtos de biorredução dos halogenados comparados com os da literatura.	48
Tabela 8 – Resultados da biorredução de acetofenonas halo-substituíntes em dois meios reacionais.	49
Tabela 9 – Configurações absolutas dos produtos de biorredução (nitrocompostos) comparados com os da literatura.	55
Tabela 10 – Resultados da biorredução de nitroacetofenonas com LC.	55
Tabela 11 – Configurações absolutas dos produtos de biorredução (doadores de elétrons) comparados com os da literatura.	60
Tabela 12 – Resultados da biorredução de derivados da acetofenona com doadores de elétrons.	61
Tabela 13 - Biorredução dos aldeídos aromáticos usando LC.	78
Tabela 14 - Biorredução dos nitrocompostos usando LC.	87
Tabela 15 – Condições de separação dos alcoóis aromáticos em CLAE.	102
Tabela 16 – Configurações absolutas dos produtos de biorredução comparados com os da literatura.	109

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1 – Condições reacionais na obtenção do Propanolol.	23
Esquema 2 – Condições reacionais na obtenção do Sotalol.....	24
Esquema 3 – Biorredução das acetofenonas substituintes halogênicos usando LC.	48
Esquema 4 – Biorredução de nitroacetofenonas usando LC.....	55
Esquema 5 – Biorredução de acetofenonas com substituintes doadores de elétrons.	60
Esquema 6 – Reação de acetilação convencional de 34.....	89
Esquema 7 – Reação de hidrólise de acetato de <i>p</i> -nitrofenila (35) usando LC.	90
Esquema 8 – Reações de hidrólise usando LC.	91
Gráfico 1 – Artigos publicados sobre biocatálise entre 1997 a 2010.	8
Gráfico 2 – Artigos publicados sobre biocatálise refinando com o termo plantas entre 1997 a 2010.	9
Gráfico 3 – Determinação de proteínas de extratos vegetais por dois métodos.....	40
Gráfico 4 – Biorredução de cetonas aromáticas.	66
Gráfico 5 – Cinético da reação enzimática do cinamaldeído (25).	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Lens culinaris</i>	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFIA	7
3.1	Biocatálise	7
3.2	Enzimas.....	9
3.3	Catálise enzimática	13
3.3.1	Mecanismos de atuação enzimática.....	13
3.3.1.1	Modelo Chave-fechadura	14
3.3.1.2	Modelo do encaixe induzido	14
3.3.1.3	Modelo dos três pontos	15
3.4	Regra de Prelog	16
3.5	Biorredução de cetonas pró-quirais usando fontes vegetais	18
3.6	Biorredução em solventes orgânicos.....	20
3.7	Produtos enzimáticos usados como intermediários na síntese de fármacos.....	21
3.8	Biorredução dos nitrocompostos aromáticos.....	27
3.9	Vantagens e desvantagens dos biocatalisadores	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Triagem das espécies vegetais.....	34
4.2	Determinação de proteínas.....	38
4.2.1	Método de Lowry	39
4.2.2	Método de Bradford	39
4.3	Otimização da biorredução da acetofenona (1)	41
4.3.1	Concentração do biocatalisador.....	4
4.3.2	Cinética da reação	42
4.3.3	Velocidade de agitação.....	43

4.3.4 Meio reacional.....	44
4.4 Biorreduções de cetonas aromáticas pró-quirais.....	45
4.4.1 Acetofenonas halogenadas.....	46
4.4.2 Acetofenonas nitradas	54
4.4.3 Acetofenonas com substituintes ativadores	58
4.5 Biorredução de outros compostos carbonílicos	64
4.5.1 Cetonas alifáticas e outras cetonas aromáticas	65
4.5.2 Aldeídos aromáticos	71
4.5.3 Nitrocompostos aromáticos	78
4.6 Hidrólises de ésteres	88
4.6.1 Reação de acetilação convencional do <i>p</i> -nitrofenol	88
4.7 Reação enzimática do acetato de <i>p</i> -nitrofenila (35)	89
4.8 Outras reações enzimáticas de hidrólise com LC.....	91
4.9 Determinação de microorganismos endofíticos em LC	95
4.10 Teste de atividade lipasica dos microorganismos endofíticos de LC	97
5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	98
5.1 Material utilizado	98
5.2. Métodos de Análise	98
5.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	99
5.2.2. Cromatografia em Coluna por adsorção	99
5.2.3. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	99
5.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	100
5.2.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	103
5.2.6. Espectroscopia na Região do UV/VIS	103
5.2.7. Rotação ótica.....	103
5.2.8. Solução tampão de Sorensen ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$).....	103

5.3. Determinação de Proteínas	104
5.3.1. Método de Lowry	104
5.3.2. Método de Bradford	105
5.4. Processo Biocatalítico.....	105
5.4.1. Redução das cetonas pró-quirais por via química	105
5.4.2. Usos dos vegetais como potencial biocatalítico.....	106
5.4.3. Otimização da biorredução da acetofenona com LC	107
5.4.4. Cetonas aromáticas pró-quirais	107
5.4.5. Determinação dos excessos enantioméricos (<i>ee</i>)	107
5.4.6. Determinação das configurações absolutas (<i>S/R</i>).....	108
5.4.7. Biorredução com outros tipos de compostos carbonílicos	110
5.4.8. Reação de acetilação do composto <i>p</i> -nitrofenol (34).....	110
5.4.9. Reação de hidrólise de nitrila, amida e ésteres	110
5.4.10. Culturas biológicas para determinar microorganismo endofíticos ...	111
5.4.11. Teste de lipase dos microorganismos endofíticos de LC.....	112
6 CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

A síntese orgânica é projetada envolvendo um meio complexo constituído de reagentes e reações capazes de modificar um alto número de precursores predeterminados no objetivo de produzir um desejado produto. No caso da produção de substâncias com finalidade medicamentosa, foi constatado que a maior parte dessas substâncias são quirais, cada uma tendo um ou mais centros estereogênicos. Neste contexto, a quiralidade tornou-se a força propulsora na síntese orgânica. Assim, a necessidade de derivados quirais para substâncias usadas na preparação de medicamentos a partir de precursores pró-quirais, tem aumentado em muito o interesse na utilização de enzimas para transformações nas indústrias farmacêuticas e agroquímicas (STRAATHOLF; PANKE; SCHIMID, 2002).

A produção de fármacos e moléculas precursoras com alta pureza enantiomérica vem se destacando no setor acadêmico e industrial, como resultado de recentes pesquisas e do desenvolvimento de novas tecnologias. Essa produção tem contribuído bastante para o crescente desenvolvimento da biocatálise e de novas metodologias ecologicamente adequadas (FABER; PATEL, 2000; DEMIRJIAN *et al.*, 2000; CHARTRAIN *et al.*, 2001).

O amplo potencial biotecnológico demonstrado pelos biocatalisadores tem atraído a atenção de muitos pesquisadores de diferentes áreas como agroindustriais, cosméticos, drogas e especialmente da indústria farmacêutica, considerando aspectos relevantes como a eficiência, regioseletividade, quimiosseletividade e, principalmente, a enantiosseletividade (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001; VEIT, 2004; SHAW; ROBINS; KIENE, 2003).

Para implementar um sistema reacional com rendimento satisfatório e elevada pureza óptica, muitas estratégias podem ser traçadas, desde a otimização do meio e das condições reacionais até a escolha do biocatalisador. A engenharia genética e as técnicas de biologia molecular são hoje ferramentas poderosas no desenvolvimento dos biocatalisadores mais eficientes. Os biocatalisadores mais citados em trabalhos de biotransformações são os de sistema derivados de micro-organismos: fungos, bactérias e leveduras (STEWART, 2000; JOHANSON; KATZ; GORWA-GRAUSLUND, 2005). Embora a maioria dos biocatalisadores seja

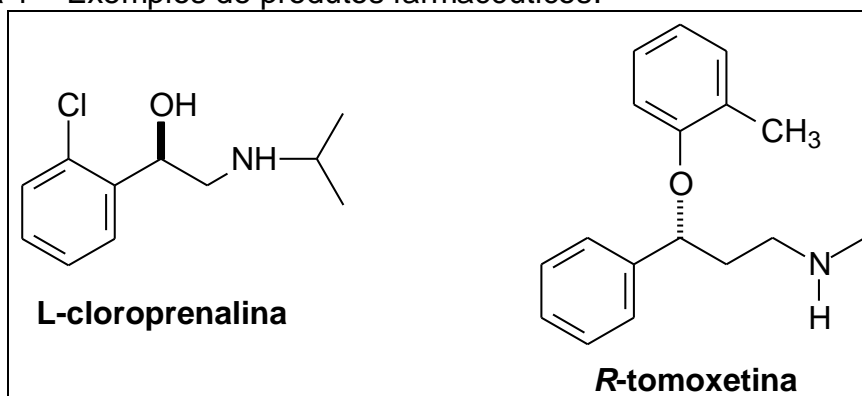
provenientes de micro-organismos e utilizados há muitos anos, atualmente, diversos trabalhos evidenciam o potencial biocatalítico de plantas e testemunham seu uso, seja, como sistemas íntegros, enzimas imobilizadas ou culturas de células. As biotransformações envolvendo plantas fazem uso de enzimas que conduzem reações orgânicas seletivas, observando-se processos: régio-, estereoespecífico e estereoseletivo de redução e oxidação, esterificação, glicosilação, oxidação alílica, hidroxilação, estereoespecífica formação de diol, distinção entre diastereoisômeros, descarboxilação e desracemização.

Entre os diversos trabalhos envolvendo sistemas vegetais (células íntegras e/ou imobilizadas), podemos destacar aqueles realizados ultimamente em nossos grupos de pesquisas acerca de reações de redução e hidrólise utilizando células íntegras e imobilizadas de fontes vegetais: *Shaccharum officinarum*, *Passiflora edulis*, *Manihot esculenta*, *Passiflora edulis*, *Coco nucifera* e *Vigna unguiculata* (ASSUNÇÃO *et al.*, 2008; ASSUNÇÃO; LEMOS; MONTE, 2009; MACHADO *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2008a; MACHADO *et al.*, 2008b; MACHADO *et al.*, 2009; FONSECA *et al.*, 2009; BIZERRA *et al.*, 2010). O uso de espécies vegetais oferece uma alternativa para os países investigarem os recursos naturais locais com grande relevância econômica e ecológica.

Sistemas de bioconversão utilizando vegetais podem ser usados à parte ou em combinação com a síntese orgânica clássica. Processos biocatalíticos em múltiplos passos utilizando culturas de plantas ou micro-organismos também auxiliam na elucidação de rotas biossintéticas, uma vez que geram produtos metabólicos intermediários característicos (GIRI *et al.*, 2001).

Considerando a importância da pureza ótica dos produtos farmacêuticos a produção de alcoóis quirais por células vegetais surge como uma relevante alternativa. Esses alcoóis são excelentes intermediários em síntese orgânica devido a sua versatilidade química e facilidade de conversão para outras classes de compostos comercialmente importantes e de alto valor agregado. Como por exemplos, o *R*-tomoxetina (tratamento de doenças neurológicas) e *L*-cloroprenalina (estimulante) são produtos farmacêuticos obtidos a partir de alcoóis quirais originados pela redução de cloroacetofenonas, através de biocatálise utilizando fontes de vegetais (YANG *et al.*, 2008) (Figura 1, p. 3).

Figura 1 – Exemplos de produtos farmacêuticos.



Dentro desse contexto, a redução seletiva de nitrocompostos aromáticos é também utilizada na síntese de aminas, importantes intermediários na obtenção de produtos farmacêuticos e outros derivados (BREUER *et al.*, 2004; PENG; SHAO, 2008; MELCHIORRE *et al.*, 2008). Esta reação é também de interesse em processos de biorremediação, pois nitrofenóis, amplamente utilizados como intermediários na indústria, são poluentes com forte impacto ambiental devido à sua toxicidade e resistência à biodegradação. Diversas metodologias convencionais têm sido descritas para transformações química de nitrocompostos (DE NORONHA; ROMÃO; FERNANDES, 2009; LI; XU, 2009; SPENCER *et al.*, 2008).

Inserido neste campo, o presente trabalho teve como objetivo o uso de células íntegras de *Lens culinaris* (LC) que contém, relativamente, alto teor de proteínas, como biocatalisador (fonte enzimática) em reações de redução e hidrólise para obtenção de interessantes precursores de sínteses, considerando ainda, a ausência de trabalhos nesta linha de pesquisa com esta espécie. Diversos substratos foram testados nas reações, como cetonas aromáticas (acetofenona e seus derivados) e cetonas cíclicas, aldeídos, nitrocompostos e ésteres. Algumas estratégias para o aumento da capacidade biocatalítica também foram avaliadas.

2 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Lens culinaris*

Lens culinaris é uma planta de pequeno porte, anual e cultivada em várias regiões do mundo. Conhecida como lentilha, pertence à família *Fabaceae* ou *Leguminosae* (leguminosas), subfamília *Faboideae*. Suas vagens (legumes) são curtas, com uma ou duas sementes (Figura 2) discóides altamente nutritivas, contendo muito ferro e muito apreciadas como alimento. É uma importante fonte de carboidratos complexos, proteínas, fibras alimentares, algumas vitaminas e minerais. A composição nutricional da lentilha de origem nacional apresenta 64% de carboidratos, 23% de proteínas, 17% de fibras e 0,8% de lipídeos (SHONS *et al.*, 2009).

Figura 2 – Fotografia das sementes de *Lens culinaris*.



Fonte: Daniele Alves Ferreira

No ano de 2002, Índia, Turquia e Canadá foram os maiores produtores com aproximadamente 33%, 16% e 12%, respectivamente, da produção mundial. Atualmente *Lens culinaris* é produzida em mais de 48 países (JOHNSON; JIMMERSON, 2003).

Relatos na literatura mostram que nem todo o potencial nutritivo das leguminosas pode ser aproveitado pelo organismo, pois apresentam componentes antinutricionais como inibidores de proteases, lectina, ácido fítico e taninos. O processamento térmico melhora a qualidade nutricional das leguminosas reduzindo

os fatores antinutricionais (RAKIC *et al.*, 2007; THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003).

O processamento térmico e a remoção da casca de *Lens culinaris* resultaram em mudanças no conteúdo de minerais e nos fatores antinutricionais. Após o processamento, foi observado redução de ácido fítico, taninos e fibra solúvel, sendo também relatada perda de importantes minerais como ferro, zinco, potássio, fósforo e magnésio (WANG *et al.*, 2009).

Uma das principais classes de compostos orgânicos encontrados em *Lens culinaris* são as saponinas. O teor de saponinas pode reduzir em aproximadamente 6-14% durante o cozimento (MORCOS; GABRIAL; EL-HAFEZ, 1976; RUIZ *et al.*, 1996).

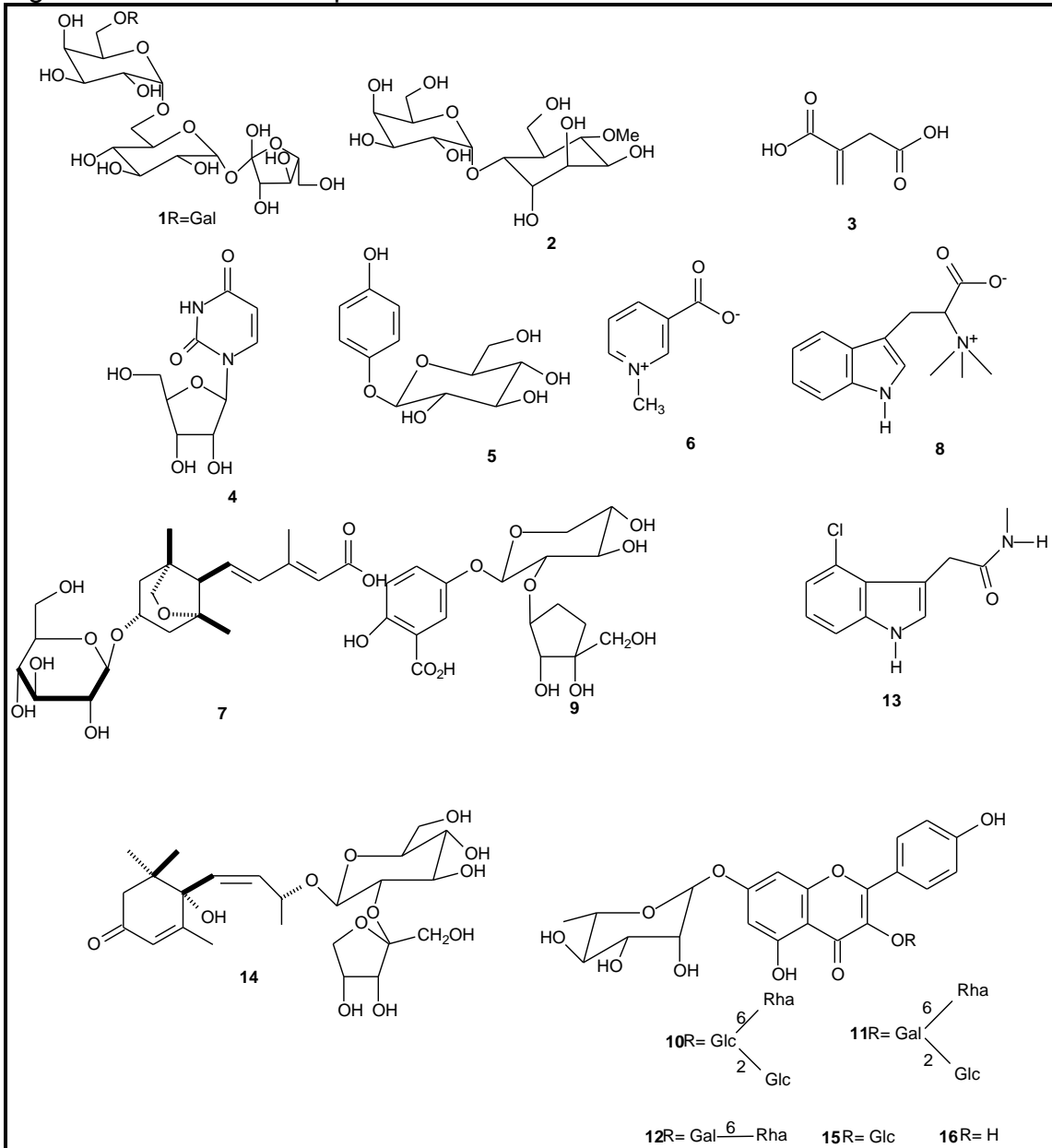
As características nutricionais da lentilha têm sido associadas a redução dos níveis de colesterol, lipídeos, incidência de câncer de cólon e diabetes do tipo 2 em seres humanos. Vários estudos têm relacionado à inclusão de leguminosas (lentilha, grão de bico e soja) na dieta diária a efeitos benéficos de controle e prevenção de várias doenças metabólicas, tais como: diabetes mellitus, dislipidemias e doenças cardiovasculares (ENGLYST *et al.*, 2003; THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003).

Lens culinaris é conhecida por conter grandes quantidades de oligossacarídeos: rafinose, estaquiose e verbascose (GULEWICZ *et al.*, 2000), bem como o açúcar de alcoóis ciclitóis: D-pinitol, galactopinitol e ciceritol (QUEMENER; BRILLOUET, 1983); contém também antinutricionais, tais como: inibidores de tripsina e hemaglutininas (FRIAS *et al.*, 1995). Compostos fenólicos e flavonóides glicosilados também foram citados a partir das sementes de lentilhas (SOSULSKI; DABROWSKI, 1984; BARTOLOME; ESTRELLA; HERNANDEZ, 1997; TAYLOR; FIELDS; SUTHERLAND, 2007).

No Canadá, estudos fitoquímicos com doze cultivares comerciais de lentilhas nas mesmas condições ambientais. Em tais cultivares foram identificadas dezesseis substâncias: estaquiose (1); pinitol 2-O- α -D-galactose (2); ácido itacônico (3); uridina (4); arbutina (5); flavonóides glicosilados do tipo campferol (10, 11, 12, 15 e 16); trigonelina (6) e hipaforina (8), dois compostos contendo nitrogênio quaternário; ácido *epi*-dihidrofaseico β -D-glicosídeo (7); ácido gentísico 5-O- $[\beta$ -

apiosil-(1-2)-*O*- β -xilopiranosil] (**9**); (6*S*, 7*Z*, 9*R*)-9-hidroximegastigma-4,7-dien-3-ona-9-*O*- β -D-apiofuranosil-(1-2)- β -D-glicopiranosido (**14**) e 4-cloro-1*H*-indol-3-*N*-metilacetamida (**13**). Estes compostos são mostrados na Figura 3 (TSOPMO; MUIR, 2010).

Figura 3 – Constituintes químicos isolados de doze cultivares de lentilha.



Fonte: TSOPMO; MUIR, 2010.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biocatálise

A biocatálise é uma área que utiliza o potencial catalítico de enzimas que isoladas ou não de organismos vivos (micro-organismo, vegetais) para obtenção de produtos de interesse comercial, particularmente, farmacêuticos. A principal vantagem da biocatálise em relação a reações químicas convencionais é sua elevada capacidade enantiosseletiva, além de ser menos poluente. Neste aspecto, torna-se necessário salientar casos extremamente interessantes em relação a alguns medicamentos, como as anfetaminas (anti-depressivo) e a talidomida (tranqüilizante), ambos formados por moléculas com carbonos assimétricos, constituídas de misturas racêmicas em que um isômero óptico exerce o efeito fisiológico desejado, enquanto o outro não (GARRITZ; CHAMIZO, 1994). Estes e muitos outros exemplos demonstram a efetiva relação entre quiralidade e atividade biológica.

A biotransformação surgiu como uma ferramenta poderosa para a chamada química verde (ecologicamente correta), a qual levará cada vez mais a processos industriais comprometidos com o controle ambiental (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001).

Aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta atividade catalítica das enzimas em comparação com os catalisadores convencionais, e principalmente por sua virtude de atuarem com alta eficiência em condições reacionais brandas de pH e temperatura (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Os processos enzimáticos usando micro-organismos exigem um tratamento cuidadoso prévio, para o cultivo e crescimento dos mesmos em meios adequados e condições de higienização. Enzimas isoladas necessitam, em sua maioria, da adição de cofatores para que possam atuar de forma adequada, o que encarece o processo. Porém, o uso de células íntegras (utilização de biomassa da fonte enzimática) é mais simples e de fácil manuseio, apesar da desvantagem ser uma mistura de várias enzimas (VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000).

São raras as metodologias descritas em trabalhos científicos utilizando extrato bruto de tecidos vegetais como fontes enzimáticas. Recentemente, reações químicas usando culturas de células vegetais como biocatalisadores tem recebido certa atenção (GIRI *et al.*, 2001; BRUNI *et al.*, 2002). O uso dessas metodologias vem crescendo devido ao importante potencial biotecnológico das reações enzimáticas utilizando esses materiais (CORDELL *et al.*, 2007).

O Gráfico 1 apresenta o resultado de uma pesquisa realizada no SciFinder Scholar usando como palavra chave “biocatalisys”, que apresentou um total de 4883 referências, demonstrando um crescente aumento do número de trabalhos publicados sobre este tema. Em contraste, o Gráfico 2, p. 9, exhibe os resultados de uma pesquisa semelhante, após refinamento com o termo “plants”, onde se observa apenas 233 referências, indicando que apesar da grande parte dos trabalhos publicados sobre biocatálise serem de microorganismos, há também uma tendência de crescimento na utilização de plantas como biocatalisadores. Ambas as buscas foram para os últimos quatorze anos (1997-2010).

Gráfico 1 – Artigos publicados sobre biocatálise entre 1997 a 2010.

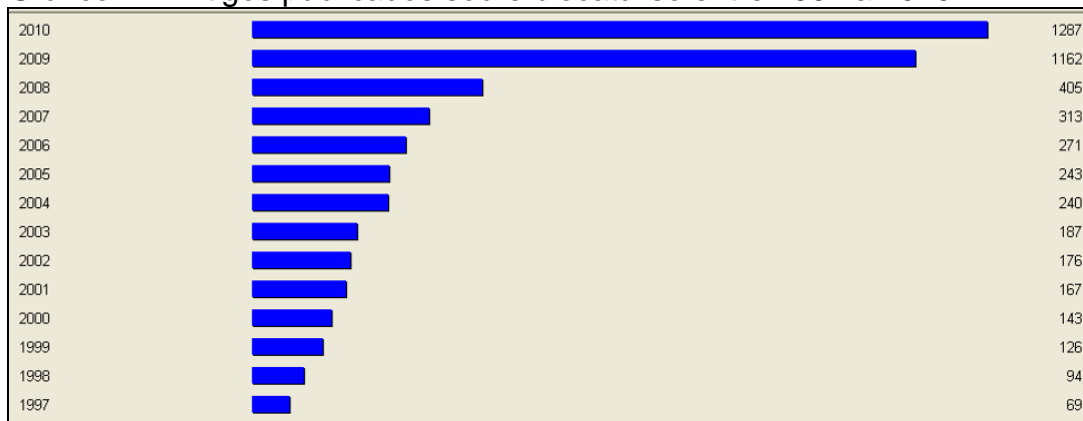
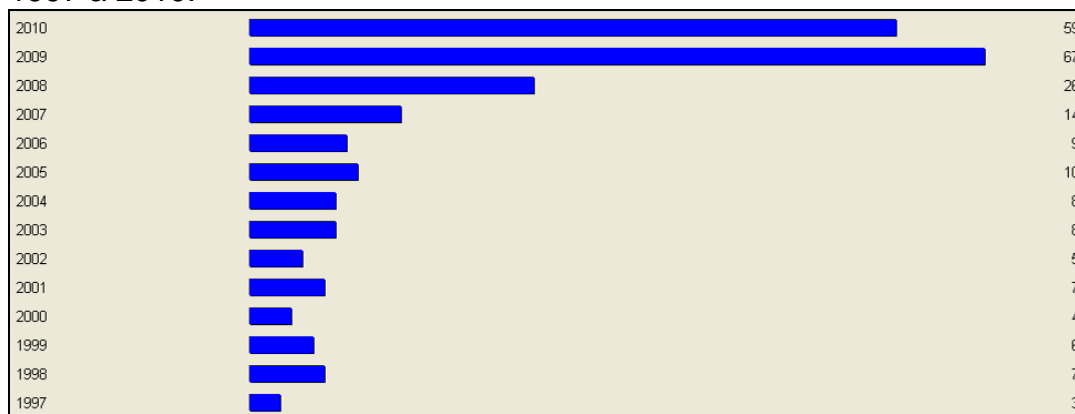


Gráfico 2 – Artigos publicados sobre biocatálise refinando com o termo plantas entre 1997 a 2010.



3.2 Enzimas

As enzimas são geralmente, proteínas naturais com atividades catalíticas surpreendentes, atuando em reações bioquímicas através da diminuição da barreira de energia entre os reagentes e produtos de forma versátil, aumentando a velocidade em até 10^{14} vezes. São formadas por longas cadeias de subunidades de aminoácidos (peptídeos) unidas por ligações amídicas (ligações peptídicas), dando origem a estruturas gigantescas com grupos polares como $-NH_2$, $-CO_2H$, $-OH$ e $-CONH_2$ (SILVERMAN, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

As enzimas são catalisadores biológicos eficientes, podendo ser empregadas em baixas concentrações e, ao contrário dos metais pesados, são biodegradáveis (SHELDON, 1997). Elas têm um alto grau de especificidade para seus respectivos substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas sob condições suaves de temperatura e pH. Poucos catalisadores não biológicos possuem todas estas propriedades (NELSON; COX, 2011).

Esses biocatalisadores receberam denominação pela adição do sufixo “ase” ao nome dos seus substratos ou a um termo que apresenta sua atividade. Algumas vezes a mesma enzima tem dois ou mais denominações, ou duas enzimas têm a mesma denominação. Por causa desta ambiguidade e também ao número cada vez maior de enzimas que são descobertas, os bioquímicos, por meio de um acordo internacional, adotaram um sistema de nomenclatura e classificação de

enzimas. São agrupadas em seis classes, cada uma com subclasses (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004), de acordo com a reação química que catalisam (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação das enzimas em classe e subclasses de acordo com suas funções.

CLASSE	FUNÇÃO	SUBCLASSE
Oxirredutase	Reações de oxi-redução, ou seja, transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de H).	Oxidases, redutases, hidrogenases.
Transferases	Reações de transferência de grupos (amina, acila, carboxila).	Transaminases, transcarboxilases.
Hidrolases	Reações de hidrólise covalente (transferência de grupos funcionais para a água)	Lipases, estereases
Liasas	Reações de adição de grupos a dupla ligação ou a formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, fosfatases.
Isomerases	Reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos	Racemases, epimerases, mutases.

Fonte: BOMMARIUS; RIEBEL, 2004

Determinadas enzimas não precisam de outros grupos químicos além dos seus próprios resíduos de aminoácidos. Outras necessitam de um componente químico adicional chamado cofator, que pode ser um ou mais íons inorgânicos como Co^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mo^{+2} , Zn^{+2} (Tabela 2, p. 11), ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, chamada coenzima.

As coenzimas atuam como carregadores transitórios de grupos funcionais específicos (Tabela 3, p. 12). A maior parte deles é proveniente das vitaminas, nutrientes orgânicos cuja presença na dieta é necessária em pequenas quantidades (NELSON; COX, 2011).

Tabela 2 – Exemplos de íons inorgânicos que servem de cofatores para enzimas.

Íons	Enzimas
Cu^{+2}	Citocromo-oxidase
Fe^{+2} ou Fe^{+3}	Citocromo-oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Piruvato-cinase
Mg^{+2}	Hexocinase, glicose-6-fosfatase, piruvato-cinase
Mn^{+2}	Arginase, ribonucleotídeo-redutase
Mo^{+2}	Dinitrogenase
Ni^{+2}	Urease
Se^{-2}	Glutaciona-peroxidase
Zn^{+2}	Anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidases A e B

Fonte: NELSON; COX, 2011

Várias enzimas necessitam tanto de uma coenzima quanto de um ou mais íons metálicos para terem atividade. Uma coenzima ou um íon metálico que se ligue muito firmemente, ou mesmo covalentemente, a uma enzima é denominado grupo prostético. Uma enzima completa cataliticamente ativa junto com a sua coenzima e/ou íons inorgânicos é chamada holoenzima. A parte protéica de uma dessas enzimas é chamada apoenzima ou apoproteína. Finalmente, algumas enzimas são modificadas covalentemente por carboxilação, fosforilação, glicosilação e outros processos. Muitas destas modificações estão envolvidas na regulação da atividade enzimática (NELSON; COX, 2011).

Os cofatores mais conhecidos em biocatálise são os NADH e NADPH, utilizados nas reduções de cetonas e aldeídos por oxirredutases. Essas substâncias garantem a transferência dos elétrons necessários para o processo de redução.

Como esses cofatores precisam ser usados em grandes quantidades, sua reciclagem torna-se uma exigência, e na indústria, muitas vezes, são pouco viáveis pelo seu alto preço (BRUICE, 1998; DAUBMANN; ROSEN; DUNKELMANN, 2006).

Tabela 3 – Coenzimas que servem como carregadores transitórios de átomos ou compostos químicos específicos.

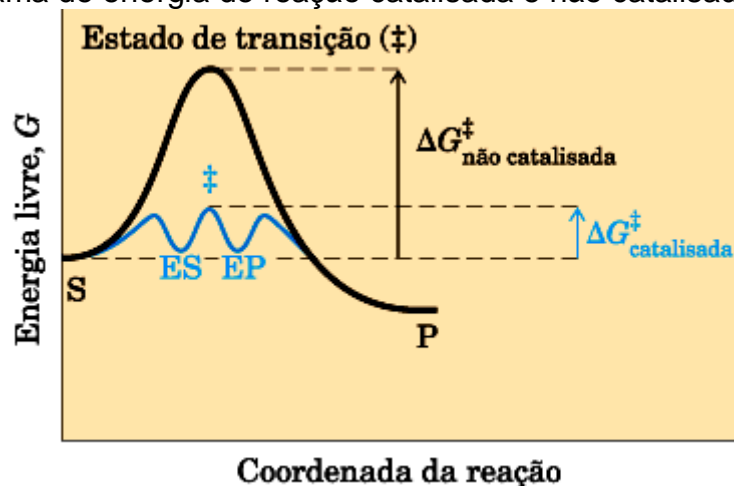
Coenzima	Exemplo de átomos ou composto químico transferido	Precursor presente na dieta de mamíferos
Biocina	CO ₂	Biotina
Coenzima A	Grupos acila	Ácido pantotênico e outros compostos
5'-Desoxiadenosilcobalamina (coenzima B ₁₂)	Átomos de H e grupos alquila	Vitamina B ₁₂
Flavina-adenina-dinucleotídeo	Elétrons	Riboflavina (vitamina B ₂)
Lipoato	Elétrons e grupos acila	Não é necessário na dieta
Nicotinamida-adeninadineotídeo	Íon hidreto (:H ⁻)	Ácido nicotínico (niacina)
Piridoxal-fosfato	Grupos amino	Piridoxina (vitamina B ₆)
Tetraidrofolato	Grupos de um carbono	Ácido fólico
Tiamina-pirofosfato	Aldeídos	Tiamina (vitamina B ₁)

Fonte: NELSON; COX, 2011.

3.3 Catálise enzimática

As enzimas, assim como os demais catalisadores, aceleram a velocidade das reações diminuindo a barreira energética entre reagentes e produtos. Esse efeito ocorre devido à formação de um complexo intermediário entre o substrato e o biocatalisador (enzima). Este intermediário, chamado complexo enzima-substrato (ES), é formado a partir de interações como ligações covalentes, interação dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas, além de forças de van der Waals. A Figura 4 apresenta um diagrama de energia de uma reação convencional e catalisada por enzima (FABER, 2000).

Figura 4 – Diagrama de energia de reação catalisada e não catalisada por enzima.



S: Substrato; P: Produto; ES: Enzima-Substrato; EP: Enzima-Produto; ΔG : variação de energia livre de Gibbs.

Fonte: NELSON; COX, 2011

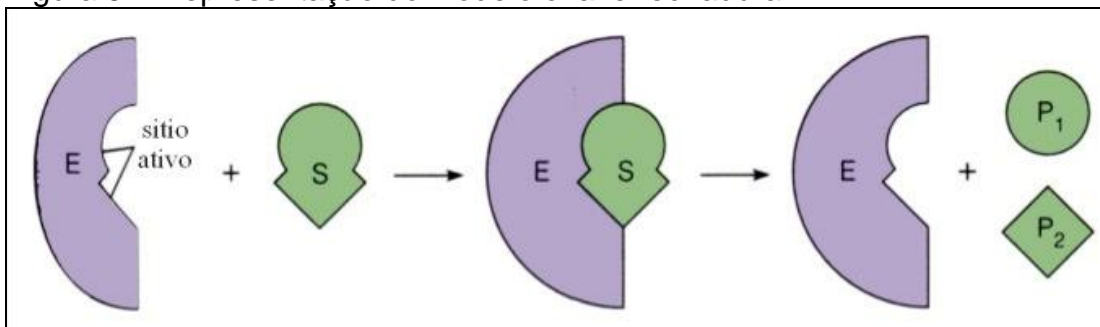
3.3.1 Mecanismos de atuação enzimática

A ação enzimática de uma proteína está sempre associada à presença de um sítio ativo, ou um determinado ponto capaz de interagir seletivamente com a molécula do substrato através de forças intermoleculares, conferindo a proteína certa especificidade catalítica (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002). Varias teorias são descritas para esclarecer como a catálise enzimática atua sobre um determinado substrato, sendo as principais relacionadas a seguir:

3.3.1.1 Modelo Chave-fechadura

Uma das primeiras teorias propostas para explicar a interação entre o substrato e a enzima considera que entre ambos ocorre um encaixe similar ao de uma chave na fechadura (Figura 5) proposto por Emil Fisher em 1894. O substrato incorpora-se a estrutura enzimática através de interações químicas com o sítio ativo, que apresenta configuração complementar ao seu, formando um complexo enzima-substrato, que se dissocia em seguida através da liberação dos produtos formados. Este modelo foi muito importante, mas hoje está em desuso por considerar que a enzima apresenta uma estrutura totalmente rígida (FABER, 2000).

Figura 5 – Representação do modelo chave-fechadura.

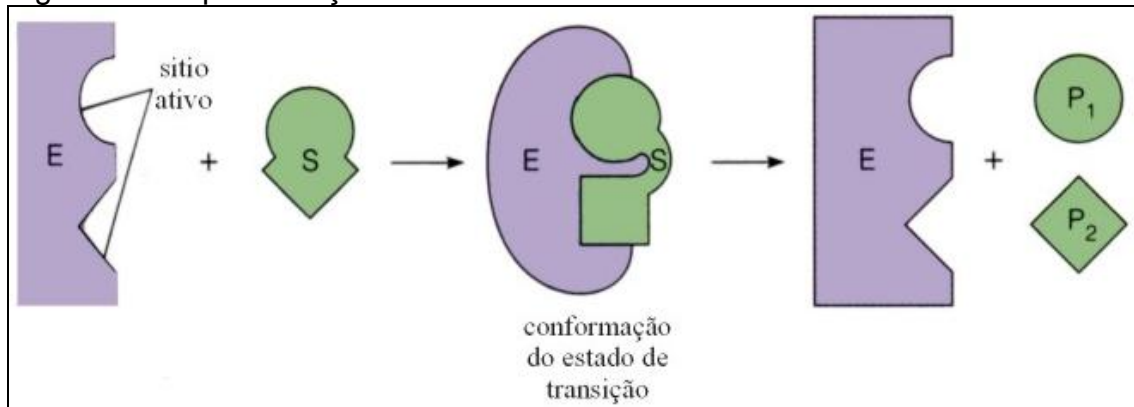


Fonte: FABER, 2000.

3.3.1.2 Modelo do encaixe induzido

Outro modelo, sugerido por Koshland em 1960, estabelece que as enzimas não sejam estruturas totalmente rígidas, podendo ajustar sua conformação durante a aproximação do substrato ao sítio catalítico da enzima, para formação do complexo enzima-substrato (Figura 6, p. 15). O substrato encaixa-se ao sítio ativo através de uma nova conformação adquirida pela enzima (FABER, 2000).

Figura 6 – Representação do modelo do encaixe induzido.

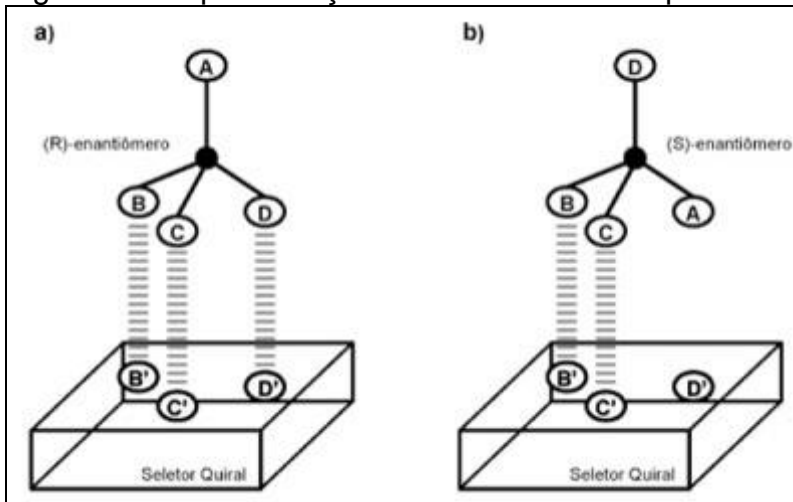


Fonte: FABER, 2000.

3.3.1.3 Modelo dos três pontos

O modelo proposto por A. G. Ogston em 1948 foi elaborado para explicar a seletividade enzimática. Sugere que para a enzima apresentar seletividade entre enantiômeros (enantiosseletividade) o substrato deve aderir-se firmemente em um espaço de três dimensões no sítio enzimático. Considerando um substrato racêmico (*R* e *S*) cuja quiralidade encontra-se em um átomo de carbono sp^3 é necessária a presença de, pelo menos, três pontos distintos de ligação entre enzima e o substrato, no sítio ativo (Figura 7, p. 16). Logo, a conformação e a composição química do sítio ativo determinam a especificidade e a eficiência da catálise. Para compostos que possuam uma quiralidade axial ou planar envolvendo carbono sp ou sp^2 , a regra dos três pontos pode ser racionalizada (FABER, 2000).

Figura 7 – Representação do modelo dos três pontos.

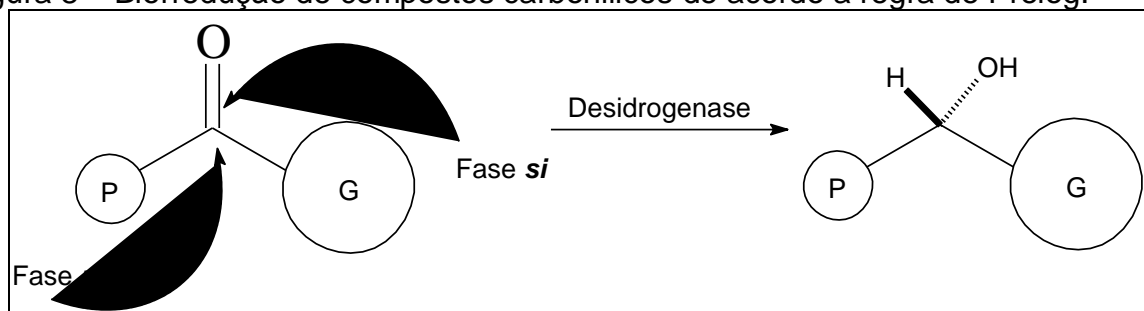


Fonte: FABER, 2000.

3.4 Regra de Prelog

Em 1964, Prelog notou que a reação de álcool desidrogenase (ADH) com cetonas pró-quirais para obtenção de alcoóis quirais dependia do tamanho dos substituintes ligados a carbonila, o grupo mais volumoso (G) e o grupo menos volumoso (P) representado na Figura 8. Conforme essa regra, a enzima doa hidreto, principalmente, pelo caminho do grupo menos volumoso (fase *re*), obtendo, majoritariamente, álcool de configuração S (VIEIRA, 2006).

Figura 8 – Biorredução de compostos carbonílicos de acordo a regra de Prelog.

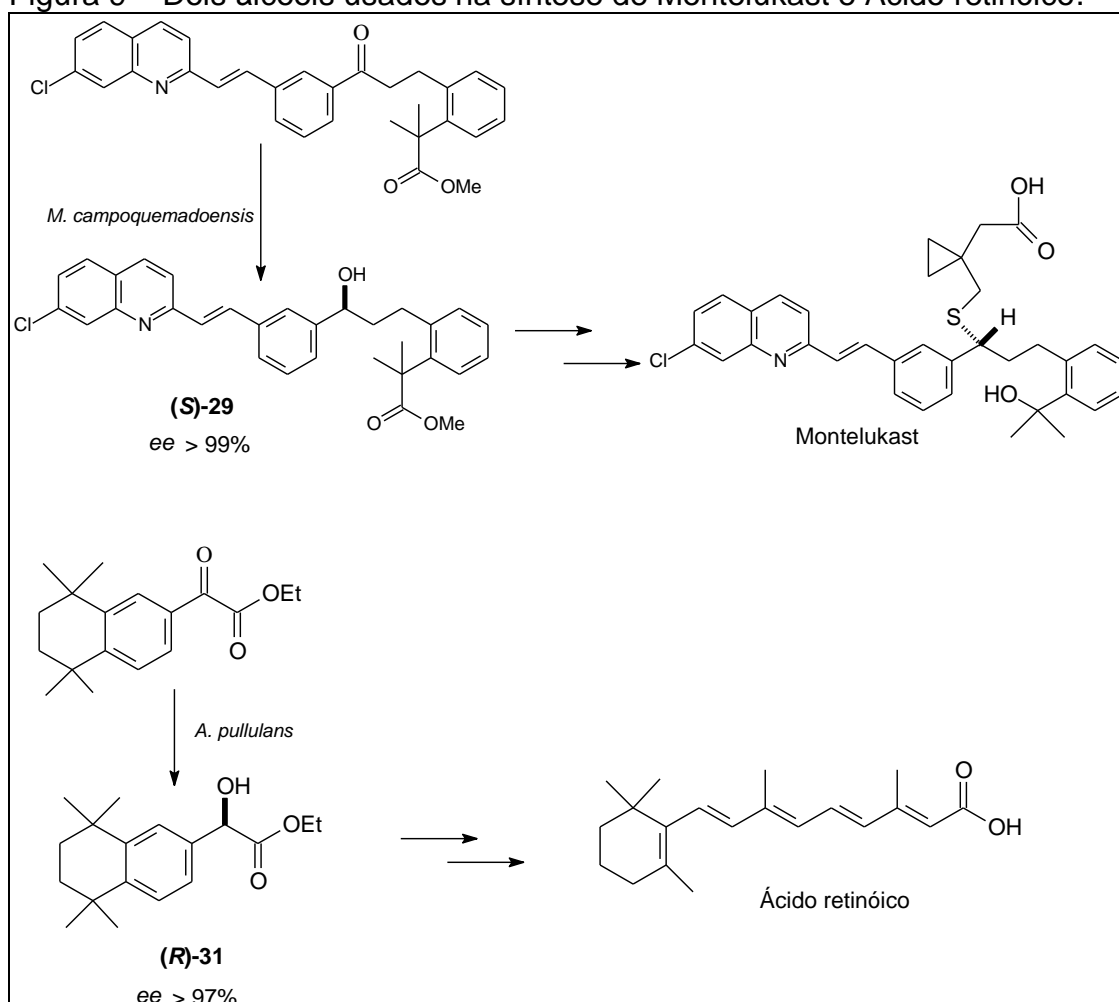


Fonte: VIEIRA, 2006.

Apesar de a regra afirmar que a face *re* da carbonila para introdução do hidreto, seja favorecida há relatos na literatura que algumas enzimas preferem a face *si* gerando o álcool de configuração *R*, com atividade anti-Prelog. Na indústria

existem fármacos disponíveis com especificidade de acordo com esse princípio, como por exemplo, o intermediário 29 usado na síntese do Montelukaste (anti-asma), produzido pela Merck e Co. Inc. a partir da cetona correspondente por uma biorredução catalisada por células inteiras de *Microbacterium campoquemadoensis* (em acordo com a regra de Prelog) e o intermediário 31 usado na síntese de receptores do ácido retinóico (anticancerígeno) por células inteiras de *Aureobasidium pullulans*, produzido por Bristol-Myers Squibb, produto anti-Prelog. Os dois álcoois quirais usados na síntese dessas drogas, de acordo com a regra Prelog e anti-Prelog, são ilustrados na Figura 9 (SHAFIEE *et al.*, 1998; PATEL *et al.*, 2002; SOLANO *et al.*, 2012).

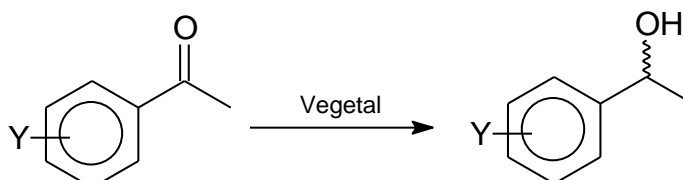
Figura 9 – Dois álcoois usados na síntese de Montelukast e Ácido retinóico.



Fonte: SOLANO *et al.*, 2012.

3.5 Biorredução de cetonas pró-quirais usando fontes vegetais

Neste tópico está sendo destacados estudos sobre biorredução de uma série de cetonas aromáticas pró-quirais, derivados da acetofenona e utilizando diversas espécies vegetais como biocatalisadores.



Vários estudos foram realizados utilizando fontes vegetais nativos do nordeste, tais como: *Manihot esculenta*, *Manihot dulcis*, *Saccharum officinarum* (caldo da cana de açúcar), *Coco nucifera* (água de coco) e *Vigna unguiculata* (feijão de corda) como biocatalisadores, usando acetofenona e 3-metoxiacetofenona como substratos durante 72 horas (Tabela 4, p. 19).

Entre os biocatalisadores utilizados, o que apresentou maior pureza enantiomérica para os dois substratos foi *V. unguiculata* ($ee \geq 99\%$) em água/isopropanol 2% (co-solvente). Em meio aquoso o ee foi de 92% para o substrato acetofenona, as configurações absolutas foram de acordo com a regra Prelog, com exceção do caldo de cana.

Tabela 4 – Fontes vegetais nativa do nordeste usadas como biocatalisadores.

Biocatalisador	Y				Referência
	H		3-OMe		
	C (%)	ee (%)	C (%)	ee (%)	
<i>M. esculenta</i>	80	>95 (S)	85	>94(S)	MACHADO <i>et al.</i> , 2006
<i>M. dulcis</i>	83	>97 (S)	87	>96 (S)	
<i>S. officinarum</i>	39	57 (R)	19	41(S)	ASSUNÇÃO <i>et al.</i> , 2008
<i>C. nucifera</i>	79	95(S)	98	99(S)	FONSECA <i>et al.</i> , 2009
<i>V. unguiculata</i>	34/35 ^a	92/≥99 ^a (S)	86 ^a	≥99 ^a (S)	BIZERRA <i>et al.</i> , 2010

a:cosolvente água/isopropanol 2%

C: conversão

ee: excesso enantiomérico

A biorredução de acetofenona (Y=H) também foi avaliado após 3 e 6 dias, utilizando 16 vegetais como biocatalisadores. O tempo ideal para melhor conversão foi de seis dias, para a planta *Arracacia xanthorrhiza* (mandioquinha/batata-baroa/cenoura branca) obteve uma configuração (S) com 91% de rendimento e 66% em ee, enquanto o *Beta vulgaris* (beterraba) produziu um álcool anti-Prelog (R) (83% em conversão e 87 de ee). Dos 16 vegetais que apresentaram excelentes ee > 98% (S) nos dois tempos (3 e 6 dias) foram *Allium schoenoprasum* (cebolinha), *Brassica rapa* (nabo/mostarda nabo), *Zingiber officinale* (gengibre) (ANDRADE *et al.*, 2006a).

Andrade e colaboradores (2006a) avaliaram ainda, dez vegetais para redução dos derivados da acetofenona (4-Y= -Br, -CH₃, -NO₂ e -SeCH₃) em 3 dias e 6 dias. O *Manihot esculenta* (mandioca) mostrou melhor resultado nos dois tempos com o substituinte bromo em conversão (50-55%) e ee (>98-R). As espécies *Arctium lappa* (barbana), *Brassica rapa*, *Manihot esculenta*, *Raphanus sativus* (rabanete) mostraram excelente ee (>98%) com configuração (S) na redução de 4-metilacetofenona (4-Y= -Br), porém baixas conversões (1-3%). Na redução do 4-

nitroacetofenona ocorreu o inesperado para algumas das espécies, nas quais não foram quimiosseletivas, pois reduziram tanto a carbonila como reduziram o grupo nitro, tais como, *Arracacia xanthorrhiza* e *Manihot esculenta*, conversões 68-79% (álcool), 6-9% (amina) e 51-56% (álcool), 19-20% (amina) nos 3 e 6 dias, respectivamente. A *Colocasia esculenta* foi a única espécie das dez sendo quimiosseletiva, pois reduziu totalmente o grupo nitro em amina em seis dias. Na biorredução do derivado da acetofenona com o substituinte (4-Y= -SeCH₃) as espécies (*Allium schoenoprasum* e *Arracacia xanthorrhiza*) obtiveram excelentes ee (>98%), mas baixa conversões (1-21%).

Yang e colaboradores (2008) realizaram um estudo dos tecidos de sete vegetais (maçã-*M. punila*, cenoura-*D. carota*, pepino-*C. sativus*, cebola branca-*A. cepa*, batata-inglesa-*S. tuberosum*, rabanete-*R. sativus* e batata doce-*I. batatas*) na redução de acetofenona e 4-cloroacetofenona em 50 e 100 horas. No caso da redução da acetofenona, as plantas que demonstraram melhores resultados em ee foram a cenoura (>95%-S) e a batata-inglesa (>92%-R) nos dois tempos, mas em conversões foram *D. carota* (>78%) e *R. sativus* (>72%). Na biorredução do 4-cloroacetofenona as espécies *D. carota* e *S. tuberosum* também mostrou melhor ee (99%-S e 99%-R) em 50 horas e (98%-S e 97%-R) em 100 horas.

3.6 Biorredução em solventes orgânicos

A biocatálise sofreu seu maior impulso na década de 80, através da ruptura do dogma de que as enzimas só poderiam funcionar em meios aquosos. O emprego das enzimas em solventes não convencionais (orgânicos) admitiu aplicar estes biocatalisadores em reações na síntese orgânica. O potencial desta utilização foi desenvolvido pelo fato de que em meios não aquosos as enzimas exibem seletividade, não só ao nível de quimiosseletividade, mas principalmente ao nível de enantiosseletividade (FABER, 2004).

Uma das principais vantagens de usar solvente orgânico foi devido à baixa solubilidade em água de muitos compostos orgânicos de interesse comercial, com potencial para serem transformados por enzimas e micro-organismos (LEÓN *et al.*, 1998). Outra vantagem associada ao uso de solventes não aquosos em reações

biocatalíticas, substituindo o ambiente aquoso tradicionalmente utilizado, é a simplicidade com a qual o produto pode ser recuperado (DUMANSKI *et al.*, 2006; NORTH, 1996). Além disso, a redução em meio orgânico pode fornecer rendimentos mais altos quando comparados ao sistema aquoso (MEDSON; SMALLRIDGE; TREWHELLA, 1997; ATHANASIOU; SMALLRIDGE; TREWHELLA, 2001), bem como diminuir a possibilidade de reações laterais e, conseqüentemente, a formação de subprodutos (LAANE, 1987; KLIBANOV, 2001).

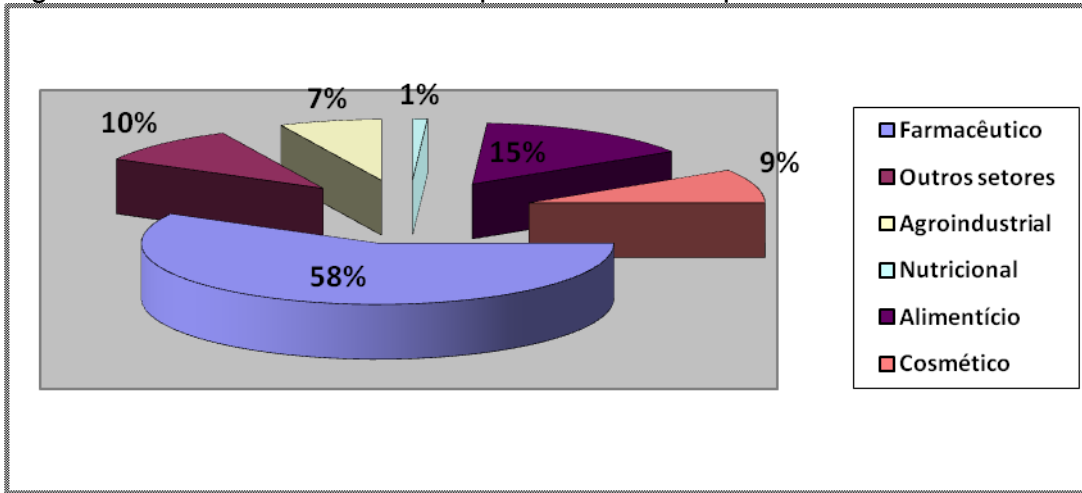
Recentemente, foi publicado um trabalho empregando células inteiras de *Vigna unguiculata* (feijão) na redução da acetofenona utilizando co-solvente orgânico obtendo produtos com excessos enantioméricos mais altos ($\geq 99\%$) do que com reações realizadas em meio aquoso (92%) (BIZERRA *et al.*, 2010).

Enzimas hidrolíticas como lipases e proteases são conhecidas por reter sua atividade em solvente orgânico (CAI *et al.*, 2006; GHANEM, 2007). As oxidoredutases, ao contrário das hidrolases, necessitam da assistência de coenzimas em quantidades estequiométricas, e quando ocorrem danos à membrana hidrofílica do micro-organismo, a regeneração dos cofatores pode não ser garantida, inutilizando-as (FABER, 1997).

3.7 Produtos enzimáticos usados como intermediários na síntese de fármacos

Os processos biocatalíticos serão utilizados com maior freqüência pelas indústrias de síntese química no futuro, principalmente devido às exigências ao nível da qualidade e meio ambiente (química verde). A indústria de uma forma geral vem usando esses processos, destacando-se o ramo farmacêutico como demonstrado na Figura 10 (p. 22). Em uma pesquisa realizada, das 128 sínteses obtidas por três grandes indústrias farmacêuticas britânicas, 69 consistiram na preparação de compostos quirais. Para um fármaco quiral ser aprovado por uma agência regulatória, é necessário que tenha um excesso enantiomérico de no mínimo 99,5%. Para isso, naturalmente há a necessidade de que sejam realizados estudos a fim de selecionar o agente biológico (enzima) e as condições adequadas para que a transformação de um determinado substrato forneça a seletividade desejada (FABER, 2000; STRAATHOLF; PANKE; SCHIMID, 2002).

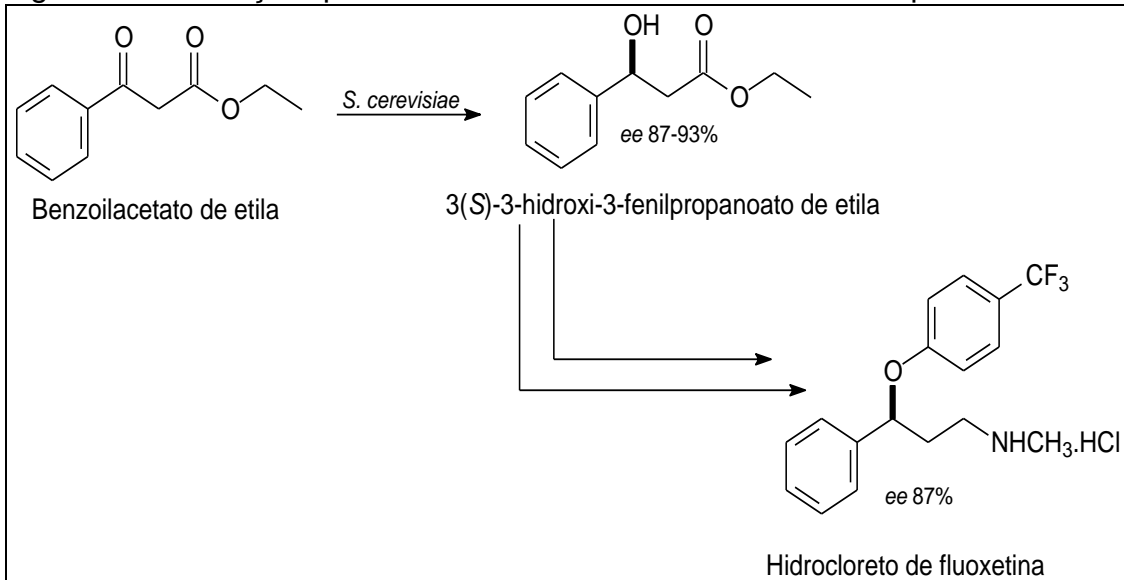
Figura 10 – Setores da indústria que mais utilizam processos enzimáticos.



Fonte: STRAATHOLF; PANKE; SCHIMID, 2002.

Como exemplo de aplicação industrial encontra-se a fluoxetina, uma droga utilizada como antidepressivo, cujo único centro estereogênico foi obtido por redução catalisada pela levedura *S. cerevisiae* (Figura 11). O produto quiral obtido pela redução foi empregado na síntese da fluoxetina após alguns passos (PEREIRA, 1997).

Figura 11 – Redução quimiosseletiva do benzoilacetato de etila por *S. cerevisiae*.

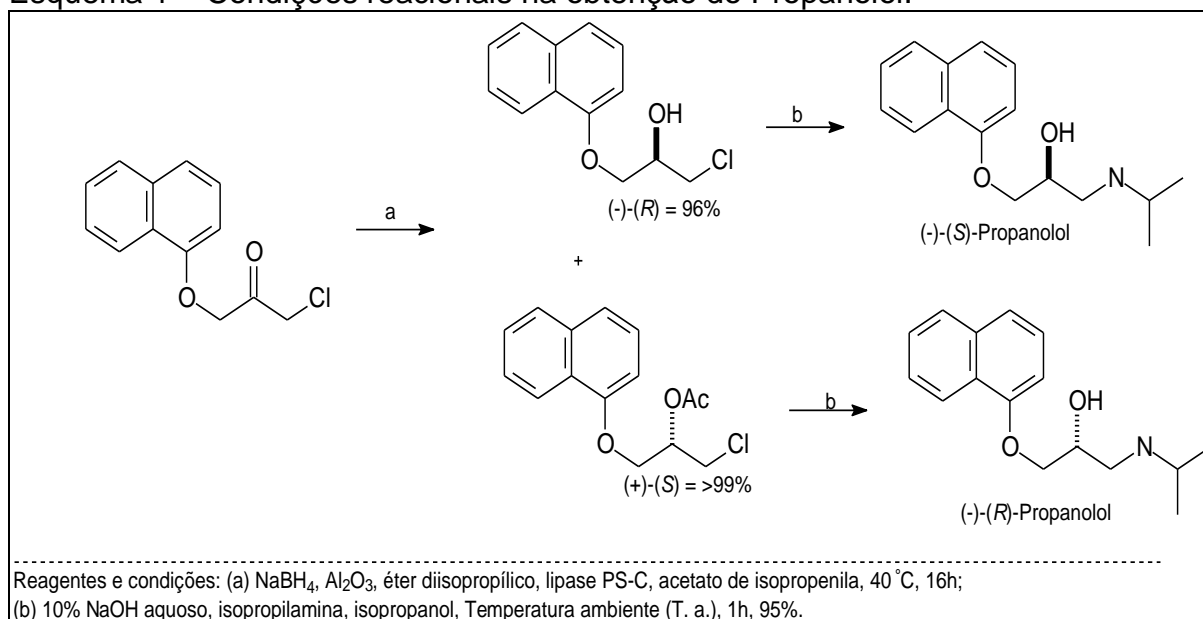


Fonte: PEREIRA, 1997.

A lipase de *Pseudomonas cepacia*, uma das mais empregadas no campo da biocatálise, para a preparação de moléculas quirais via resolução cinética para obtenção de moléculas de interesse farmacológico como Propanolol e Sotalol. Propanolol é um fármaco com distintas propriedades biológico, tais como, tratamento da hipertensão, angina peitoral e arritmia cardíaca. A configuração *S* do Propanolol é mais ativa e possui uma maior afinidade com receptores β -1 e β -2. Já os isômeros *R* e *S* são ativos no Sotalol, apesar da forma enantiomérica levógira ser vinte vezes mais ativa que seu antípoda (KAMAL; SANDBHOR; SHAIK, 2004).

No Esquema 1 é demonstrado as condições reacionais do preparo do Propanolol, o passo de redução do material de partida foi realizado com subsequente adição da lipase no meio reacional, consentindo a resolução cinética do produto de redução e obtendo-se ee de 96% para o álcool e superior a 99% para o acetato (KAMAL; SANDBHOR; SHAIK, 2004).

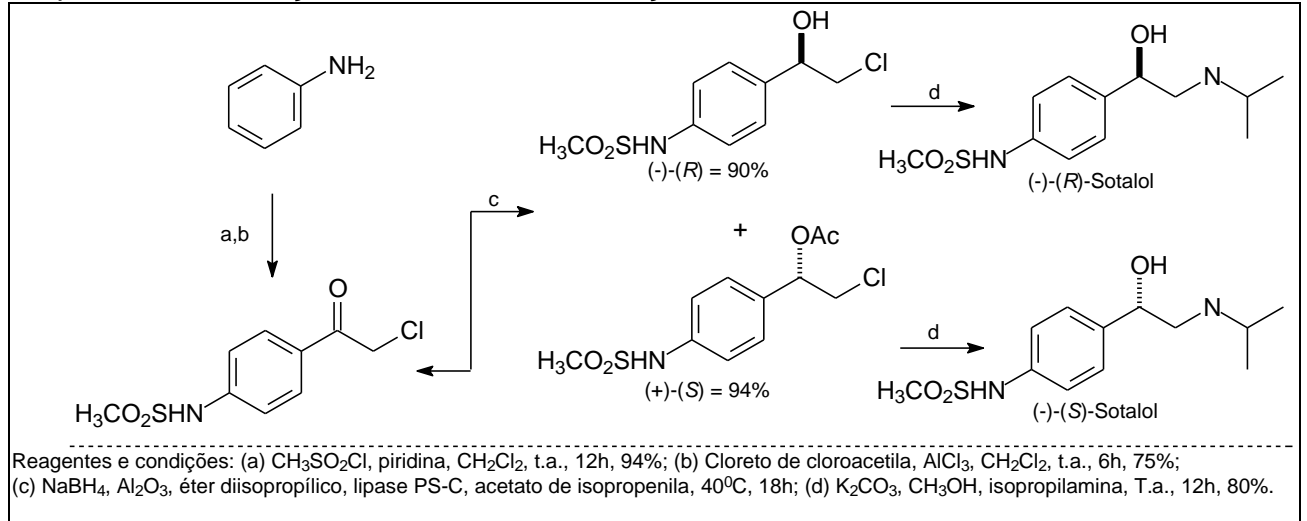
Esquema 1 – Condições reacionais na obtenção do Propanolol.



Na síntese do Sotalol foi utilizado como material de partida a anilina, que foi convertida ao produto desejado ao final de quatro etapas reacionais, sendo a redução acompanhada pela resolução cinética, obtendo-se excessos enantioméricos

de 90 e 94% do álcool e acetato, respectivamente (Esquema 2, p. 24) (KAMAL; SANDBHOR; SHAIK, 2004).

Esquema 2 – Condições reacionais na obtenção do Sotalol.

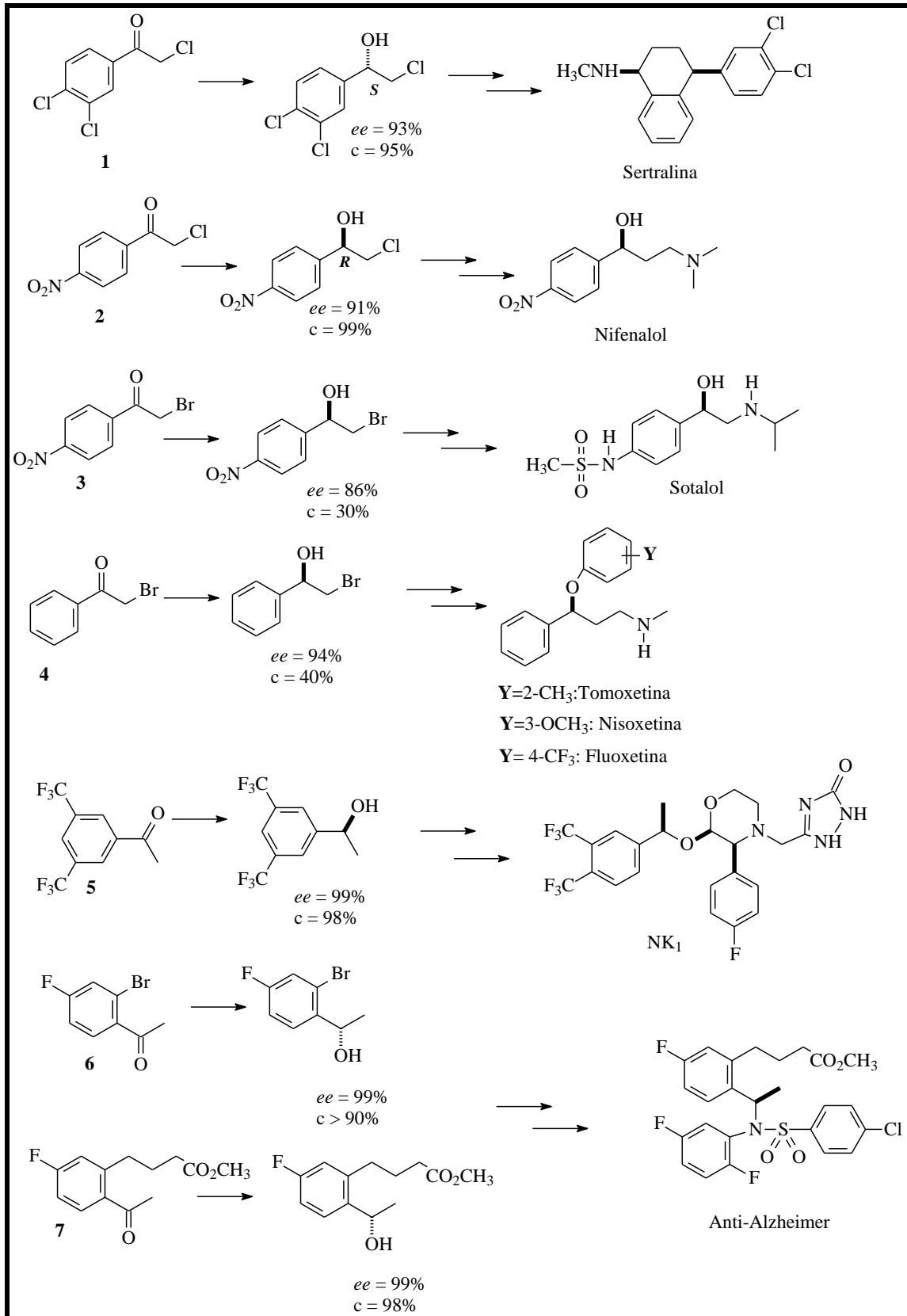


Outros exemplos de fármacos que apresentam em sua síntese alcoóis quirais como intermediários, obtidos através de redução enzimática a partir de cetonas aromática pró-quirais, são a Sertralina, Nifenolol, NK_1 , Sotalol, Tomoxetina, Nisoxetina, Fluoxetina, Neuroquinina1 ou NK_1 e Anti-Alzheimer. Seus biocatalisadores, nomes e atividades são mostrados na Tabela 5 (p. 25). Suas estruturas e seus precursores são mostrados na Figura 12 (p. 26).

Tabela 5 – Alguns alcoóis quirais obtidos por biorredução usados como intermediários na síntese de fármacos.

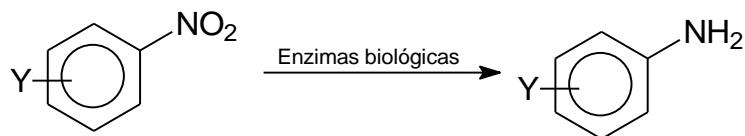
Entrada	Produto	Biocatalisador	Fármaco	Atividade biológica	Referência
1	(S)-1	<i>G. candidum</i>	Sertralina	Antidepressivo	BARBIERI <i>et al.</i> , 2001
2	(R)-2	<i>M. subtilissimus</i>	Nifenolol		
3	(S)-3	<i>Aspergillus terreus</i>	Sotalol	Antiarrítmico	ANDRADE <i>et al.</i> , 2006
4	(S)-4	<i>Rhizopus oryzae</i>	Tomoxetina	Antidepressivo	
			Nisoxetina		
			Fluoxetina		
5	(S)-5	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NK ₁	Ansiolítico e antieméticos	SOLANO <i>et al.</i> , 2012
6	(S)-6	<i>Candida</i> , <i>Hansenula</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Sphingomonas</i>	Anti-Alzheimer	Anti-Alzheimer	PATEL, 2008
7	(S)-7	<i>P. methanolica</i>			

Figura 12 – Alguns alcoóis quirais obtidos por biorredução usados na síntese de fármacos.



3.8 Biorredução dos nitrocompostos aromáticos

Outro grupo importante de reação na biocatálise é a biorredução de nitrocompostos para produção de aminocompostos. Alguns nitrocompostos aromáticos são produtos da combustão incompleta de combustíveis fósseis, liberados em grandes quantidades no meio ambiente, principalmente das fontes antropogênicas. Vale ressaltar ainda, que esses compostos são também produzidos pela reação de nitração, importante na produção comercial e na utilização de vários intermediários amino aromáticos, utilizados como matéria prima para a produção de explosivos, pesticidas, herbicidas, polímeros, tintas, produtos farmacêuticos, etc (YE; SINGH; WARD, 2004). Portanto, grandes quantidades de áreas de solo e água subterrâneas estão fortemente contaminadas por estes xenobióticos, proveniente de instalações para a sua fabricação, processamento e eliminação (STENUIT *et al.*, 2005).



Estes compostos são utilizados também como solventes, enquanto que a maioria dos poli-nitro aromático são usados como explosivos, como no caso o 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) (HAWARI *et al.*, 2000). Nitrocompostos aromáticos exibem toxicidade considerável para os seres vivos, peixes, algas e microorganismos. Devido à versatilidade química do grupo nitro, estes são importantes produtos químicos industriais, com produção estimada de 10⁸ toneladas. Conseqüentemente, estes compostos tornaram-se sérios poluentes em águas residuárias, solos, rios e ambientes urbanos (CHAUDHARI; KULKARNI, 2007).

Embora essas classes sejam valiosas para indústria são estáveis, recalcitrantes e tóxicos tornando-se um poluente perigoso para o meio ambiente, enquadrados na classificação de nível-3 (3 indica o pior nível de poluentes perigosos-tóxicos) (SAX; LEWIS, 1999).

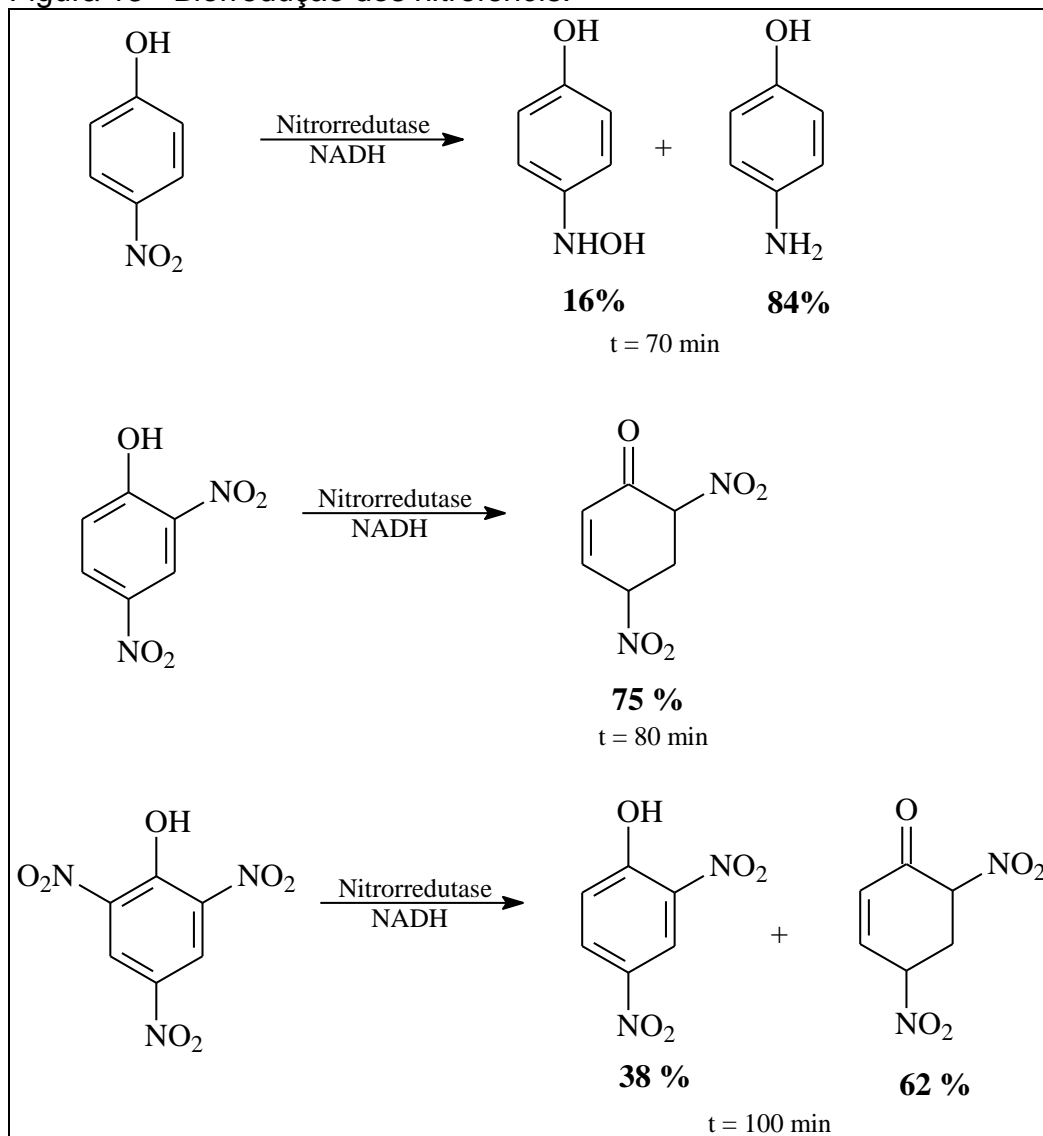
Dados epidemiológicos indicam que os nitrocompostos aromáticos (nitrobenzeno, dinitrotolueno, mono e dinitrofenóis) são poderosos agentes cancerígenos, e são, conseqüentemente, referidos como poluentes prioritários. Pelos motivos apresentados, os fluxos gerados desde a produção de mono-, di-, poli-nitro aromáticos são regulados pela Agencia de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos de resíduos tóxicos (NISHINO; SPAIN; HE, 2000).

O aumento da consciência pública sobre os riscos da toxicidade desses compostos foi incentivado por tecnologias econômicas para removê-los, pois diversos métodos físicos convencionais, tais como, volatilização, hidrólise, absorção, foto-oxidação, incineração, e outros processos são usados para sua remoção, e como esses métodos têm muitos problemas, tais como, baixa eficiência, custo elevado e não sustentável (CHAUHAN; SAMANTA; JAIN, 2001). Logo, buscaram-se processos alternativos mais eficientes, baratos, sustentáveis e biodegradáveis, como biorremediação que emprega sistemas biológicos para catalisar a degradação ou transformação de moléculas recalcitrantes a substâncias menos tóxicas ou não tóxicas.

Um exemplo de aplicação da técnica de biorremediação foi o emprego de *Rhodococcus* sp. CN6, isolado de sedimentos de efluentes de uma indústria de pesticidas. Este foi capaz de degradar completamente 4-nitrofenol (100 mg/L) como o carbono, nitrogênio e fontes de energia para o crescimento nos meios mínimos de sal em 12 horas (ZHANG; SUN; LI EL, 2008). Um outro trabalho cita uma bactéria do mesmo gênero, *Rhodococcus* sp. Ns, isolada de um sedimento de mangue que foi capaz de degradar completamente o *p*-nitrofenol e *o*-nitrofenol (WAN *et al.*, 2007).

Recentemente, um trabalho relatou a redução dos compostos 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol e 2,4,6-trinitrofenol catalisados por nitrorredutase do microorganismo *Escherichia coli*, na presença de NADH com otimização do tempo e concentrações do cofator. Os esquemas reacionais estão ilustrados na Figura 13 (p. 29). A maior conversão (84%) foi obtida em 70 minutos para o 4-nitrofenol, seguido do 2,4-dinitrofenol (75%) em 80 minutos e 2,4,6-trinitrofenol (62%) em 100 minutos (DAÍ *et al.*, 2009). Foi verificado que quanto mais substituído o composto menor sua redução.

Figura 13 - Biorredução dos nitrofenóis.



Fonte: DAI *et al.*, 2009.

Atualmente, os cientistas estão mais atentos na redução dos nitrocompostos, catalisadas por células inteiras e enzimas, onde há um considerável interesse no desenvolvimento de leve e quimiosseletividade biocatalítica como rotas alternativas (ROZZELL, 1999; HOLLAND, 1998; CHAUDHARI; KULKARNI, 2007).

3.9 Vantagens e desvantagens dos biocatalisadores

Em contraste com os catalisadores inorgânicos como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos, as enzimas têm alta especificidade, isto é,

formam produtos seletivamente. Esta característica é muito útil nos processos industriais, porque leva a formação de quantidades mínimas de produtos secundários, o que representa benefícios econômicos e ambientais, com a eliminação da necessidade de separação de subprodutos e redução qualitativa e quantitativa de efluentes industriais.

As enzimas também ganharam um lugar de destaque para os químicos orgânicos por serem catalisadores seletivos. Elas se caracterizam por apresentarem elevada quimiosseletividade, regioseletividade e estereosseletividade nas reações que catalisam. Além disso, o químico sintético considera uma grande vantagem a utilização de catalisadores que dispensem a proteção de grupos lábeis nos reagentes. Com relação a outros catalisadores, as enzimas apresentam as seguintes vantagens (FABER, 1997; NAKAMURA *et al.*, 2003):

↳ **São biocatalisadores eficientes e ambientalmente adequados:** comparados aos processos químicos, os processos mediados por enzimas são mais efetivos e fáceis de serem realizados. Podem ser decompostos sem prejudicar o meio ambiente, pois são, na maioria dos casos, biodegradáveis, diferentemente dos catalisadores de metais pesados que geram resíduos altamente tóxicos.

↳ **Reagem em condições reacionais brandas:** atuam no metabolismo de células vivas à pressão atmosférica, temperatura ambiente (ou levemente superiores) e pH próximo ao neutro. As reações enzimáticas minimizam os problemas como isomerização, racemização, epimerização e rearranjos que, muitas vezes, são fatores limitantes nos processos químicos.

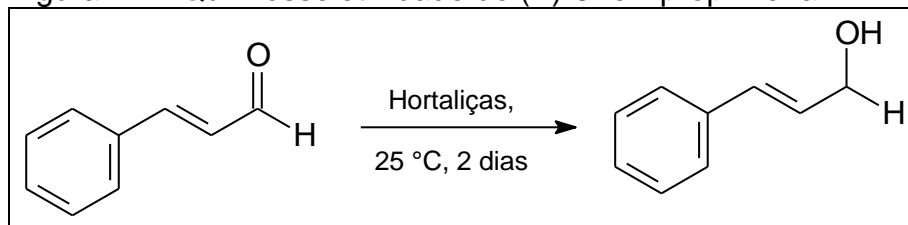
↳ **São compatíveis entre si:** por agirem usualmente em condições similares, diversas reações biocatalíticas podem ser feitas em um mesmo meio reacional, proporcionando a possibilidade de conduzir reações seqüenciais usando sistemas multienzimáticos. Essa metodologia pode ser muito útil quando existe a possibilidade de formar um intermediário instável em um dos passos da biotransformação.

↪ **Aceitam substratos não naturais:** mostram ampla tolerância a substratos não naturais e, se vantajoso para o procedimento, podem atuar em solventes orgânicos, em substituição ao meio aquoso usualmente utilizado.

↪ **Apresentam os principais tipos de seletividade:**

- **Quimiosseletividade:** atua em um único tipo de grupo funcional, conservando outras funções existentes e desejáveis na molécula. Um exemplo dessa seletividade é demonstrado por Suárez-Franco e colaboradores (2010) onde o substrato (*E*)-3-fenilprop-2-enal foi reduzido somente na carbonila ao (*E*)-3-fenilprop-2-enol usando culturas de células de quatro vegetais, tais como: *B. oleracea* var. *itálica* (brócolis), *B. oleracea* var. *botrytis* (couve-flor), *B. vulgaris* var. *cicla* (acelga) e *Spinacia oleracea* (espinafre) com bioconversões \geq 99% durante 24 horas (Figura 14).

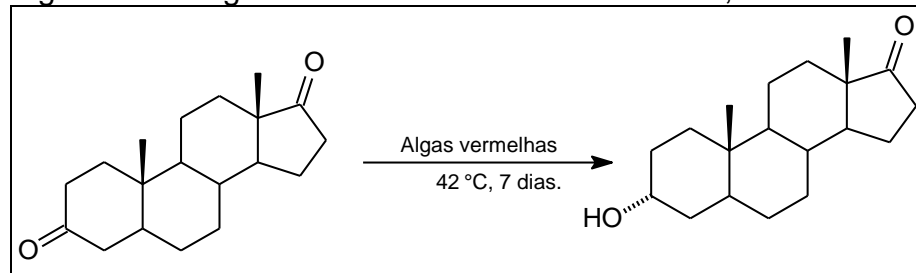
Figura 14 – Quimiosseletividade de (*E*)-3-fenilprop-2-enal.



Fonte: SUÁREZ-FRANCO *et al.*, 2010.

- **Regiosseletividade:** por ser uma estrutura tridimensional complexa, as enzimas conseguem distinguir entre grupos funcionais quimicamente semelhantes, situados em diferentes regiões de uma mesma molécula do substrato. Como exemplo, pode-se observar a Figura 15 (p. 32), que mostra a biorredução da 5 α -androstan-3,17-diona (cetona esteroidal) utilizando como biocatalisadores duas espécies de algas vermelhas, *C. merolae* e *C. caldarium*, onde foi reduzida somente a carbonila da posição 3, fornecendo como produto majoritário a 3 α -hidroxi-5 α -androstan-17-ona em conversões de 80 e 78%, respectivamente (HORIUCHI *et al.*, 2006).

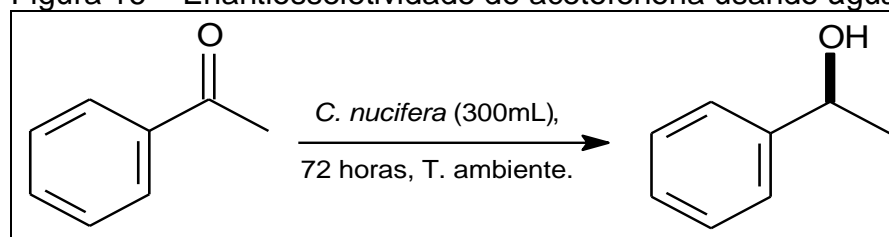
Figura 15 – Regiosseletividade de 5 α -androstan-3,17-diona.



Fonte: HORIUCHI *et al.*, 2006.

- Enantiosseletividade:** as enzimas são quase todas formadas por L-aminoácidos, que são considerados catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade ou pró-quiralidade presente no substrato é reconhecida durante a formação do complexo enzima-substrato. Portanto, substratos pró-quirais podem ser transformados em produtos opticamente ativos e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico reagem em distintas velocidades, permitindo a resolução cinética. Um modo de explicar a enantiosseletividade das reações enzimáticas é através do modelo dos três pontos, descrita no subitem 3.3.1.3 (p. 15). Diversos trabalhos reportam a enantiosseletividade das enzimas de micro-organismos utilizados como biocatalisadores, especialmente fungos. Porém, há poucos relatos sobre fontes vegetais que apresentam boa seletividade enantiomérica. *C. nucifera* (coco) foi um exemplo de biocatalisador de alta enantiosseletividade, utilizado na redução da acetofenona para obtenção do 1-feniletanol com excesso enantiomérico >99% do enantiômero S, Figura 16 (FONSECA *et al.*, 2009).

Figura 16 – Enantiosseletividade de acetofenona usando água de coco.



Fonte: FONSECA *et al.*, 2009.

Entretanto, existem também algumas desvantagens no uso de biocatalisadores, que devem ser consideradas (FABER, 1997).

↳ **Forma enantiomérica única:** as enzimas estão presentes na natureza em uma única forma enantiomérica, tornando impossível inverter a indução de uma reação biocatalisada pela escolha do outro enantiômero do biocatalisador.

↳ **Alergias:** as enzimas podem causar reações alérgicas se não forem manipuladas adequadamente.

↳ **Parâmetros específicos:** a vantagem de operar sob condições brandas pode se tornar um obstáculo quando as reações biocatalisadas ocorrem apenas lentamente nas condições naturais de temperatura, concentrações e pH.

↳ **Atividade catalítica máxima em meio aquoso:** a maioria dos compostos orgânicos são pouco solúveis em água e a mudança para solventes orgânicos pode causar a perda da atividade enzimática.

↳ **Inibição pelo substrato ou produto:** os sistemas enzimáticos são sujeitos a inibição, mas pode ser contornado mantendo-se a concentração do substrato em níveis aceitáveis e retirando-se gradualmente o produto formado.

↳ **Cofatores:** algumas enzimas necessitam de cofatores, materiais caros e de difícil recuperação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizada uma triagem utilizando várias espécies vegetais buscando selecionar a mais ativa na biorredução da acetofenona (**1**), utilizada como substrato modelo. Em seguida, os vegetais que exibiram redução foram analisados para determinação do teor de proteínas pelos métodos de Lowry e Bradford.

Posteriormente, utilizando como potencial biocatalisador células íntegras do vegetal selecionado e como substrato acetofenona (**1**), foi realizado um estudo para otimizar as condições de reação, tendo em vista a conversão e a obtenção do excesso enantiomérico (*ee*), observando a influência da quantidade de biocatalisador, tempo da reação, velocidade de rotação e meio reacional. Em seguida, outros substratos (uma série de derivados da acetofenona) foram também testados para reação de redução utilizando os parâmetros selecionados através da acetofenona (**1**). Foi avaliada, ainda, a capacidade catalítica do vegetal com relação a outros compostos carbonílicos, como cetonas alifáticas e aromáticas, aldeídos, ésteres e nitrocompostos.

A análise dos produtos foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) para conversão, e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para os excessos enantioméricos (*ee*).

4.1 Triagem das espécies vegetais

A cetona aromática acetofenona (**1**) (Figura 18, p. 36) foi submetida à reações de biotransformação utilizando diferentes fontes vegetais, como: *Luffa operculata* (sementes de cabacinha)-LF, *Lens culinaris* (sementes de lentilha)-LC, *Zea mays* (sabugo de milho)-SM e *Zea mays* (grão de milho)-GM, *Punica granatum* (cascas de romã)-CR e *Punica granatum* (sementes de romã)-SR (Figura 17, p. 36), utilizando metodologia descrita no subitem 5.4.2 (p. 106) do procedimento experimental.

A confirmação dos produtos obtidos ocorreu inicialmente por comparação em CCD entre os *R_f*'s do material de partida (acetofenona) e do produto (1-

feniletanol), em cada reação de biorredução. O teor de conversão foi determinada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). O cromatograma da mistura de reação apresentou dois picos com tempos de retenção (tr) de 5,7 e 5,8 minutos, associados aos 1-feniletanol (**1a**) e acetofenona (**1**), respectivamente (Figura 19, p. 37), e os respectivos espectros de massas com picos íon molecular m/z 122 e 120, para o álcool e a cetona, respectivamente, são vistos nas Figuras 20 e 21 (p. 37)

Os excessos enantioméricos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna quiral OD-H, através dos picos dos enantiômeros *R/S* do 1-feniletanol (produto da biorredução) (Figura 22, p. 38).

A configuração absoluta do álcool quiral obtido majoritariamente foi determinada a partir da medida polarimétrica da rotação óptica do produto de biorredução **1**, após purificação parcial. O valor de $[\alpha]_{589}^{20}$ para o álcool (*S*)-(-)-1-feniletanol citado na literatura foi - 22,9 (1,0 g/mL, diclorometano) (BARROS-FILHO *et. al.*, 2009), enquanto a rotação óptica obtida para o produto reacional do presente trabalho foi -18 (0,08 g/mL, diclorometano). Por comparação dos dados citados acima confirmou-se que a mistura enantiomérica apresentou um excesso do álcool (*S*)-(-)-**1a**. Assim, no cromatograma (Figura 22, p. 38) o pico de maior área em, aproximadamente, 11,4 minutos foi atribuído ao enantiômero (*S*)-1-feniletanol. Este procedimento foi utilizado para a determinação da configuração absoluta dos outros álcoois quirais obtidos nas reações de biorredução.

Os valores referentes à conversão (calculado a partir do método de normalização da área dos picos nos correspondentes cromatogramas) e ao ee (calculado com base na fórmula da página 108) para cada vegetal são demonstrados na Tabela 6 (p. 36).

Figura 17 – Fotografia dos vegetais usados na biorredução.



Fonte: Daniele Alves Ferreira

Figura 18 – Esquema reacional de biorredução da acetofenona (1).

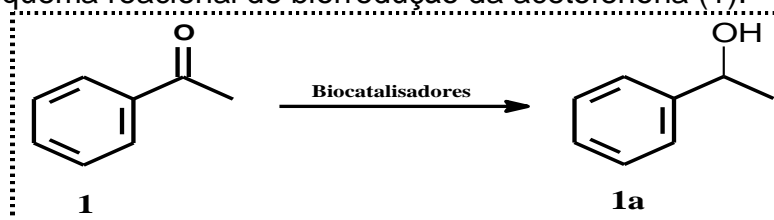


Tabela 6 – Resultados obtidos nas biorreduções e seus respectivos biocatalisadores.

Biocatalisadores	Conversão (%)	ee (%) – Configuração
Semente de cabacinha	N. R.	-
Semente triturada de Lentilha	17	75 – S
Grãos de milho	4	79 – S
Sabugo do milho	40	9 – S
Cascas de romã	6	15 – S
Sementes de romã	13	81 – S

N.R. – Não Reagiu.

Após a análise dos resultados das reações, verificou-se que quase todos os vegetais estudados apresentaram ação biocatalítica frente à acetofenona (**1**), com exceção das sementes de *L. Operculata* (cabacinha). Dentre os que exibiram resultados positivos, os grãos de milho apresentaram a menor conversão (4%), porém com bom ee (79%-S). O sabugo de milho foi o que revelou maior conversão (40%), contudo, com o menor ee (9%-S). Já as sementes de lentilha e romã foram as que apresentaram melhor resultado tanto para conversão quanto para o excesso enantiomérico originando o álcool com a configuração Prelog.

Figura 19 – Cromatograma CG-EM da biorredução da acetofenona (**1**) usando *Lens Culinaris*.

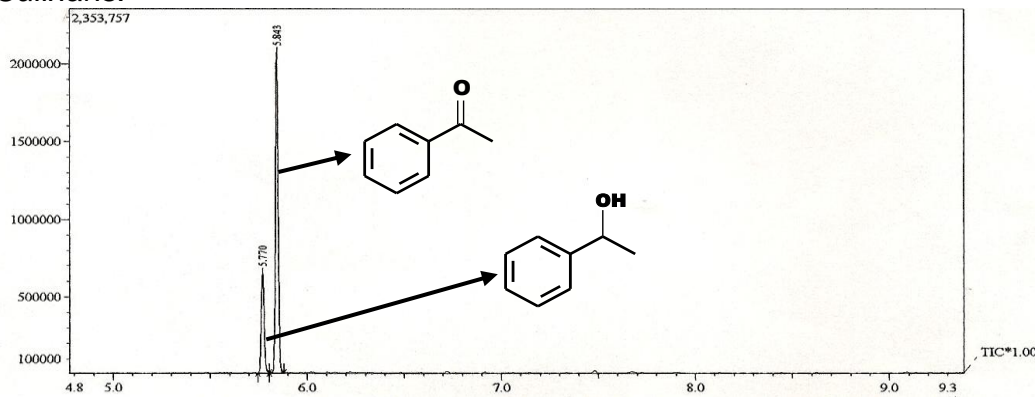


Figura 20 – Espectro de massas do feniletan-1-ol (**1a**), tr: 5,77 min.

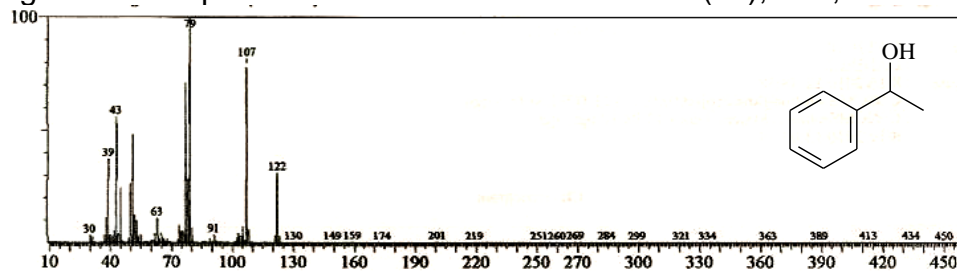


Figura 21 – Espectro de massas do acetofenona (**1**), tr: 5,84 min.

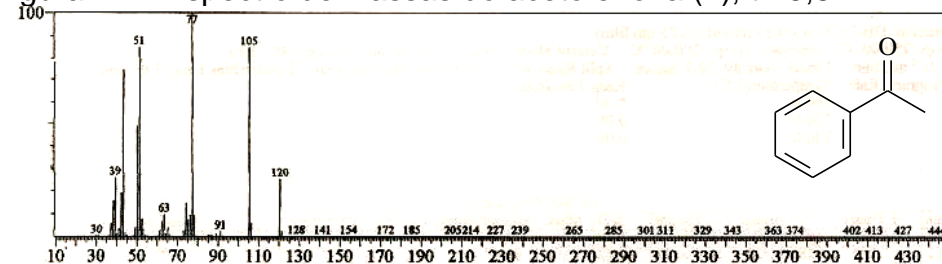
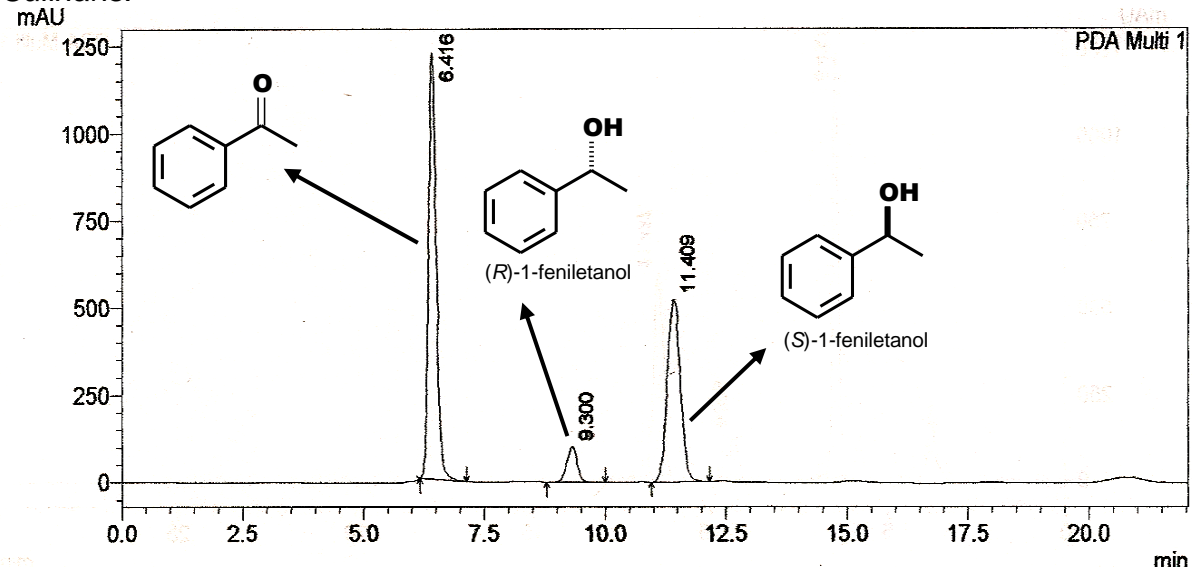


Figura 22 – Cromatograma CLAE da biorredução da acetofenona (1) usando *Lens Culinaris*.



4.2 Determinação de proteínas

Neste tópico foram relatados somente os vegetais que apresentaram atividade biocatalítica frente à reação com a acetofenona (1), com a finalidade de estimar a quantidade de enzimas no material, uma vez que a grande maioria das enzimas são proteínas.

Os extratos vegetais analisados foram os de *Lens culinaris* (sementes de lentilha)-LC, *Zea mays* (sabugo de milho)-SM e *Zea mays* (grão de milho)-GM, *Punica granatum* (cascas de romã)-CR e *Punica granatum* (sementes de romã seca e sementes de romã inteira)-SRS e SRI (Figura 23, p. 40). A determinação de proteínas solúveis nesses extratos foi realizada por dois métodos: Lowry (HARTREE, 1972) e Bradford (BRADFORD, 1976). Segundo a literatura, os dois métodos são utilizados como indicativo da quantidade de proteínas em plantas (MARKS; BUCHNSBAUM; SWAIN, 1985; MATTOO; ISHAQ; [SALEEMUDDIN](#), 1987). Segundo Zaia (1998), ambos os métodos são bastante sensíveis, sendo o de Bradford mais rápido.

4.2.1 Método de Lowry

A determinação de proteínas utilizando o método proposto por Lowry (modificado por Hartree, 1972) foi realizada nos extratos vegetais LC, SM, GM, CR, SRS e SRI. É o método mais utilizado e baseia-se na redução do reagente Folin-Ciocalteal (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) quando posto em contato com a proteína na presença de cobre (II). Em solução alcalina produz um complexo de coloração azul com absorção máxima em 650 nm (MIWA, 2003; OKUTUCU *et al.*, 2007).

A metodologia usada encontra-se descrita no subitem 5.3.1. (p. 104) do procedimento experimental e os resultados referentes às concentrações de proteínas dos extratos das plantas são expostos no Gráfico 3 (p. 40).

Os resultados mostraram que os extratos CR (casca da romã) e SRI (semente de romã inteira) apresentaram os maiores teores de proteínas (4,98 e 3,54 mg/mL, respectivamente), muito superior ao observado para os outros. Estas concentrações altas, devido esse vegetal ser rico em compostos fenólicos e taninos (JARDINI, 2005), pois são interferentes mais comuns neste método. Comparando os extratos das sementes secas (0,52 mg/mL) e inteiras (3,54 mg/mL) da romã o teor maior foi das sementes inteiras, pois continha açúcar que também é um interferente no método de Lowry.

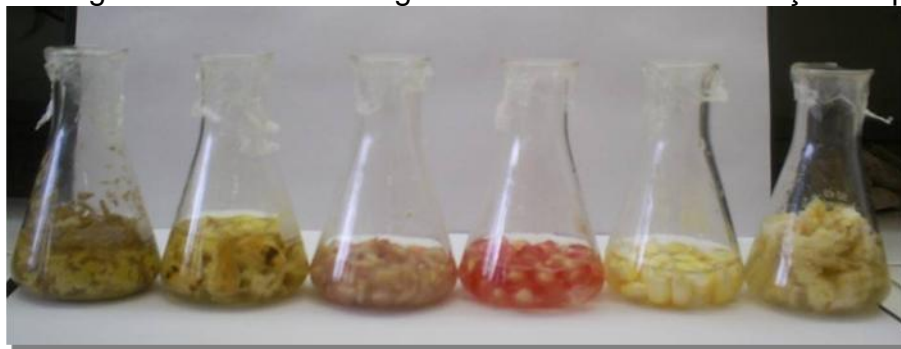
4.2.2 Método de Bradford

É um método que utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue BG-250 que interage com macroproteínas que contém aminoácido de cadeia laterais básicas ou aromáticas. A interação entre as proteínas de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para forma aniônica, absorvendo fortemente em 595 nm (COMPTONS; JONES, 1985). Logo, este método consiste na fixação de corantes na superfície das enzimas.

A metodologia usada encontra-se descrita no subitem 5.3.2. (p. 105) do procedimento experimental e os resultados referentes às concentrações de proteínas dos extratos das plantas são demonstrados no Gráfico 3 (p. 40).

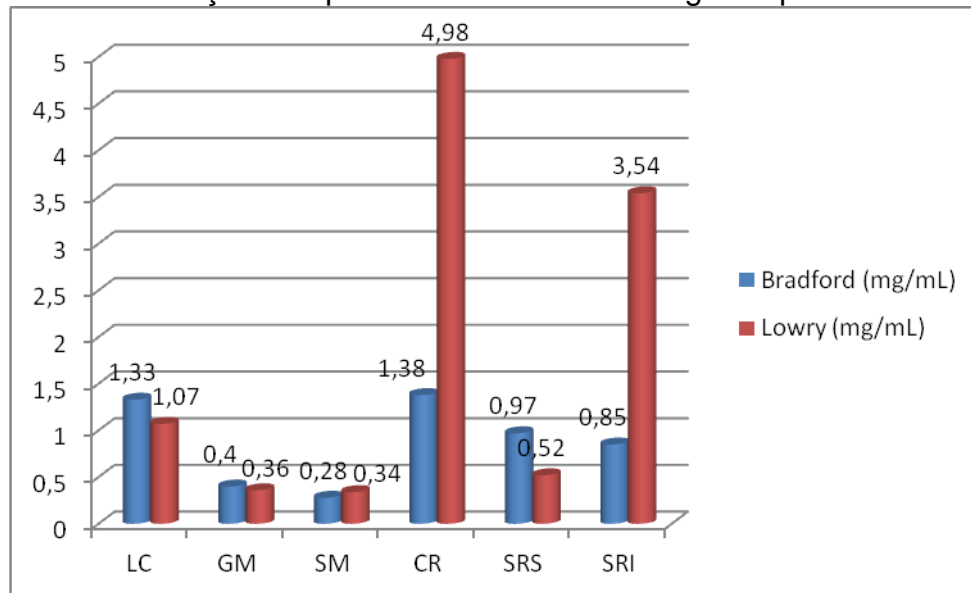
O método de Bradford também foi utilizado para determinação do teor de proteínas dos extratos vegetais, visando comparação com o resultado obtido para o método de Lowry. Novamente, o extrato que revelou maior teor de proteínas foi o CR (1,38 mg/mL), porém, bem inferior ao observado pelo método de Lowry (4,98 mg/mL). Este resultado sugere que CR, e todos os extratos testados, apresentam uma quantidade reduzida de proteínas de alto peso molecular (neste método a interação com o corante depende sensivelmente do tamanho da proteína).

Figura 23 – Fotografia dos extratos vegetais usados na determinação de proteínas.



Fonte: Daniele Alves Ferreira

Gráfico 3 – Concentrações de proteínas dos extratos vegetais por dois métodos.



De acordo com os dados acima, verificou-se que os extratos vegetais apresentaram concentrações bem variadas. As cascas de romã mostraram o maior teor de proteínas pelos dois métodos (1,38 e 4,98 mg/mL) comparados com os

outros vegetais. Já os extratos de milho (GM e SM) mostraram os menores teores de proteínas pelos dois métodos.

Avaliando os parâmetros estudados, potencial biocatalítico, teor de proteínas e disponibilidade do vegetal no mercado, selecionou-se *Lens culinaris* (LC) para realização de uma investigação mais aprofundada do seu potencial biocatalítico.

4.3 Otimização da biorredução da acetofenona (1)

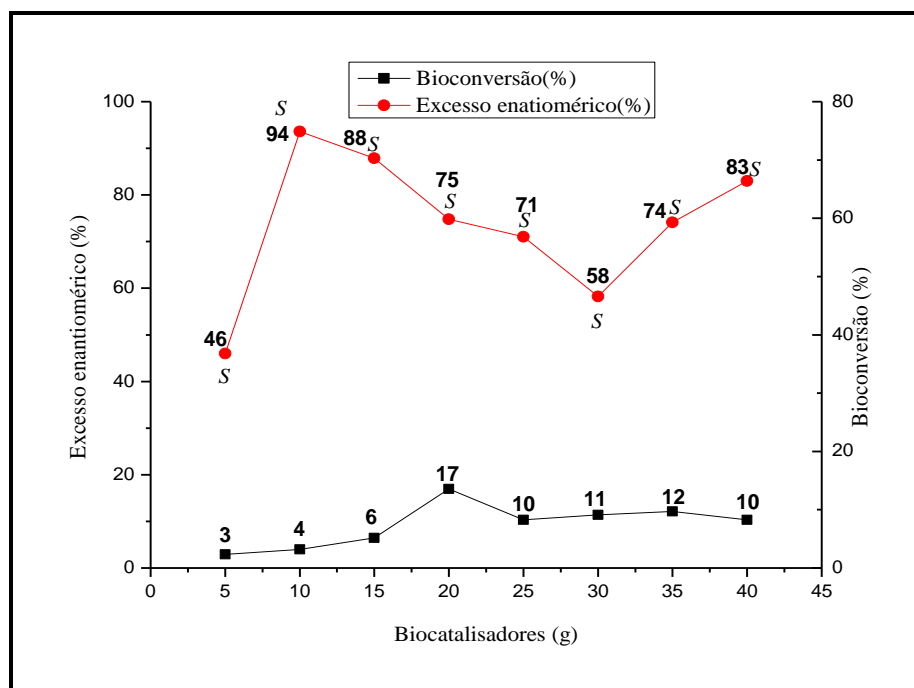
Após seleção de *Lens culinaris* (LC) como biocatalisador buscou-se avaliar o seu potencial biocatalítico utilizando acetofenona (1) como substrato modelo na otimização das condições de biorredução. Os parâmetros testados foram: concentração de biocatalisador, cinética, velocidade de agitação e meio reacional.

4.3.1 Concentração do biocatalisador

O primeiro estudo envolveu a determinação da quantidade (concentração) ideal de biocatalisador. As quantidades foram variadas de 5 em 5 g (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 g). Inicialmente, o experimento foi realizado usando acetofenona (100 mg) com lentilha fresca em água destilada (80 mL) que foi então, incubada sob ação de um agitador (150 rpm) a temperatura de 30 °C durante 72 horas. Foi observado que a conversão aumentou gradualmente (3-17%) com o aumento da concentração do biocatalisador até 20 g, ocorrendo em quantidades superiores, um decréscimo na conversão, que se manteve aproximadamente constante até 40 g (10-12%).

Os excessos enantioméricos variaram entre 46 e 94% para os alcoóis de configuração *S* (Prelog) apresentando melhores resultados quando utilizados 10 g de biocatalisador. No entanto, avaliando o conjunto (conversão e ee), o melhor resultado foi para 20 g do biocatalisador que resultou em 17% de conversão e 75% de ee. Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 24 (p.42).

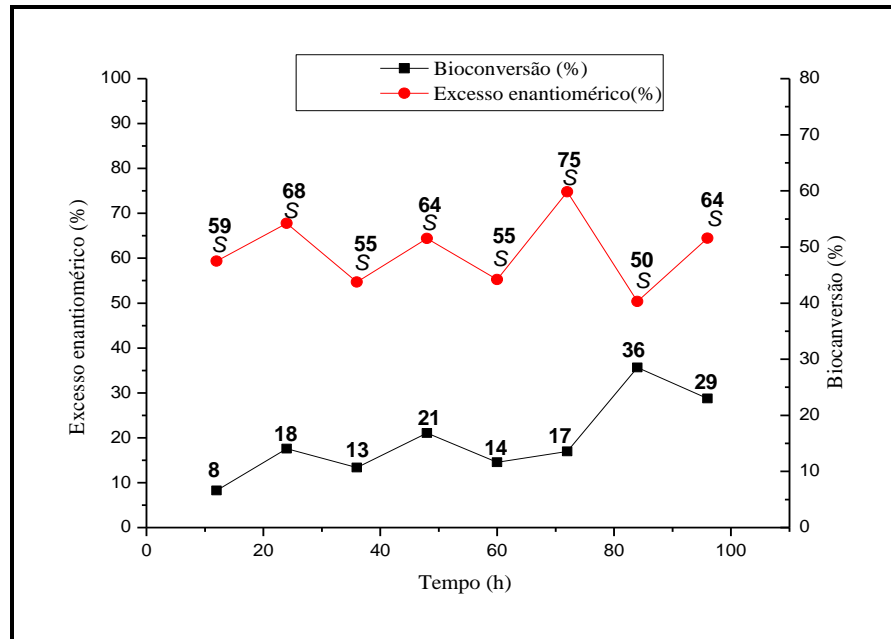
Figura 24 – Otimização de quantidade de biocatalisador (lentilha).



4.3.2 Cinética da reação

O tempo de reação ideal foi determinado através da análise dos produtos obtidos da reação em intervalos de 12 horas (12-96 h). As condições do experimento foram mantidas, incluindo a quantidade otimizada de biocatalisador (20 g). A bioconversão variou entre 8-36 % e o ee entre 55-75% (todos com configuração S), Figura 25 (p. 43). Após 84 horas de reação foi observada a melhor conversão (36%), mas com apenas 50% de ee (S). Já em 72 horas houve apenas 17% de conversão, com o melhor ee (75%). Com a reação efetuada durante 84 horas foi observado um decréscimo no rendimento do álcool, provavelmente, devido a presença de alguma álcool desidrogenase no sistema. Considerando que produtos assimétricos de maior pureza enantiomérica têm maior interesse comercial, selecionamos 72 horas como melhor tempo para a reação.

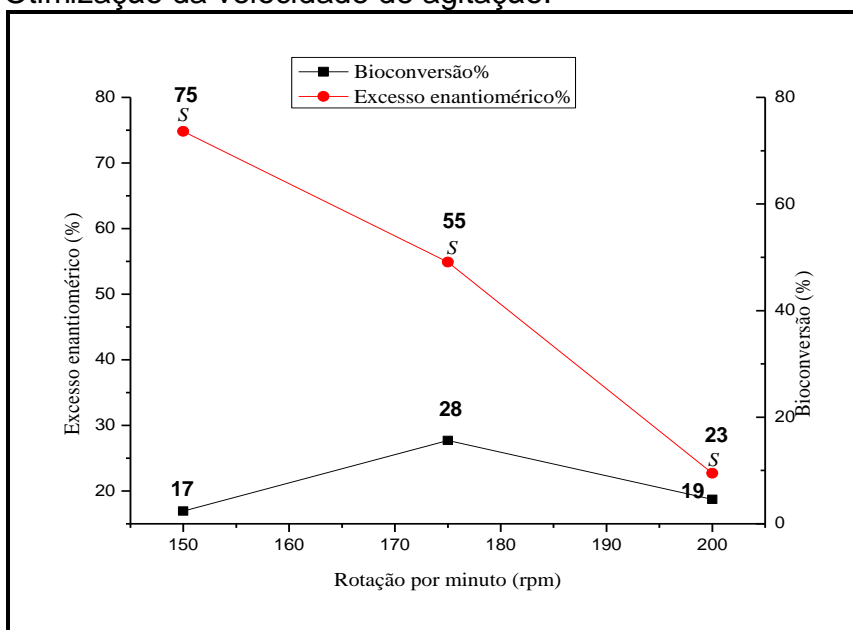
Figura 25 – Otimização da cinética da reação de 12 à 96 horas.



4.3.3 Velocidade de agitação

Foi observada também a variação do rendimento da reação em função da velocidade de agitação. Observação nos valores de 150, 175 e 200 rotação por minuto (rpm), mostrou um aumento razoável na conversão quando a velocidade de rotação variou de 150 rpm (17%) a 175 rpm (28%), seguido de diminuição a 200 rpm (19%). Como a pureza enantiomérica foi consideravelmente reduzida com o aumento da velocidade de rotação, selecionamos 150 rpm como a melhor velocidade de agitação da reação (Figura 26, p. 44).

Figura 26 – Otimização da velocidade de agitação.



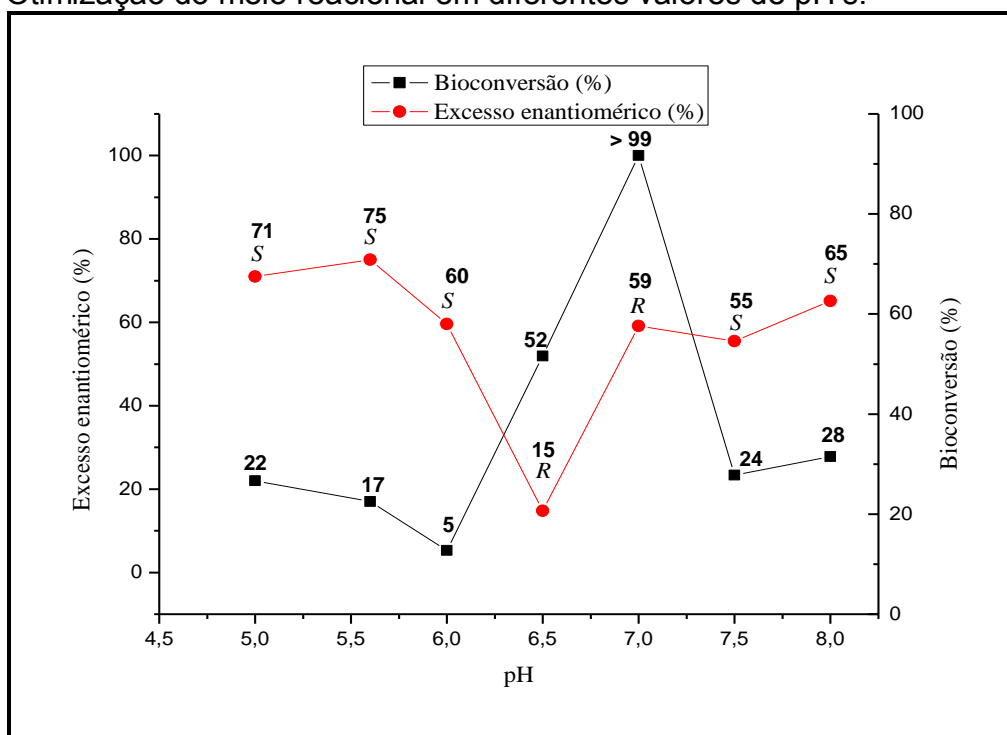
4.3.4 Meio reacional

Finalmente, foi avaliada a influência do pH do meio sobre o rendimento e o ee da reação de biorredução com *Lens culinaris*. Inicialmente, o pH da água destilada, meio reacional utilizado nos experimentos anteriores, foi medido obtendo-se um valor a 5,6. Nesta condição (pH 5,6), embora com uma baixa taxa de conversão (17%), foi observado o melhor excesso enantiomérico (75%) para o álcool com configuração S. Em seguida, variou-se o pH do meio entre 6,0 e 8,0 (intervalos de 0,5 unidades) foi ajustado através de diferentes relações entre os sais $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Figura 27, p. 45).

Em pH 6,0 (conversão 5% e ee 60%-S) observou-se uma queda na atividade enzimática e no ee em comparação com pH 5,6 (conversão 17% e ee 75%-S). Aumento do pH para 6,5 provocou acréscimo na atividade enzimática (52 % de rendimento), acompanhado de uma queda dramática no ee (15 %) e com inversão da configuração do álcool (anti-Prelog). Em pH 7,0, o ápice da atividade enzimática foi verificado (conversão >99%) juntamente com um bom ee (59%) do álcool anti-Prelog, indicando uma melhor condição de trabalho para o complexo enzimático com relação à conversão. Em pH's acima de 7,0, houve drástica redução na atividade

enzimática e, novamente, houve inversão na configuração do álcool (regra de Prelog). Adicionalmente, buscando avaliar o comportamento do sistema enzimático em pH abaixo de 5,6 (água destilada), a reação foi conduzida em pH 5,0, ocorrendo um aumento de conversão (22%), porém com diminuição do ee (71%-S) em relação a reação ao pH 5,6. Resultados semelhantes relacionadas à mudança de comportamento de sistemas enzimáticos vegetais em função de variações no pH do meio reacional foram observados e, poderiam ser devidos a diferentes solubilidade dos compostos em meio aquoso (SUAREZ-FRANCO *et al.*, 2010) ou a um processo de enolização (DEUSSEN *et al.* 2003).

Figura 27 – Otimização do meio reacional em diferentes valores de pH's.



4.4 Biorreduções de cetonas aromáticas pró-quirais

Estabelecidas as melhores condições reacionais para o sistema enzimático de *Lens culinaris*, utilizando acetofenona como substrato modelo, estendeu-se o estudo para outras cetonas pró-quirais (derivados da acetofenona e α -tetralona). A capacidade de biorredução de LC frente a grande maioria dos novos substratos foi avaliada tendo meios reacionais a água destilada (melhor excesso

enantiomérico) e uma solução tampão fosfato pH 7,0 (melhor conversão) utilizando as mesmas condições otimizadas com acetofenona.

O estudo levou em conta à influência dos substituintes no anel aromático na reatividade do complexo enzimático, procurando avaliar fatores estéricos e eletrônicos considerando à posição relativa e a natureza dos substituintes. Para efeito de discussão as cetonas pró-quirais foram divididas em acetofenona diversamente substituída com átomos ou grupos desativadores do anel aromático (halogênios e nitro) e acetofenona com átomos ou grupos ativadores do anel aromático (-OH, -OCH₃, -CH₃ e -NH₂).

4.4.1 Acetofenonas halogenadas

As acetofenonas halogenadas foram 2-bromoacetofenona (**2**), 3-bromoacetofenona (**3**), 4-bromoacetofenona (**4**), 4-cloroacetofenona (**5**) e 4-fluoroacetofenona (**6**) (ver Esquema 3, p. 48).

Mesmo considerando a conhecida anomalia exercida pelos halogênios nas reações da química orgânica em geral, algumas observações puderam ser anotadas. Inicialmente, foi observado que a presença dos substituintes (Br, Cl e F) retiradores de elétrons no anel aromático aumentou a reatividade das cetonas (**2-6**) com obtenção dos alcoóis (**2a-6a**) em rendimentos superiores ao do 1-feniletanol (**1a**) com a reação conduzida em água destilada. Os compostos halogenados, com exceção do clorado, foram muito reativos, especialmente os bromados (**2-4**), com destaque para o isômero *orto* que produziu o álcool com excelentes excesso enantiomérico ($\geq 97\%$) e conversão ($> 99\%$) nos dois meios reacionais (não foi observado influência estérica sobre o curso da reação). Com exceção da acetofenona, que em solução tampão com pH 7,0 produziu o álcool *R*, todos os alcoóis foram obtidos com configuração segundo Prelog.

No derivado **3** (bromo na posição *meta*) foi observado uma maior conversão em relação ao **4** (bromo na posição *para*), contrariamente aos excessos enantioméricos (*ee*), onde em **3** foi menor que em **4**, em ambos os meios reacionais.

No tocante aos derivados **4** e **5** (contendo os halogênios Bromo e Cloro, respectivamente, na posição *para*), quando comparados entre si, foi observado um

comportamento uniforme em relação à conversão e ao ee. Assim, **4** e **5** produziram os respectivos álcoois **4a** e **5a** com maior conversão e maior ee tanto em água destilada como em pH 7,0. Comentando esses resultados de um modo geral, em relação aos substratos **2**, **3** e **4**, a ordem de reatividade, considerando a posição do átomo do halogênio bromo no anel aromático foi *orto*>*meta*>*para* para a conversão e *orto*>*para*>*meta* para o ee, com as reações conduzidas em água destilada e no tampão pH 7,0. Quando *p*-bromoacetofenona (**4**), *p*-cloroacetofenona (**5**) e *p*-fluoroacetofenona (**6**) foram tratados com lentilha nas condições de biorredução empregadas em pH 5,6 (água destilada), os álcoois quirais (*S*) **4a** e **6a** foram obtidos com boa conversão (79% para ambos) e alta enantiosseletividade (88 e 90 %, respectivamente) com resultados comparáveis a aqueles obtidos pela redução desses substratos com *Daucus carota* (YADAV *et al.*, 2002). Já, o substrato **5** foi reduzido ao correspondente (*S*)-álcool **5a** com boa enantiosseletividade (74%) mas com baixo rendimento (19%). Por outro lado, em pH 7,0, *L. culinaris* produziu os álcoois **4a**, **5a** e **6a** em ordem decrescente de conversão e de ee (Tabela 8, p. 48). Os valores obtidos para as conversões (**4a**, 70%; **5a**, 18%; **6a**, 13%) foram coerentes com a ordem esperada, considerando a capacidade dos átomos de halogênios de doar elétrons por conjugação para o anel aromático (F>Cl>Br), em pH 7,0.

As configurações absolutas dos álcoois **1a-6a**, após purificação parcial, foram atribuídas por comparação do sinal da rotação óptica específica descrita na literatura (Tabela 7, p. 48). Os produtos reacionais foram analisados através de CG-EM e CLAE e os cromatogramas estão demonstrados nas Figuras 28-43, p. 49-53.

Esquema 3 – Biorredução das acetofenonas halogenadas.

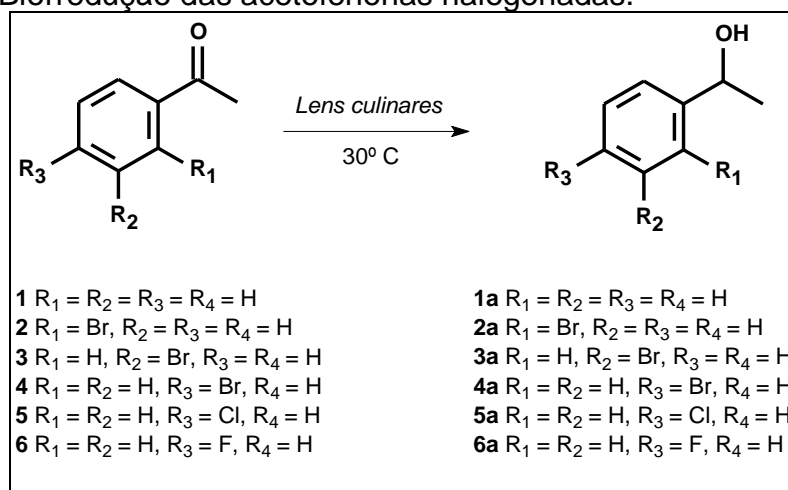


Tabela 7 – Configurações absolutas dos produtos de biorredução das acetofenonas halogenadas comparados com os da literatura.

Entrada	Composto	$[\alpha]^{20}_{589}; [c]^a -R/S$	$[\alpha]^{20}_{589}; [c]^b -R/S$	Literatura
1	1-feniletanol	-18; [0,080]-S	-22,9; [1,0]-S	BARROS-FILHO <i>et. al.</i> , 2009.
2	1-(2-bromofenil)-etanol	-11; [0,069]-S	-50,45; [1,33]-S	CHATTOPADH; SALVI, 2008.
3	1-(3-bromofenil)-etanol	-15; [0,062]-S	-25; [1,33]-S	CHATTOPADH; SALVI, 2008.
4	1-(4-bromofenil)-etanol	-13; [0,064]-S	-37,3; [1,1]-S	HORIUCHI <i>et. al.</i> , 2006.
5	1-(4-clorofenil)-etanol	-11; [0,072]-S	-45; [0,9]-S	HORIUCHI <i>et. al.</i> , 2006.
6	1-(4-fluorofenil)-etanol	-26; [0,041]-S	-40; [0,9]-S	HORIUCHI <i>et. al.</i> , 2006.

^a produto da biorredução^b dados comparados da literatura

[c] concentração

Tabela 8 – Resultados da biorredução de acetofenonas halo-substituíntes em dois meios reacionais.

Entrada	Cetona	Substituinte	Meio reacional			
			Água destilada		Solução tampão pH 7	
			c^a (%)	ee^b (%)	c^a (%)	ee^b (%)
1	1	H	17	75 - S	>99	59 - R
2	2	2-Br	>99	97 - S	>99	99 - S
3	3	3-Br	>99	70 - S	93	28 - S
4	4	4-Br	79	88 - S	70	87 - S
5	5	4-Cl	19	74 - S	18	70 - S
6	6	4-F	79	90 - S	13	55 - S

^a Conversão

(c) determinado por CG-EM

^b excesso enantiomérico (ee) por CLAE.

Figura 28 – Cromatograma obtido por GC-EM do produto da biorredução da 2-bromoacetofenona (2) em pH 7.0 com LC.

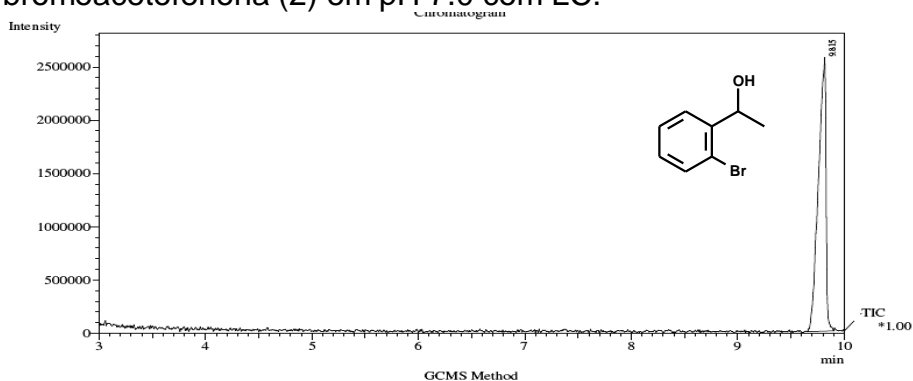


Figura 29 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução da 2-bromoacetofenona (2) em pH 7.0 com LC.

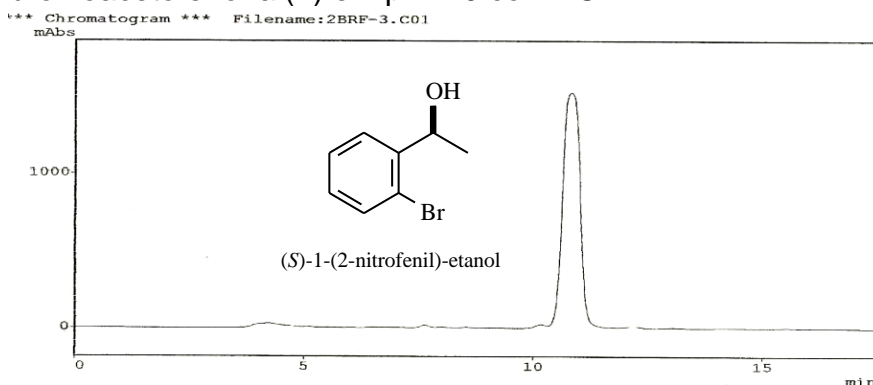


Figura 30 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução da 3-bromoacetofenona (3) em água destilada com LC.

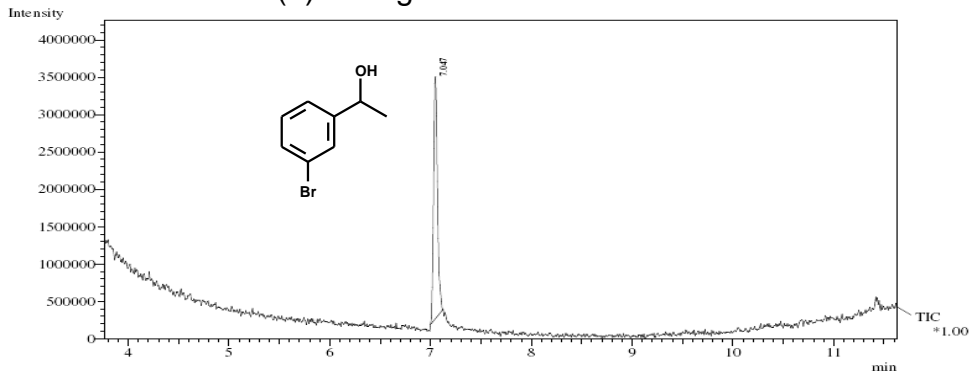


Figura 31 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução da 3-bromoacetofenona (3) em água destilada com LC.

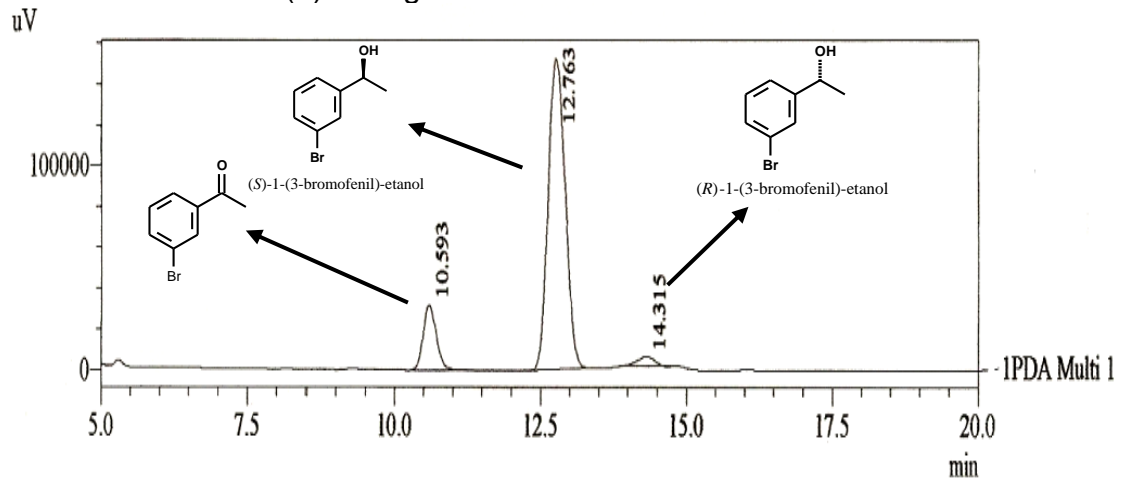


Figura 32 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução de 4-bromoacetofenona (4) em água destilada com LC.

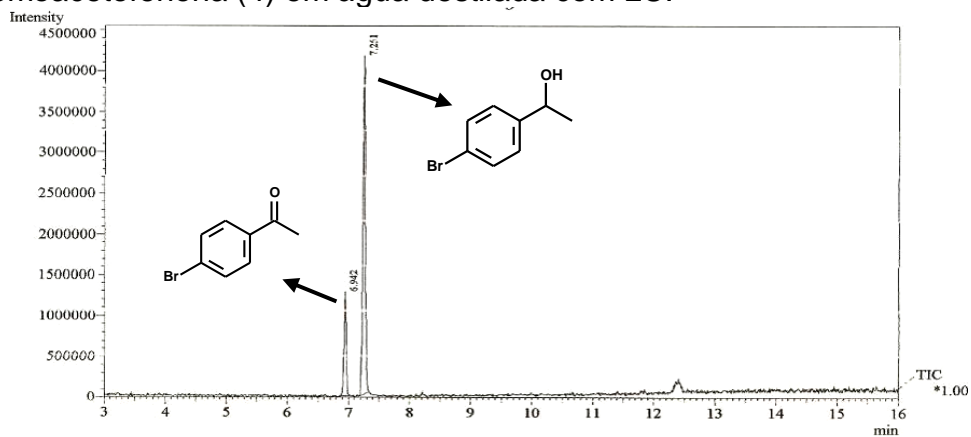


Figura 33 – Espectro de massas do 4-bromoacetofenona (4), tr: 6,94 min.

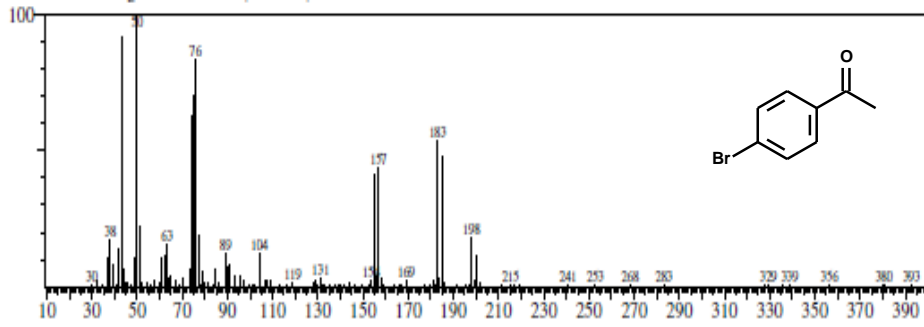


Figura 34 – Espectro de massas do 1-(4-bromofenil)-etanol (4a), tr: 7,25 min.

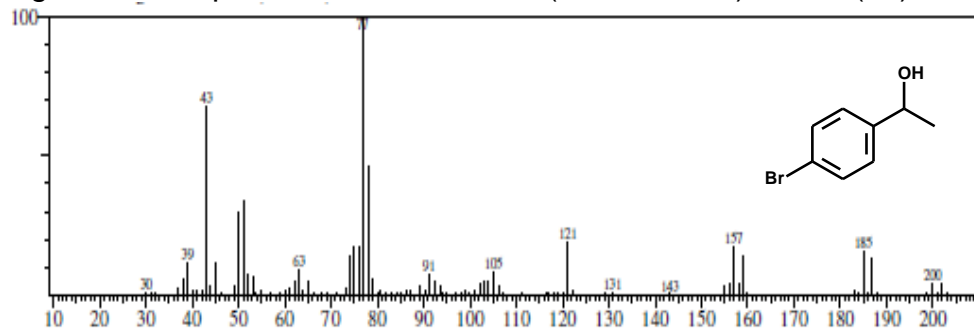


Figura 35 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução de 4-bromoacetofenona (4) em água destilada com LC.

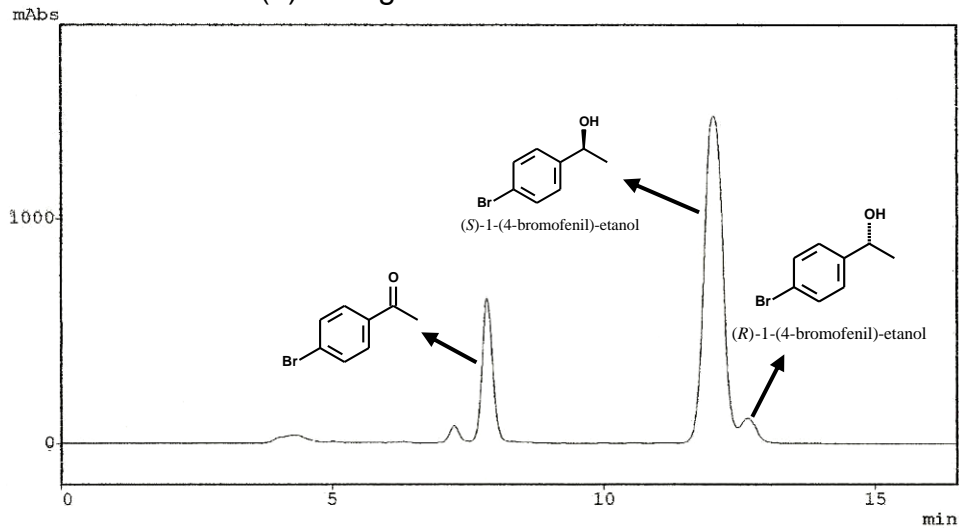


Figura 36 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução da 4-cloroacetofenona (5) em pH 7.0 com LC.

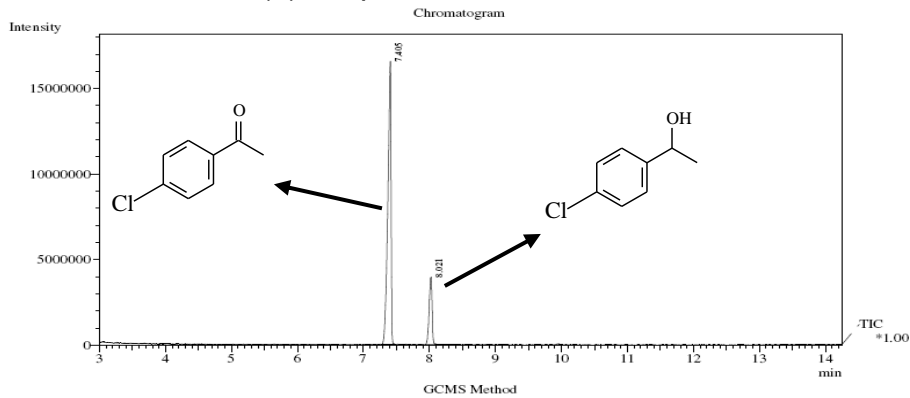


Figura 37 – Espectro de massas do 4-cloroacetofenona (5), tr: 7,40 min.

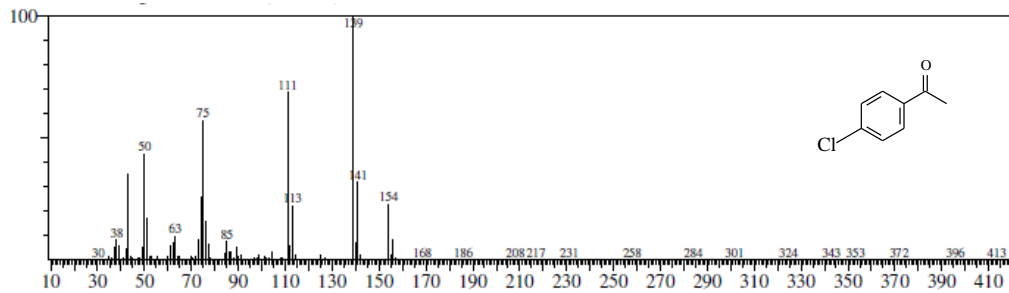


Figura 38 – Espectro de massas do 4-clorofeniletanol (5a), tr: 8,02 min.

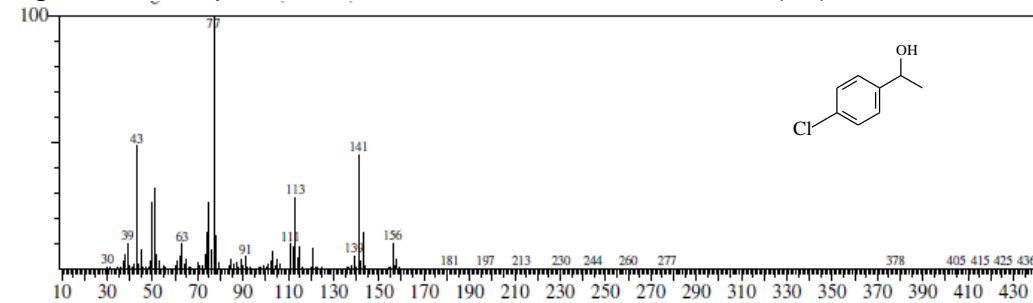


Figura 39 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução da 4-cloroacetofenona (5) em pH 7.0 com LC.

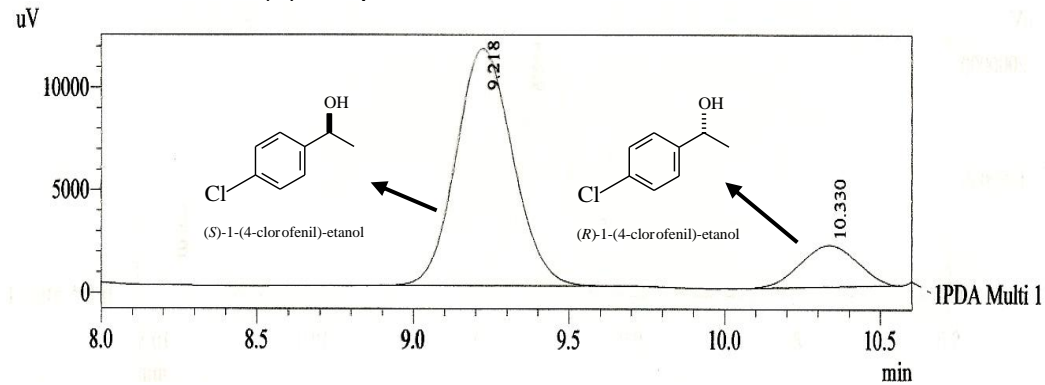


Figura 40 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 4-fluoracetofenona (6) em água destilada com LC.

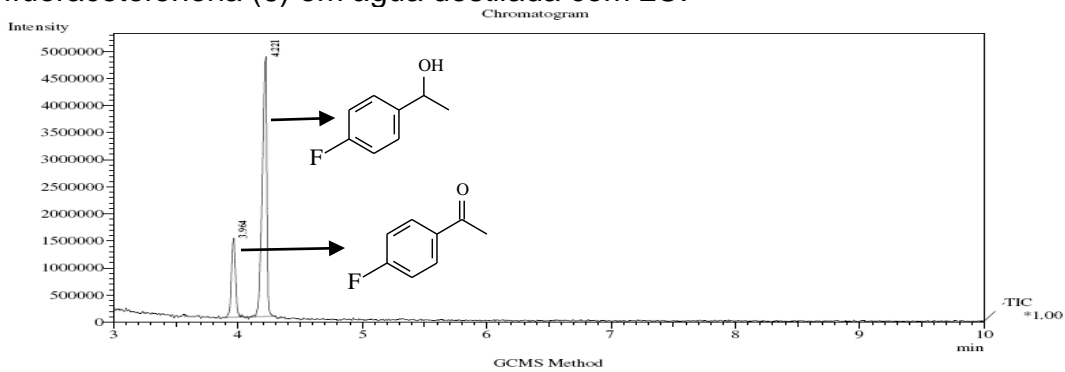


Figura 41 – Espectro de massas do 4-fluoroacetofenona (6a), tr: 3,96 min.

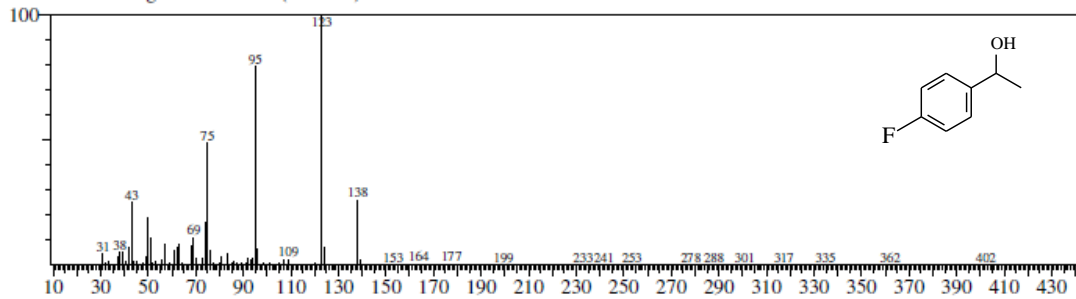


Figura 42 – Espectro de massas do 1-(4-fluorofenil)etanol (6a), tr: 4,22 min.

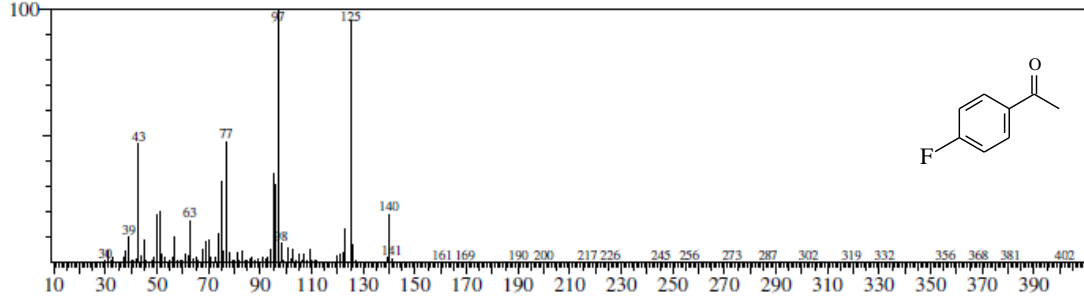
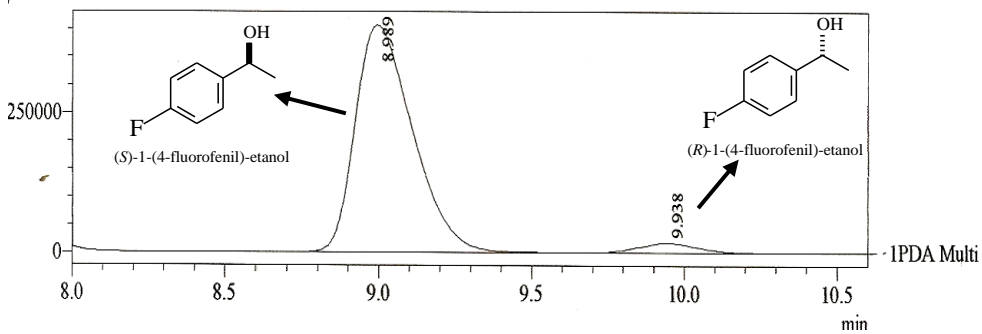


Figura 43 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução do 4-fluoroacetofenona (6) em água destilada com LC.



4.4.2 Acetofenonas nitradas

Adicionais biorreduções foram conduzidas com *orto*-, *meta*- e *para* nitroacetofenonas (**7-9**). Relativamente, foi observado uma baixa quimiosseletividade na redução das três nitroacetofenonas isoméricas, tendo o processo ocorrido no grupo carbonila sem redução do grupo nitro, com produção dos álcoois (*R*)-**7a**, (*R*)-**8a** e (*S*)-**9a**. Baixo valor de conversão (5-7%) e baixo a moderado ee (16-61%) do álcool (*R*)-1-(2-nitrofenil)-etanol (**7a**) foram observados na redução do *orto* derivado (**7**), considerando ambos os meio reacionais (água destilada e tampão pH 7) (Tabela 10, p. 55). Um possível efeito estérico devido ao grupo nitro na posição *orto* dificultaria a redução da carbonila. Os isômeros *meta* e *para* foram reduzidos aos álcoois correspondentes em baixa a moderada conversão (24-57%) e com moderado ee (42-68%). Em ambos os meios, o álcool (**9a**) apresentou configuração em acordo com a regra de Prelog enquanto os outros alcoóis **7a** e **8a** foram formados com configuração anti-Prelog. As configurações absolutas dos nitroalcoóis mantiveram-se iguais em ambos os meios e foram comparadas e confirmadas através de dados da literatura (Tabela 9, p. 55).

Por outro lado, redução do grupo nitro foi observada também sem redução do grupo carbonila para as três nitroacetofenonas **7**, **8** e **9**, originando as aminoacetofenonas **7b**, **8b** e **9b** (Esquema 4 e Tabela 10, p. 54) com conversões que variaram de 2-75%. Contudo, não foi evidenciado presença do aminoálcool (produto da redução simultânea dos grupos carbonila e nitro). O pH do meio reacional interferiu de forma acentuada na conversão e no ee, sendo verificado que em pH 5,6 (água destilada) a proporção do nitroálcool (**7a-9a**) foi superior ao da cetoamina (**7b-9b**), enquanto em pH 7,0 a proporção da cetoamina foi superior (Figuras 44-52, p. 56-62). É interessante observar a possível influência mútua no curso estérico da reação (em água destilada), na redução dos grupos carbonila e nitro no substrato **7**, produzindo os derivados álcool (**7a**) e amina (**7b**) com baixa conversão (5 e 2%, respectivamente).

Esquema 4 – Biorredução de nitroacetofenonas usando LC.

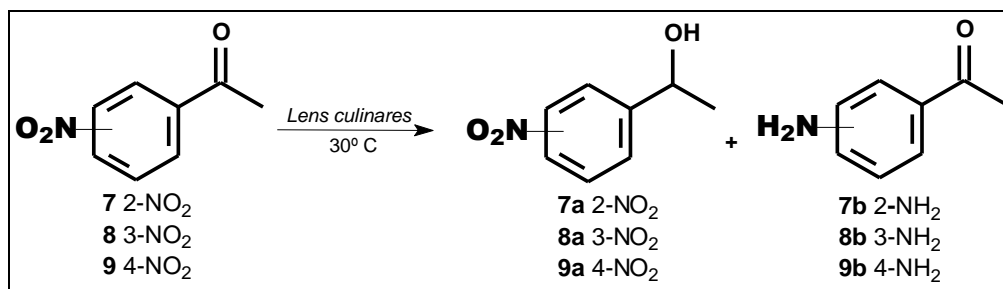


Tabela 9 – Configurações absolutas dos produtos de biorredução (nitrocompostos) comparados com os da literatura.

Entrada	Composto	$[\alpha]_{589}^{20}$; [c] ^a -R/S	$[\alpha]_{589}^{20}$; [c] ^b -R/S	Literatura
1	1-(2-nitrofenil)-etanol	-17; [0,040]-R	+18,5; [0,23]-S	BARROS-FILHO <i>et. al.</i> , 2009.
2	1-(3-nitrofenil)-etanol	+11; [0,072]-R	-4.9; [1,22]-S	CHATTOPADH; SALVI, 2008.
3	1-(4-nitrofenil)-etanol	-16; [0,054]-S	-22,4; [1.42]-S	CHATTOPADH; SALVI, 2008.

^a produto da biorredução^b dados comparados da literatura

[c] concentração

Tabela 10 – Resultados da biorredução de nitroacetofenonas com LC.

Entrada	Cetona	Substituinte	Meio reacional			
			Água destilada		Solução tampão pH 7	
			c ^a (%)	ee ^b (%)	c ^a (%)	ee ^b (%)
1	7	2-NO ₂	5(a) e 2(b)	61-R(a)	7 (a) e 20(b)	16-R (a)
2	8	3-NO ₂	57 (a) e 26(b)	42-R(a)	24(a) e 75(b)	44-R (a)
3	9	4-NO ₂	46(a) e 27(b)	68-S(a)	45(a) e 47(b)	65-S (a)

^a Conversão (c) determinado por CG-EM^b excesso enantiomérico (ee) por CLAE

(a) referente ao nitroálcool

(b) referente a cetoamina.

Figura 44 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 2-nitroacetofenona (7) em água destilada com LC.

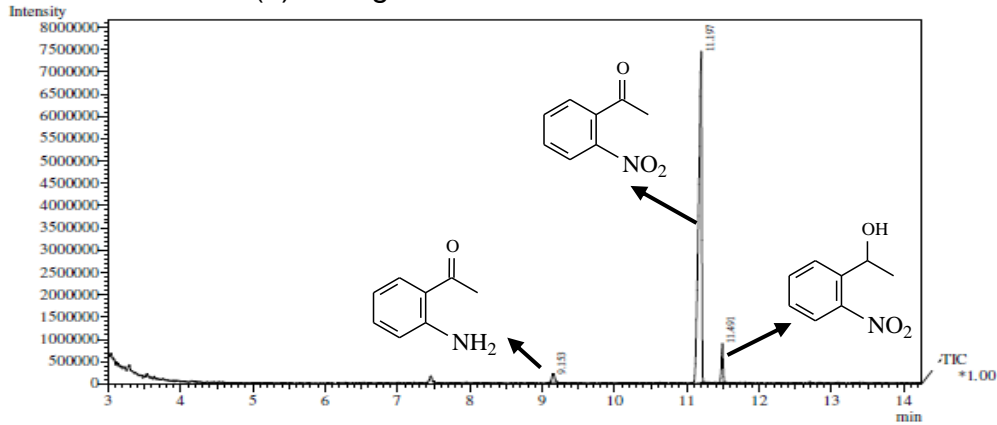


Figura 45 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução do 2-nitroacetofenona (7) em água destilada com LC.

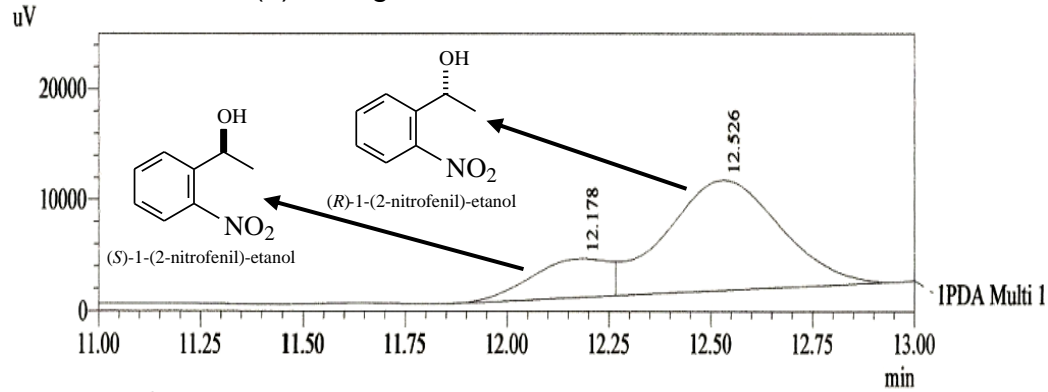


Figura 46 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 3-nitroacetofenona (8) em água destilada com LC.

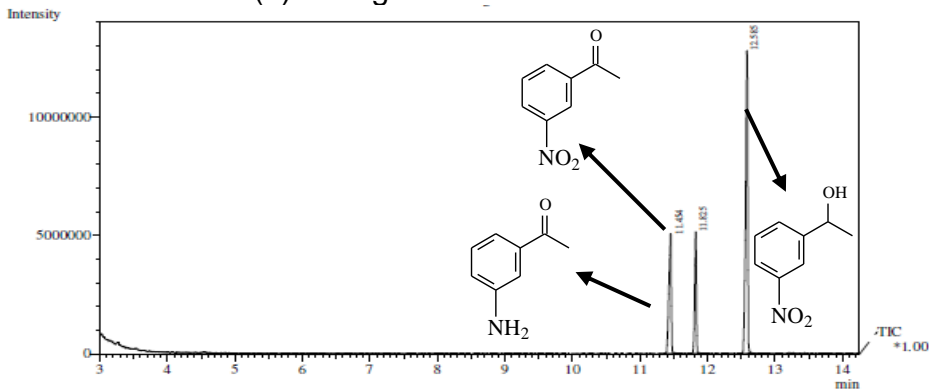


Figura 47 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução do 3-nitroacetofenona (8) em água destilada com LC.

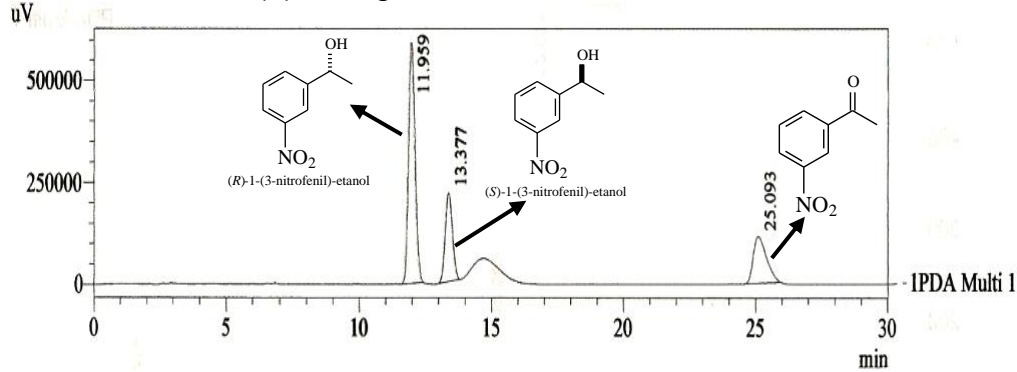


Figura 48 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 4-nitroacetofenona (9) em água destilada com LC.

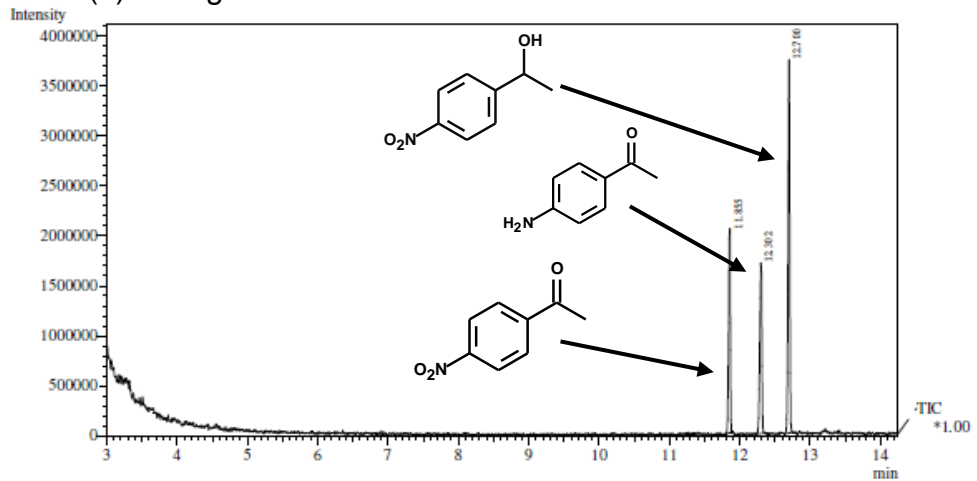


Figura 49 – Espectro de massas do 4-nitroacetofenona (9), tr: 11,85min.

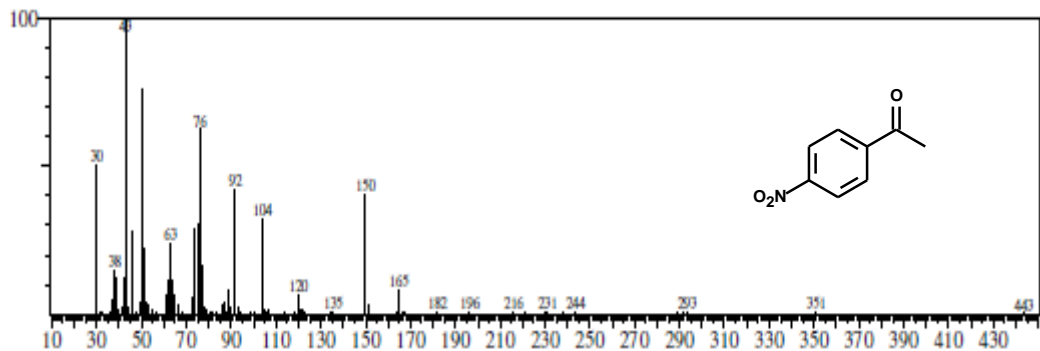


Figura 50 – Espectro de massas do 4-aminoacetofenona (9b), tr: 12,30 min.

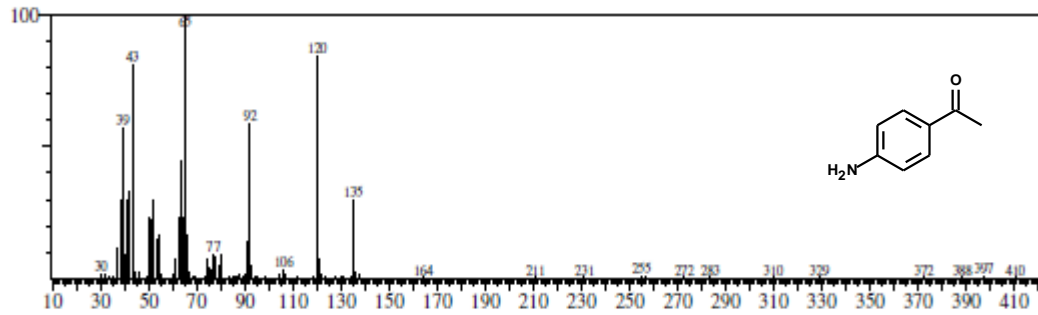


Figura 51 – Espectro de massas do 1-(4-nitrofenil)-etanol (9a), tr: 12,70 min.

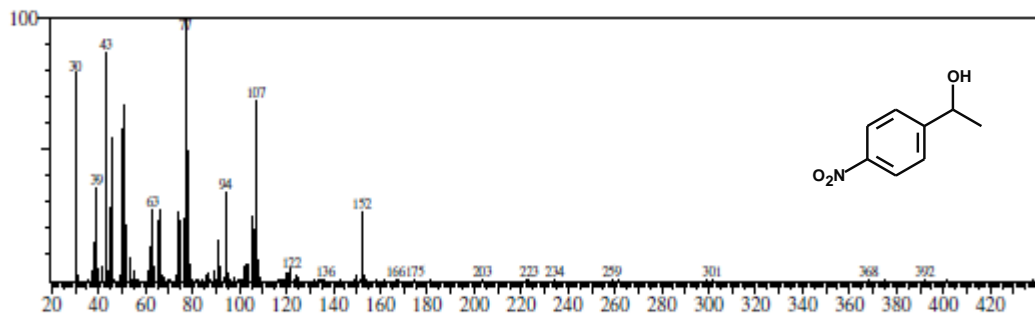
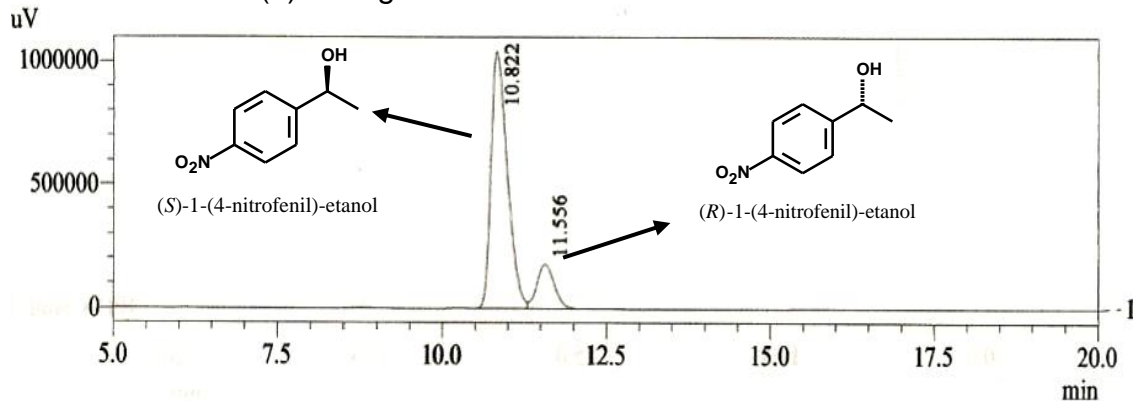


Figura 52 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução de 4-nitroacetofenona (9) em água destilada com LC.



4.4.3 Acetofenonas com substituintes ativadores

Os derivados de acetofenonas com substituintes doadores de elétrons também foram examinados frente à possibilidade de redução com LC, buscando investigar a influência dos substituintes na reatividade da carbonila. Os substratos foram a 2-hidróxiacetofenona (10), 3-metoxiacetofenona (11), 4-metoxiacetofenona

(**12**), 2,5-dimetilacetofenona (**13**), 2-aminoacetofenona (**14**), 3-aminoacetofenona (**15**) e 4-aminoacetofenona (**16**) (Esquema 5, p. 60).

Em geral, foi observado que a presença de grupos doadores de elétrons (-OH, -OCH₃, -CH₃ e -NH₂), assim como, a posição relativa desses substituintes no anel aromático, diminuiu fortemente a reatividade do grupo carbonila em comparação ao substrato modelo acetofenona (**1**), exceto para o composto (**11**) (Tabela 12, p. 61). Assim, quando o *m*-metoxiacetofenona (**11**) foi tratado com sementes de lentilha sob as condições de biorredução empregadas, o álcool quiral (*R*)-**11a** foi obtido com bom ee (83%) e em uma moderada conversão (38%), enquanto, nas mesmas condições, o álcool quiral (*S*)-**12a** a partir do *p*-metoxiacetofenona (**12**) foi produzido também com bom ee (80%), mas em baixíssima conversão (4%). Outros derivados com fortes substituintes doadores de elétrons (-OH e -NH₂) tais como *o*-hidroxiacetofenona (**10**) e *orto*-, *meta*- e *para*-aminoacetofenonas (**14**, **15** e **16**) não reagiram, enquanto, 2,5-dimetilacetofenona (**13**) mostrou baixa conversão (4%), embora, com alto ee ($\geq 99\%$).

O álcool 1-(3-metoxifenil)-etanol (**11a**) obtido em água destilada (pH 5,6), foi quantificado (38%) através de espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) pela comparação da integração do sinal dos hidrogênios metílicos (-COCH₃, um singleto intenso em δ_H 2,60) da cetona (**11**) com a integração do sinal dos hidrogênios metílicos [-CHOHCH₃, um dubleto em δ_H 1,50 ($J = 6,5\text{Hz}$)] do álcool (**11a**) (Figura 52, p. 61). O excesso enantiomérico (83%, *R*) foi determinado através de CLAE (Figura 54, p. 62) e foi superior ao do substrato modelo (**1**) (75 %, *S*). A conversão (38%) também foi superior a de **1** (17%). Em pH 7,0 a conversão do álcool diminuiu 10% e ocorreu também pequena redução no ee (Tabela 12, p. 61).

Após purificação parcial dos produtos de biorredução **11a**, **12a** e **13a** foram determinados por polarimetria a rotação ótica dos alcoóis quirais comparando os sinais de alfa com os dados da literatura (Tabela 11, p. 60).

Quando as reações foram efetuadas na ausência do biocatalisador, praticamente, não foi observada conversão, logo, as reações foram conduzidas devido à presença de *L. culinaris*.

Esquema 5 – Biorredução de acetofenonas com substituintes doadores de elétrons.

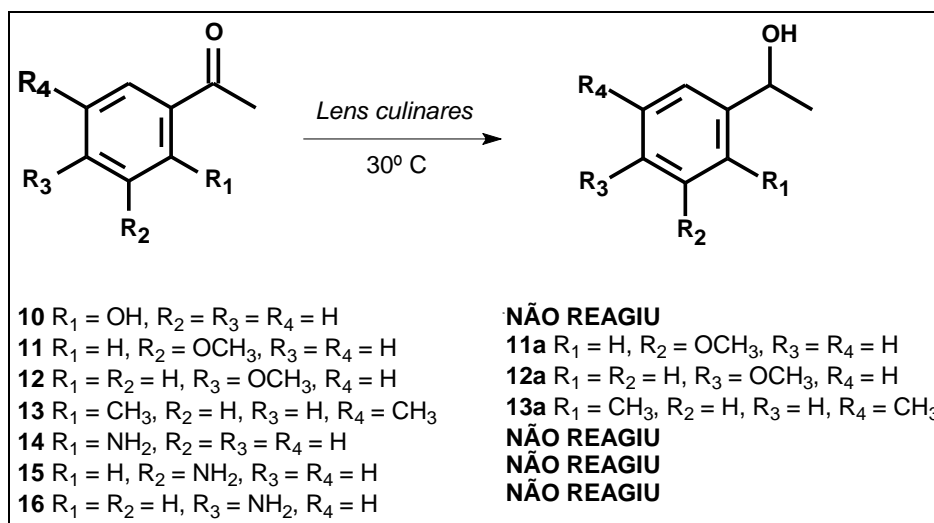


Tabela 11 – Configurações absolutas dos produtos de biorredução (doadores de elétrons) comparados com os da literatura.

Entrada	Composto	$[\alpha]_{589}^{20}$; $[\eta]^a$ - R/S	$[\alpha]_{589}^{20}$; $[c]^b$ - R/S	Literatura
1	1-(3-metoxifenil)- etanol	+14; [0,066]-R	-29,8; [0,85]-S	BARROS-FILHO <i>et. al.</i> , 2009.
2	1-(4-metoxifenil)- etanol	-21; [0,046]-S	-29,1; [1,5]-S	BARROS-FILHO <i>et. al.</i> , 2009.
3	1-(2,5-dimetilfenil)- etanol	-23; [0,048]-S	+64; [0,5]-R	WILLS; MARTINS, 2009.

^a produto da biorredução^b dados comparados da literatura

[c] concentração

Tabela 12 – Resultados da biorredução de derivados da acetofenona com doadores de elétrons.

Entrada	Cetona	Substituinte	Meio reacional			
			Água destilada		Solução tampão pH 7	
			c ^a (%)	ee ^b (%)	c ^a (%)	ee ^b (%)
1	10	2-OH	N.R.	-	N. R.	-
2	11	3-OCH ₃	38	83-R	28	80-R
3	12	4-OCH ₃	4	80-S	3	84-S
4	13	2,5-CH ₃	4	≥99-S	5	98-S
5	14	2-NH ₂	N.R.	-	N. R.	-
6	15	3-NH ₂	N.R.	-	N. R.	-
7	16	4-NH ₂	N.R.	-	N. R.	-

^a conversão (c) determinado por CG-EM

^b excesso enantiomérico (ee) por CLAE

N. R. Não Reagiu.

Figura 53 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do produto obtido da biorredução em água destilada de 3-metoxiacetofenona (11).

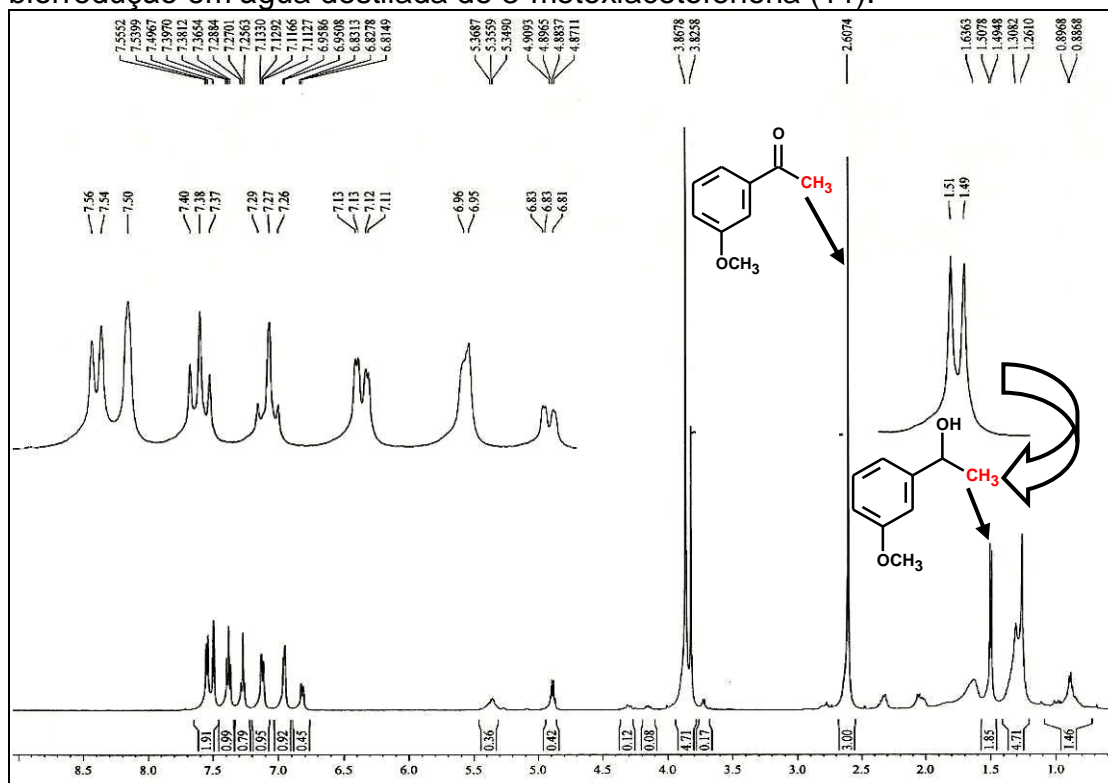


Figura 54 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução de 3-metoxiacetofenona (11) em água destilada com LC.

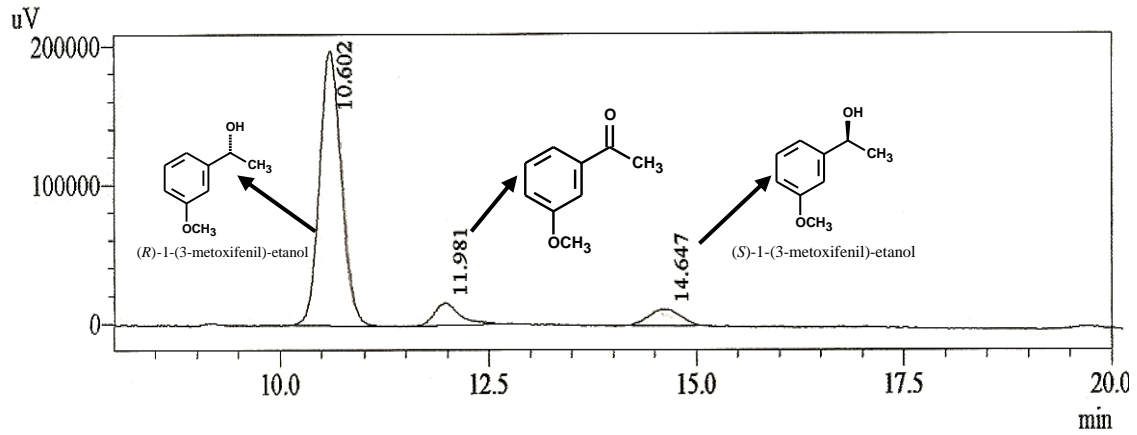


Figura 55 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução de 4-metoxiacetofenona (12) em água destilada com LC.

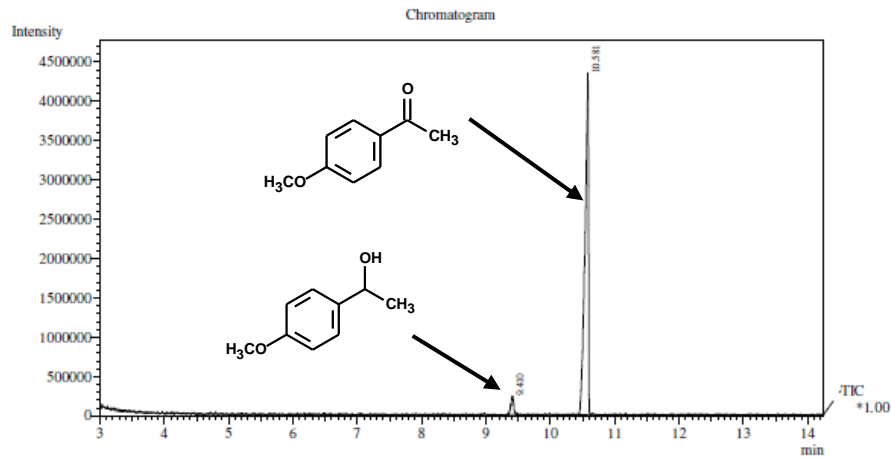


Figura 56 – Espectro de massas do 1-(4-metoxifenil)-etanol (12a), tr: 9,41 min.

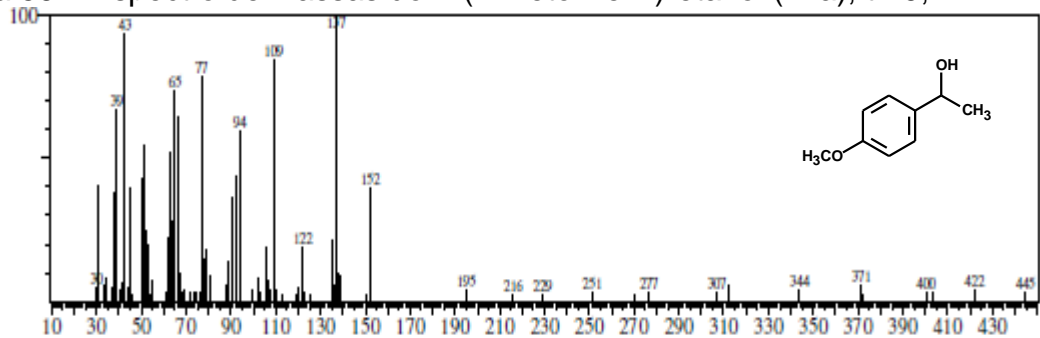


Figura 57 – Espectro de massas do 4-metoxiacetofenona (12), tr: 10,58 min.

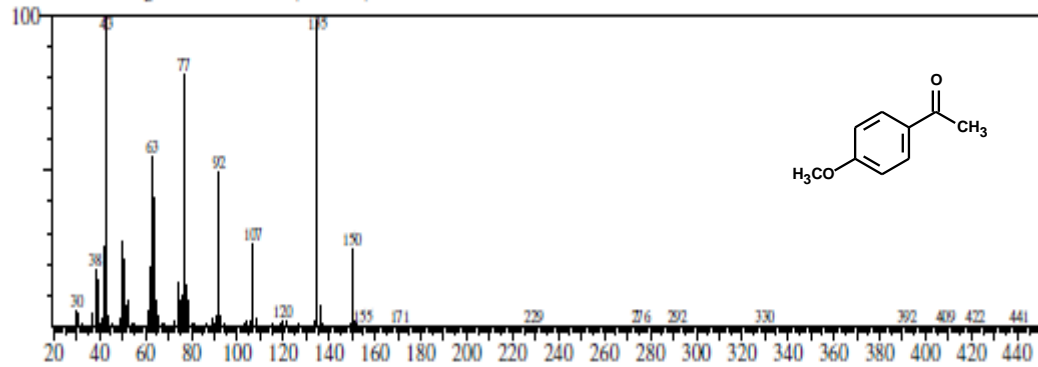


Figura 58 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução de 4-metoxiacetofenona (12) em água destilada com LC

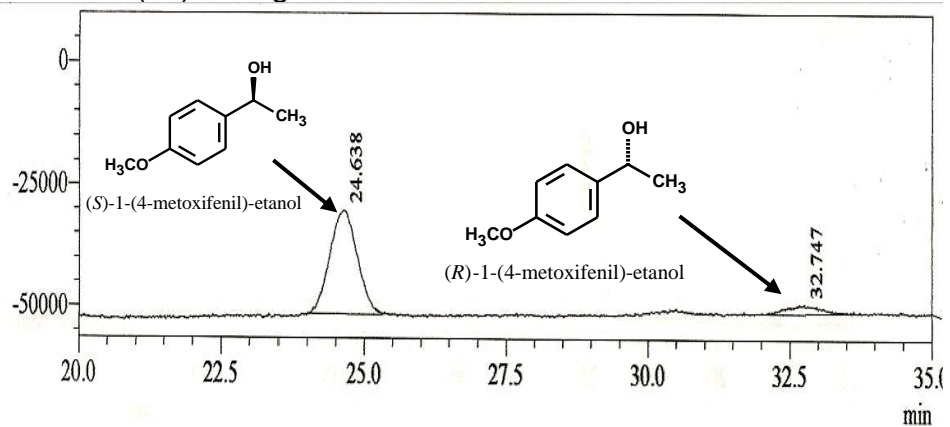


Figura 59 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 2,5-dimetilfenilacetona (13) em água destilada com LC.

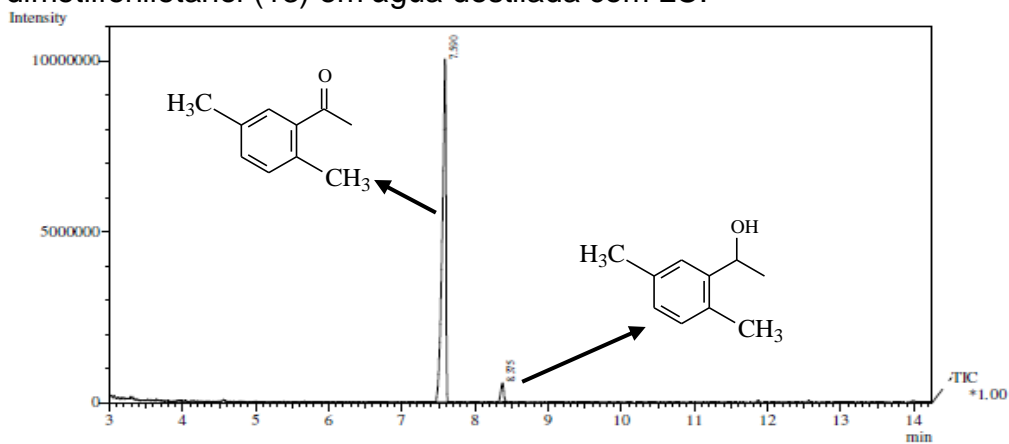


Figura 60 – Espectro de massas do 2,5-dimetilacetofenona (13), tr: 7,53 min.

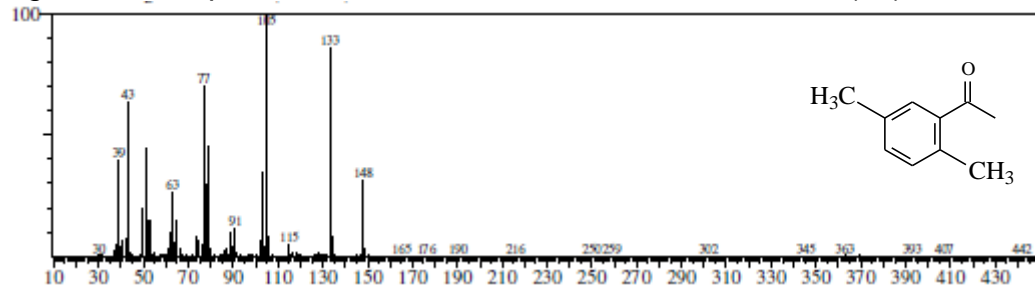


Figura 61 – Espectro de massas do 2,5-dimetilfeniletanol (13a), tr: 8,35 min.

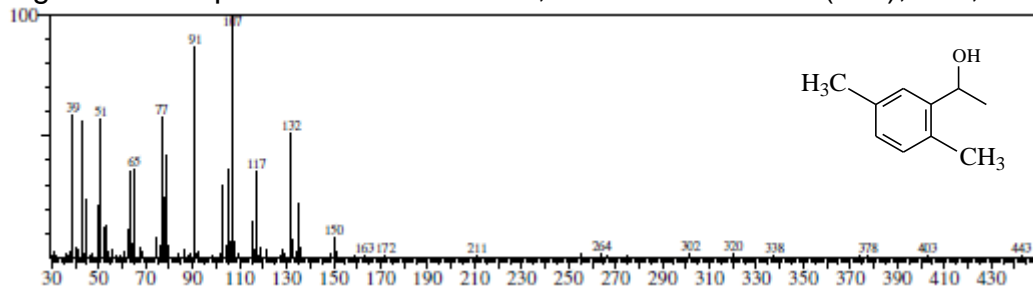
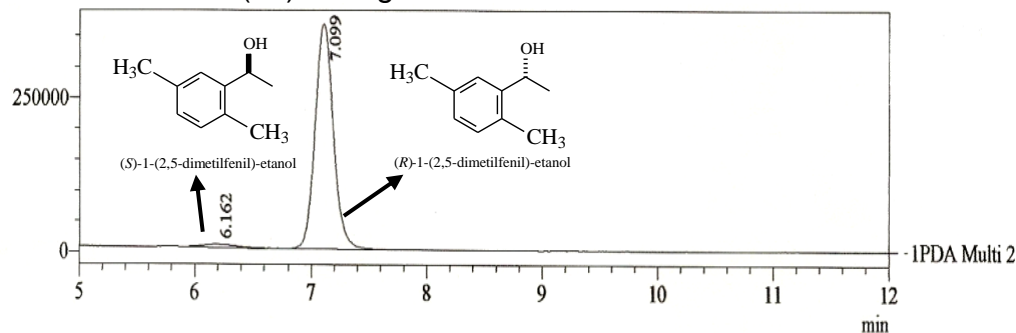


Figura 62 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução do 2,5-dimetilfeniletanol (13) em água destilada com LC.



4.5 Biorredução de outros compostos carbonílicos

Confirmada a presença de enzimas redutase através dos resultados positivos obtidos com os substratos (1-16), inclusive, com resultados que se coadunam com aqueles registrados na literatura utilizando outras fontes vegetais (ASSUNÇÃO *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2009; BIZERRA *et al.*, 2010), a investigação foi estendida a outros compostos potencialmente reduzíveis. Foi avaliada a capacidade de LC em reduzir substratos carbonílicos como: cetonas simétricas (aromática e alifática), aldeídos e nitrocompostos aromáticos, seguindo

mesma metodologia adotada anteriormente (subitem 5.4.2, p. 106 do procedimento experimental).

4.5.1 Cetonas alifáticas e outras cetonas aromáticas

Biorreduções foram levadas a efeito com duas outras cetonas de natureza aromática, a α -tetralona (**17**) (Figura 63) e a benzofenona (**18**) (Figura 69, p. 69). Em água destilada, **17** e **18** apresentaram baixos valores de conversão (8 e 41%, respectivamente), bem como, baixa enantioseletividade (39%) do álcool *S* no caso de **17**. Em comparação com acetofenona (**1**) e benzofenona (**18**), a baixa conversão e a baixa enantioseletividade verificadas para a α -tetralona (**17**) seriam devidas ao maior impedimento estérico e a uma conformação mais rígida (sem rotação livre) em sua estrutura. Os resultados de conversão e excesso enantiomérico são mostrados no Gráfico 4 (p. 66) e os cromatogramas obtidos por CG-EM e HPLC nas Figuras 64-67 (p. 66-67).

Após a purificação parcial do produto de biorredução **17a** (álcool quiral em excesso) a rotação ótica foi determinada por polarimetria como sendo $[\alpha]_{589}^{20} = +20$ (0,05 g/mL, clorofórmio). A literatura mostrou que a rotação ótica para o álcool (*R*)-tetralol é $[\alpha]_{589}^{20} = -15$ (0,37 g/mL, clorofórmio). Conseqüentemente, por comparação, para o álcool foi **17a** foi atribuída a configuração *S* (Figura 67, p. 67).

Figura 63 – Biorredução da α -tetralona com LC.

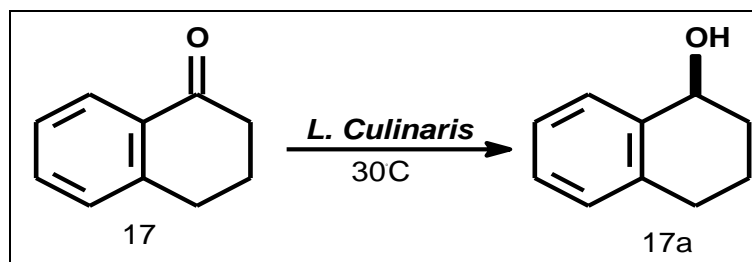


Gráfico 4 – Biorredução de cetonas aromáticas.

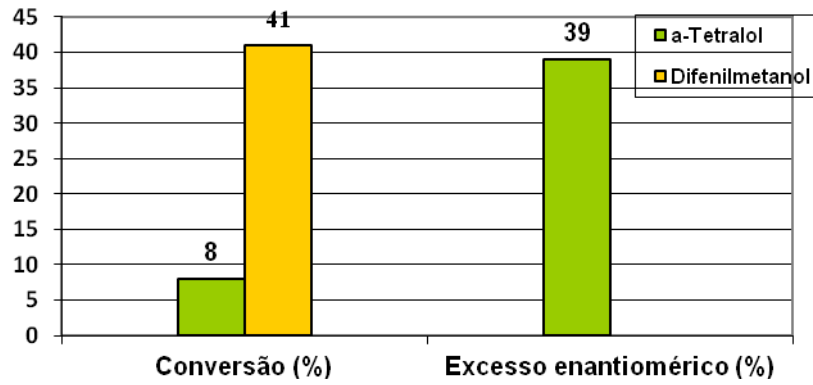
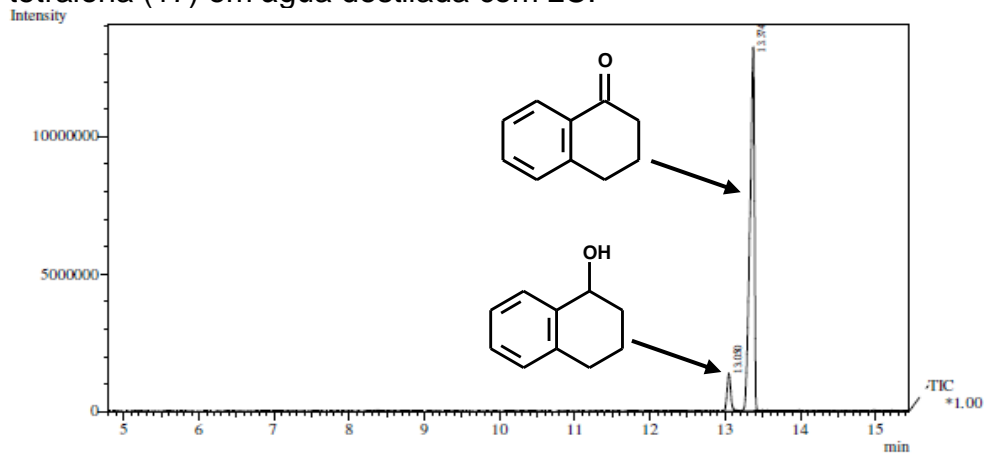
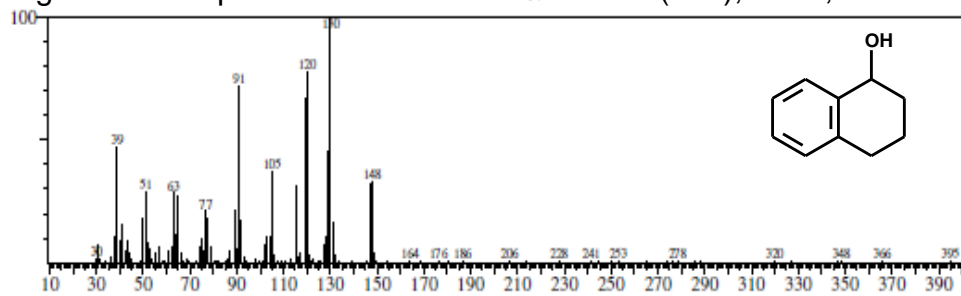
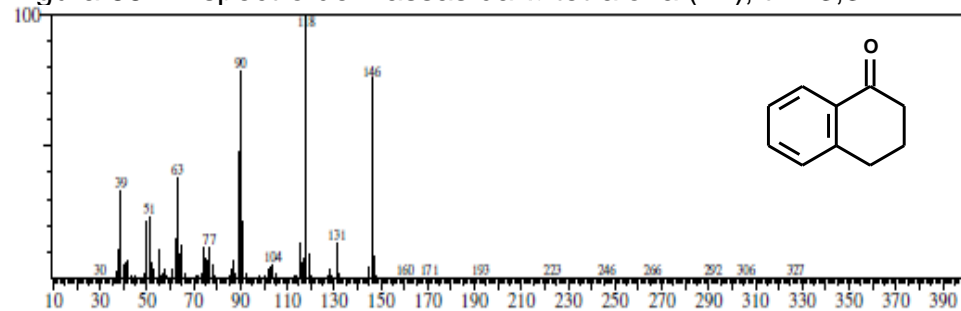
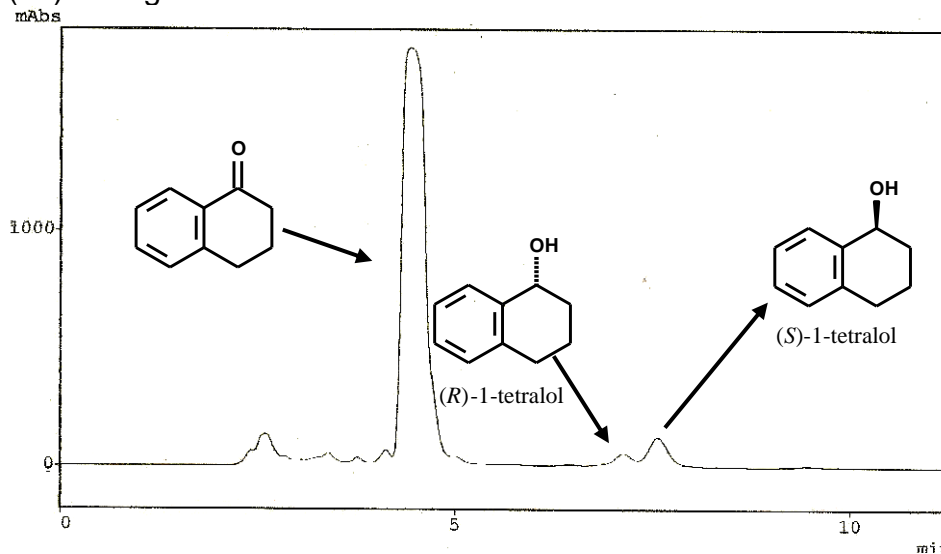
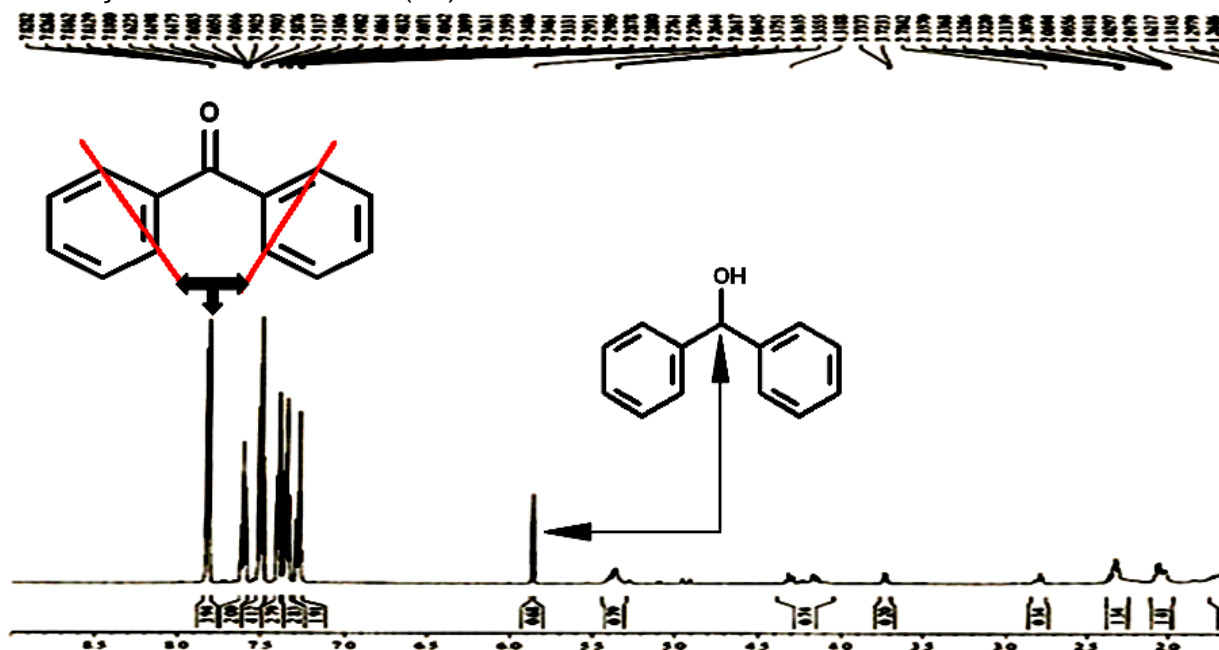
Figura 64 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução da α -tetralona (17) em água destilada com LC.Figura 65 – Espectro de massas do α -tetralol (17a), tr: 13,09 min.Figura 66 – Espectro de massas da α -tetralona (17), tr: 13,32 min.

Figura 67 – Cromatograma obtido por CLAE do produto da biorredução da α -tetralona (17) em água destilada com LC.



A benzofenona (**18**) (cetona aromática conjugada) revelou um aumento considerável na bioconversão (41%) quando comparada ao da acetofenona (17%) e α -tetralona (8%) em água destilada. Este comportamento indicou, provavelmente, que os fatores eletrônico e estérico em **18** foram determinantes no aumento da reatividade da carbonila. O teor de conversão do composto (**18**) foi determinado por RMN ^1H a partir da comparação da integração do sinal correspondente aos quatro átomos de hidrogênios aromáticos *orto* à carbonila de **18** (multiplete com deslocamento químico em δ_{H} 7,82) com a integração do sinal do hidrogênio carbinólico de **18a** (singlete em δ_{H} 5,56) (Figura 68, p. 68).

Figura 68 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do Benzofenona (18).



O experimento foi estendido para observar a eficiência do sistema enzimático com as alcanonas cíclicas simétricas ciclopentanona (**19**) e ciclohexanona (**20**). Conforme mostrado na Figura 69 (p. 69), a incubação da cetona com anel de cinco membros (**19**) produziu um álcool com excelente rendimento (82%), enquanto, a incubação da cetona com anel de seis membros (**20**) produziu um álcool com baixo rendimento (42%), com resultados diferentes daqueles obtidos pela utilização de *Saccharum officinarum* (34 e 81%, respectivamente) (Assunção *et al.*, 2008). De modo geral, as cetonas não conjugadas (**19** e **20**) foram mais reativas que as cetonas conjugadas (**1**, **17** e **18**), conforme esperado, tendo em vista que o carbono carbonílico de cetonas não conjugadas são mais eletrofílicos. Os resultados das conversões das cetonas cíclicas são demonstrados através dos cromatogramas de CG-EM com seus respectivos espectros de massas nas Figuras 70-75, p. 69-70.

Figura 69 – Biorredução de cetonas simétricas com seus respectivos rendimentos.

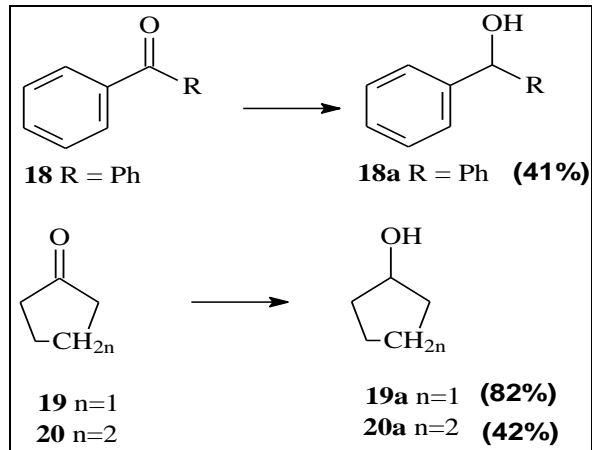


Figura 70 – Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da ciclopentanona (19).

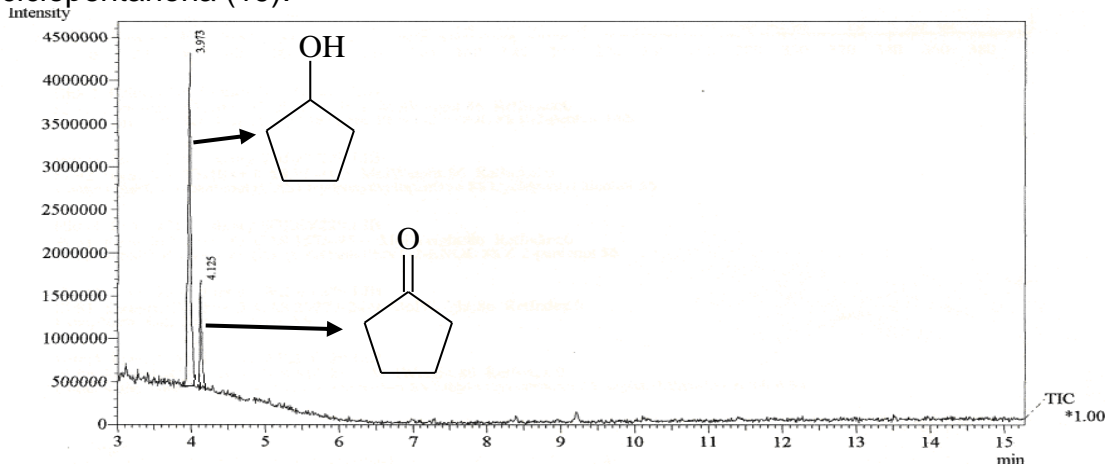


Figura 71 – Espectro de massa do ciclopentanol (19), tr: 3,97 min.

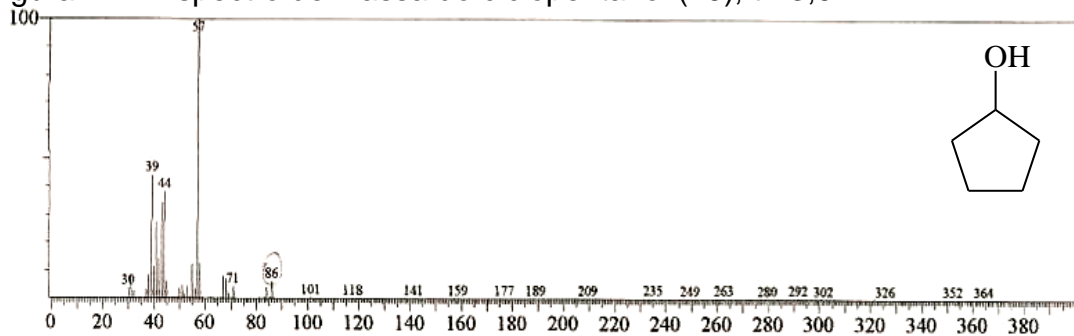


Figura 72 – Espectro de massa do ciclopentanona (19), tr: 4,12 min.

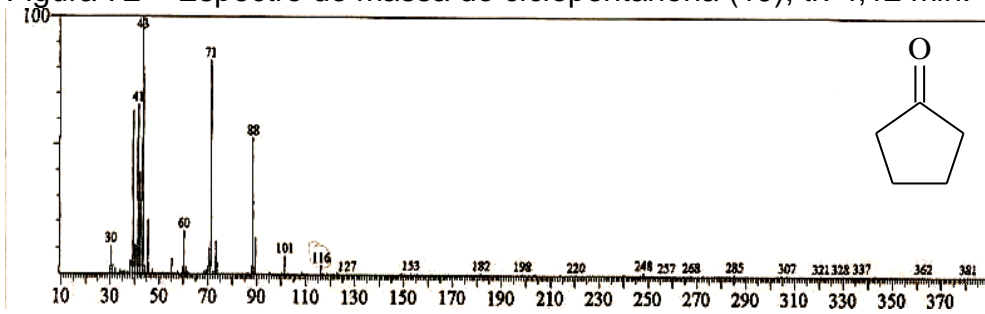


Figura 73 – Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da ciclohexanona (20).

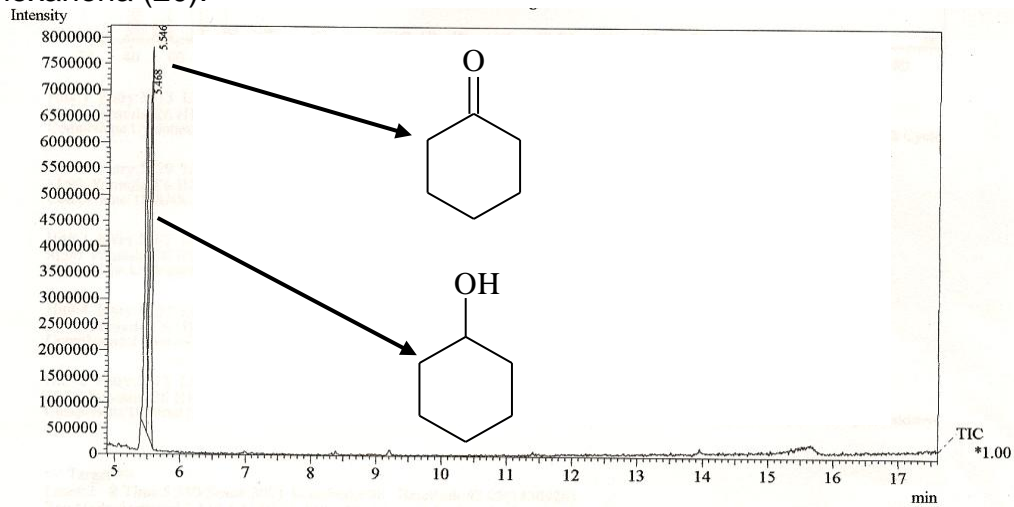


Figura 74 – Espectro de massa do ciclo-hexanol (20a), tr: 5,46 min.

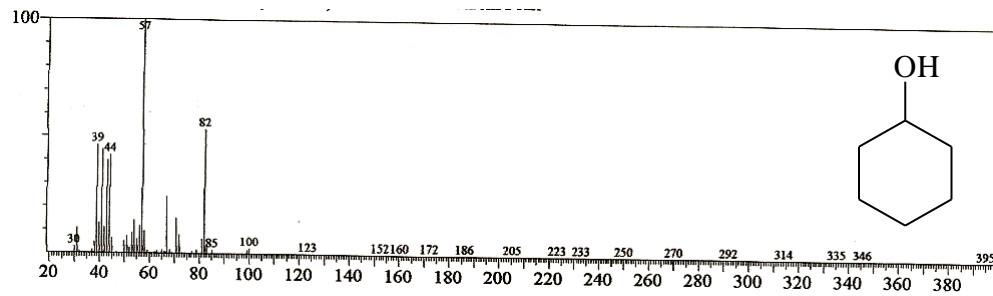
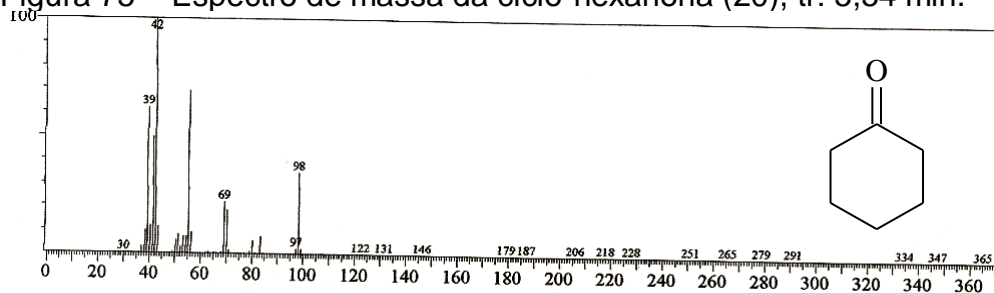


Figura 75 – Espectro de massa da ciclo-hexanona (20), tr: 5,54 min.



4.5.2 Aldeídos aromáticos

Como no caso das cetonas, a redução biocatalítica de aldeídos constitui um dos mais importante e prático meio para a obtenção de álcoois (SUAREZ-FRANCO *et al.*, 2010), os quais podem então ser transformados para sintetizar produtos químicos importantes para as indústrias farmacêutica, agroquímica e cosmética. Em um contexto de “química limpa”, é importante enfatizar a possibilidade de usar diferentes plantas locais (células a partir de frutos, raízes, tubérculos e outras partes) como biocatalisador para reduzir aldeídos e cetonas como uma alternativa para a síntese de álcoois.

Nestas circunstâncias, a reação enzimática foi aplicada aos aldeídos aromáticos **21-24** incluindo o α,β -insaturado aldeído cinâmico **25** (Figura 91, p. 77). Como esperado e, como já relatado em trabalhos anteriores (ASSUNÇÃO *et al.*, 2008; SUAREZ-FRANCO *et al.*, 2010), os aldeídos foram mais reativos que as cetonas e foram reduzidos através de um padrão bem definido, com exceção do aldeído cinâmico (Tabela 13, p. 78). Assim, o benzaldeído (**21**) e o furfural (**24**) foram completamente reduzidos aos correspondentes álcoois **21a** ($\geq 99\%$) e **24a** ($\geq 99\%$). Os derivados *p*-metoxibenzaldeído (**22**) e *m*-metoxibenzaldeído (**23**) foram convertidos nos álcoois **22a** e **23a** com rendimentos de 95 e 96%, respectivamente. A ligeira diminuição nos rendimentos (relativamente ao benzaldeído) pode ser atribuída a presença de um substituinte doador de elétrons (-OMe) no anel aromático (FONSECA *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2006). Os produtos reacionais foram analisados em CG-EM e os cromatogramas com seus respectivos espectros de massa estão apresentados nas Figuras 76-85 (p. 72-74).

Figura 76 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução da benzaldeído (21) com LC.

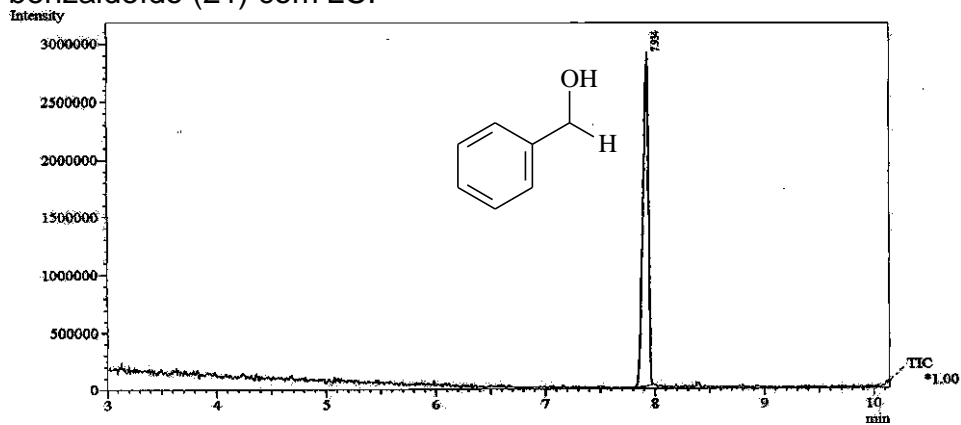


Figura 77 – Espectro de massas do álcool benzílico (21a), tr: 7,93 min.

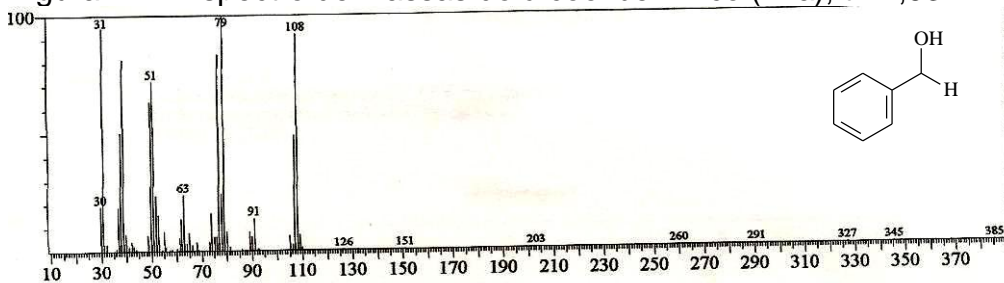


Figura 78 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução da 4-metoxibenzaldeído (22) com LC.

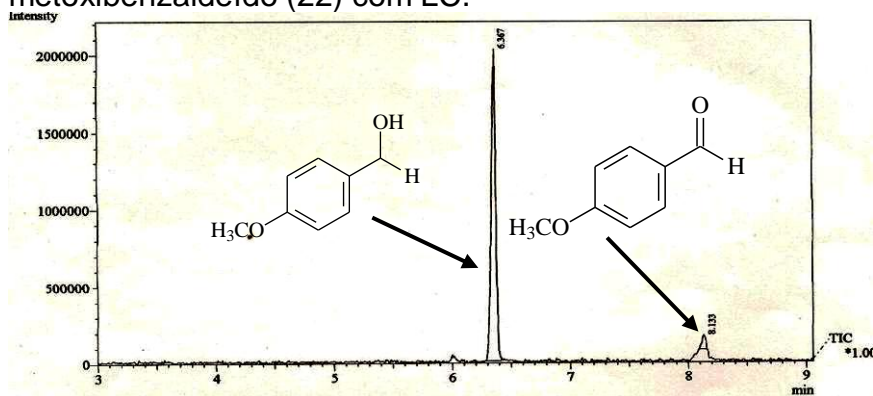


Figura 79 – Espectro de massas do 4-metoxifenilmetanol (22a), tr: 6,36min.

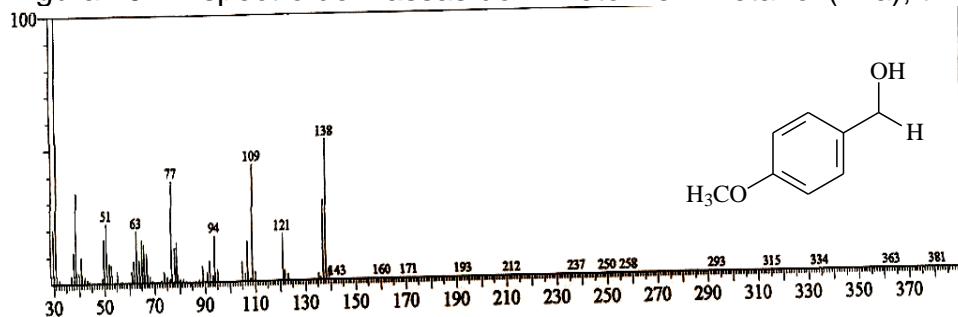


Figura 80 – Espectro de massas do ácido 4-metoxibenzaldeído (22), tr: 8,13 min.

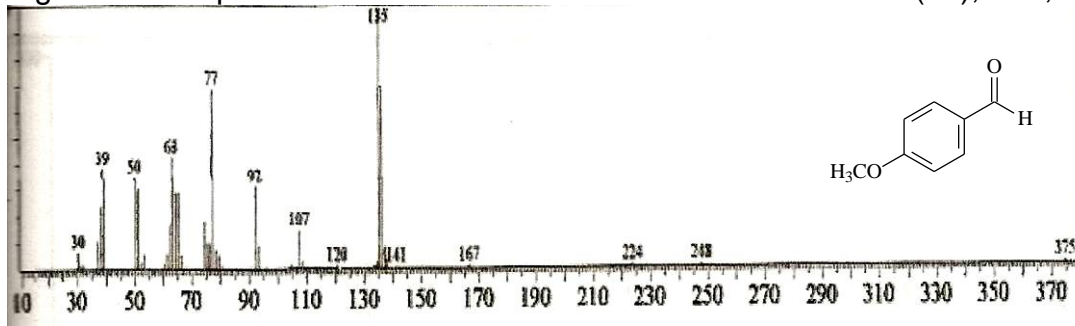


Figura 81 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 3-metoxibenzaldeído (23) com LC.

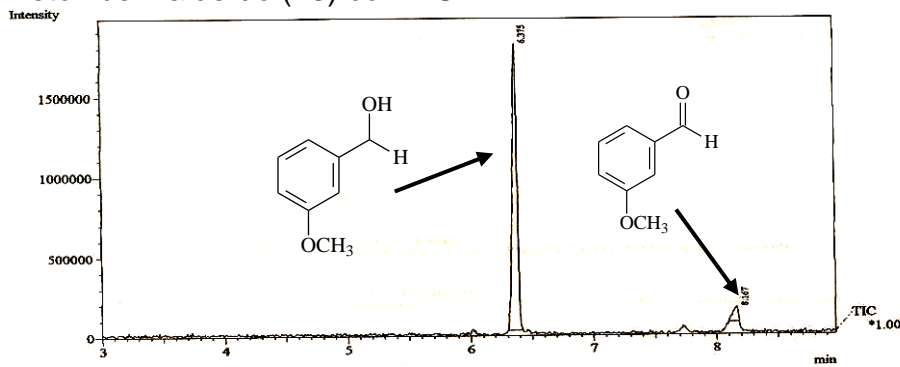


Figura 82 – Espectro de massas do 3-metoxifenilmetanol (23a), tr: 6,37 min.

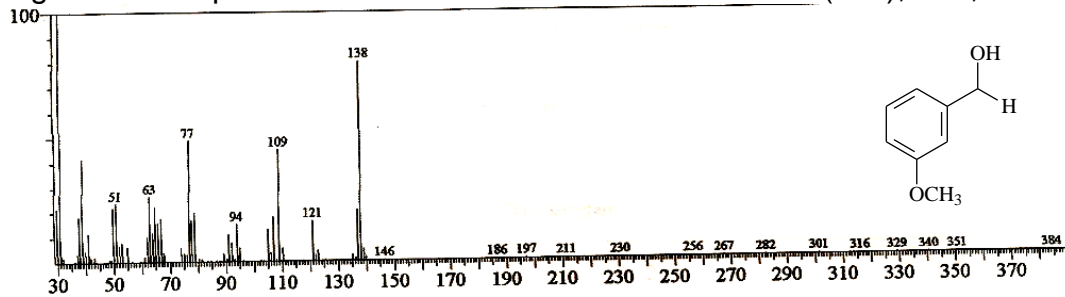


Figura 83 – Espectro de massas do ácido 3-metoxibenzaldeído (23), tr: 8,16 min.

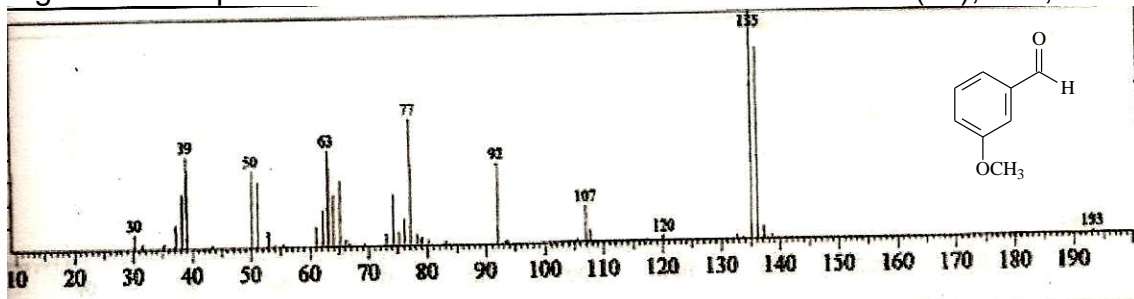


Figura 84 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do furfural (24) com LC.

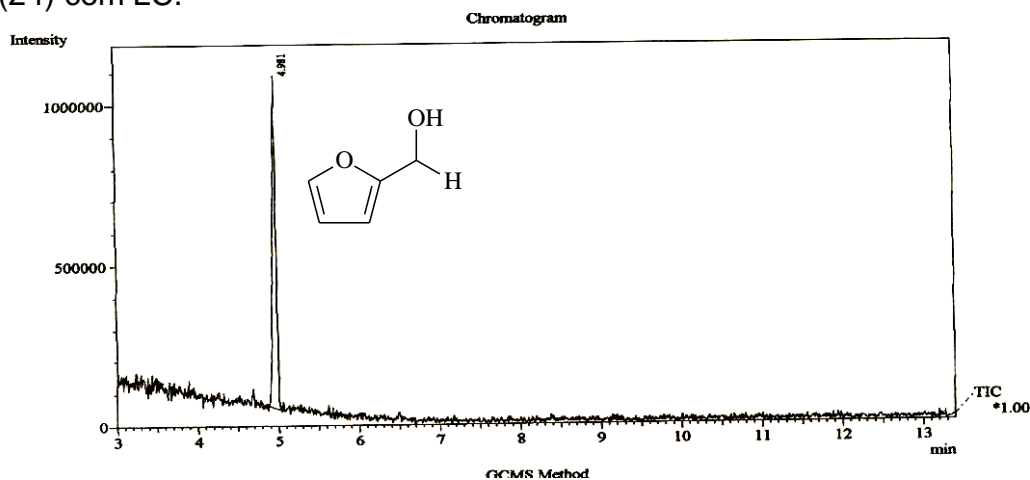
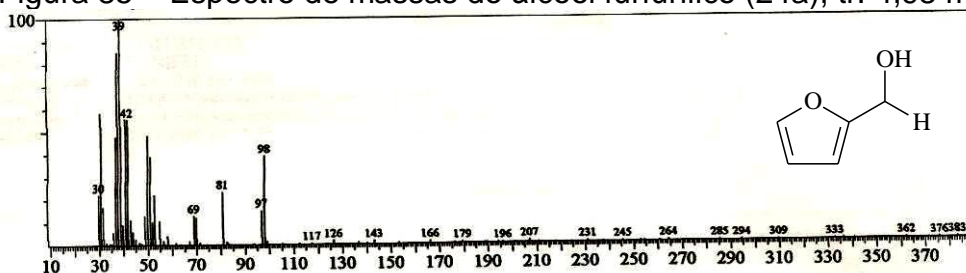


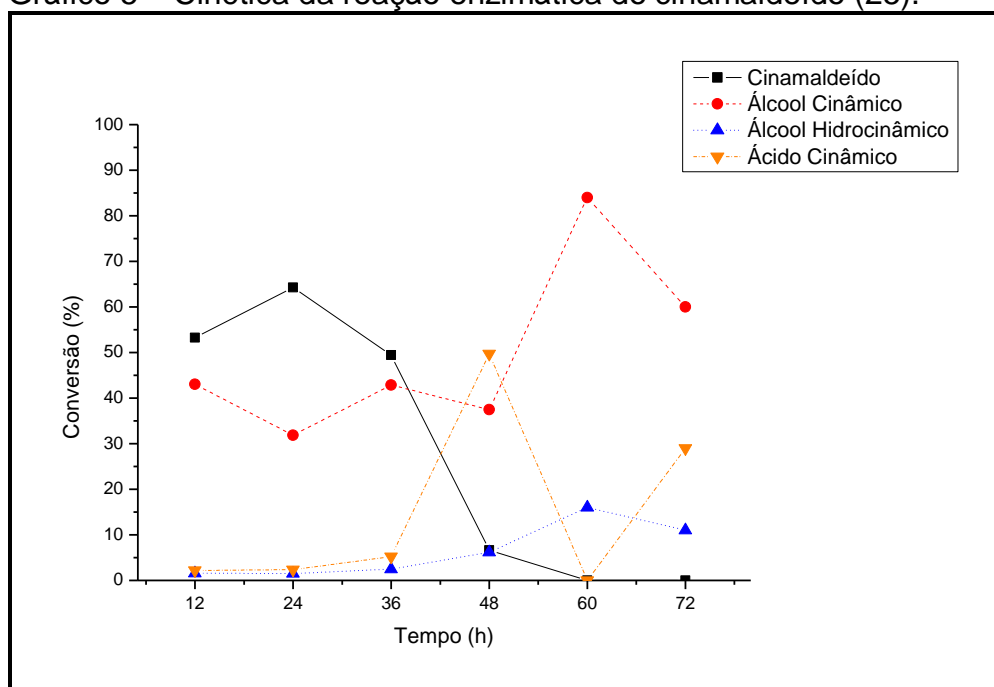
Figura 85 – Espectro de massas do álcool furfurílico (24a), tr: 4,98 min.



Baixa quimiosseletividade foi observada para a redução enzimática do cinamaldeído (**25**), onde três produtos (**25a**, **25b** e **25c**) foram formados, em acordo com publicação anterior (ASSUNÇÃO *et al.*, 2008; BERTINI, 2009). O processo de redução ocorreu somente no grupo carbonila e permitiu a produção de **25a** com rendimento de 60% (ligeiramente superior ao relatado anteriormente (BERTINI, 2009), assim como, simultaneamente no grupo carbonila e na ligação dupla olefínica para produzir **25b** com baixa conversão de 11% (menor que o relatado anteriormente (BERTINI, 2009). Adicionalmente, o grupo formil do cinamaldeído (**25**) foi oxidado produzindo o ácido 3-fenilpropen-1-óico (**25c**) com conversão de 29% um inesperado comportamento para o sistema enzimático em uso (Tabela 13, p. 78). Vale ressaltar que, este mesmo fenômeno foi observado quando da utilização de *Saccharum officinarum* (ASSUNÇÃO *et al.*, 2008) e de *Glycine max* (BERTINI, 2009). Os produtos reacionais foram analisados em CG-EM e os cromatogramas com seus respectivos espectros de massas estão apresentados nas Figuras 86-90 (p. 76-77).

Tendo em vista o aparecimento dos produtos **25b** e **25c**, foi realizado ainda, um estudo cinético com o substrato cinamaldeído (**25**), procurando verificar que produto foi formado inicialmente e como se processaria a reação no decorrer do tempo. Assim, os rendimentos da reação foram monitorados durante o período de 72 horas em intervalos de 12 horas. Os produtos reacionais foram analisados em CG-MS, que permitiu identificar os picos de íons moleculares em m/z 132 (**25**), 134 (**25a**), 136 (**25b**) e 148 (**25c**) juntamente com os picos relativos aos principais fragmentos, respectivamente. O Gráfico 5 ilustra os resultados do estudo cinético no período de 72 horas.

Gráfico 5 – Cinética da reação enzimática do cinamaldeído (**25**).



Inicialmente foi observada uma formação considerável do álcool cinâmico **25a** (43%) e quantidades insignificantes do álcool hidrocínâmico (**25b**) e do ácido cinâmico (**25c**) em 12 horas de reação. Em 24 horas ocorreu um decréscimo na conversão de **25a** e aumento na proporção do aldeído **25**. A partir de 36 horas começa a aparecer os produtos **25b** e **25c** em quantidades consideráveis. Em 48 horas a conversão do ácido cinâmico **25c** atinge o máximo (50%), coincidindo com uma queda brusca na proporção do aldeído residual. Neste tempo observou-se que a velocidade de oxidação superou a de redução (equilíbrio). Em 60 horas a

conversão ao álcool (**25b**) é máxima (84%), e de ácido (**25c**) é o mínimo, indicando que os processos redutivos superam os oxidativos. Esta observação foi corroborada pela conversão máxima do produto, álcool **25b** reduzido nos dois grupos funcionais.

Figura 86 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do cinamaldeído (**25**) com LC em 48 horas.

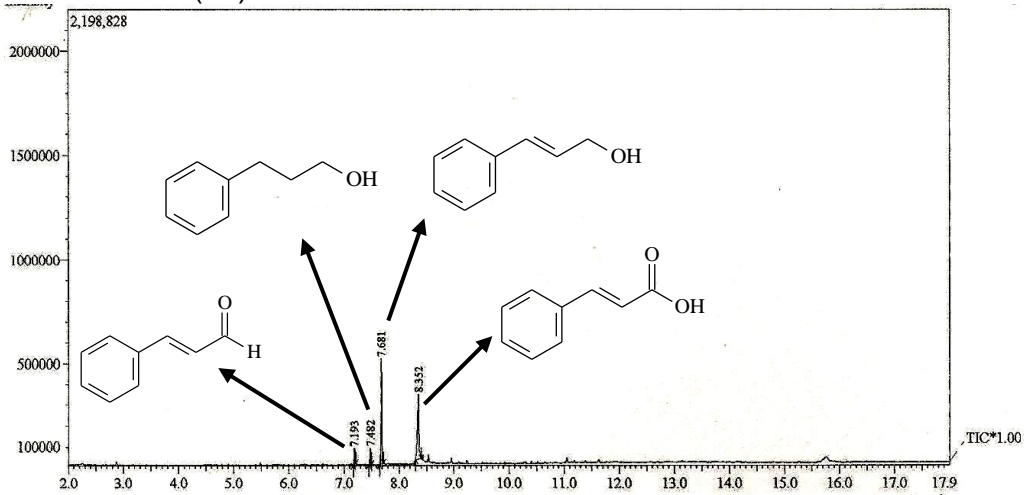


Figura 87 – Espectro de massas do fenilpropanol (**25b**), tr: 7,19 min.

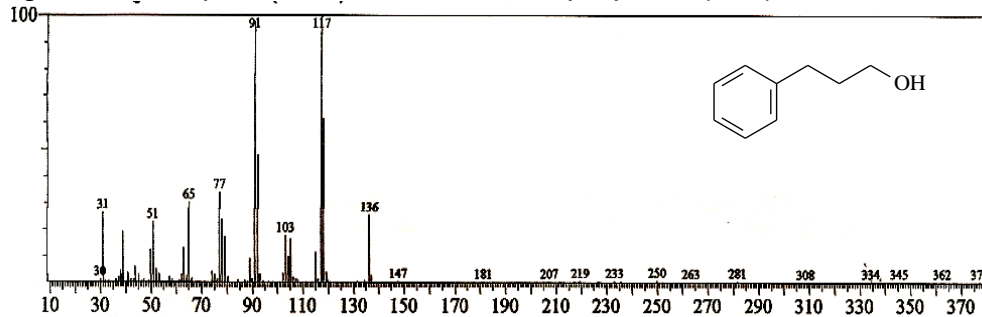


Figura 88 – Espectro de massas do cinamaldeído (**25**), tr: 7,48 min.

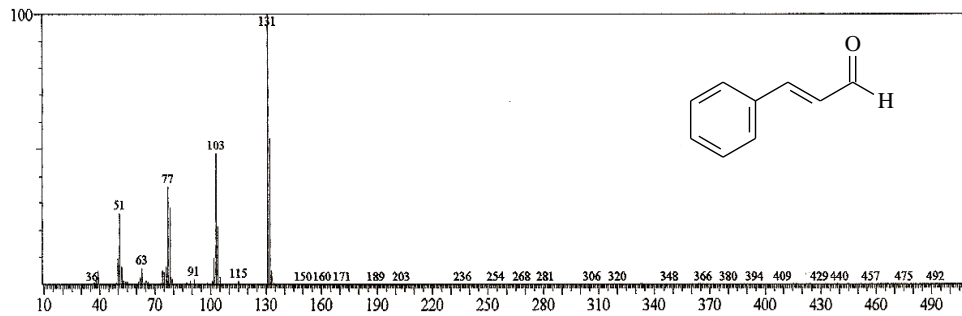


Figura 89 – Espectro de massas do 3-fenilprop-en-1-ol (25a), tr: 7,68 min.

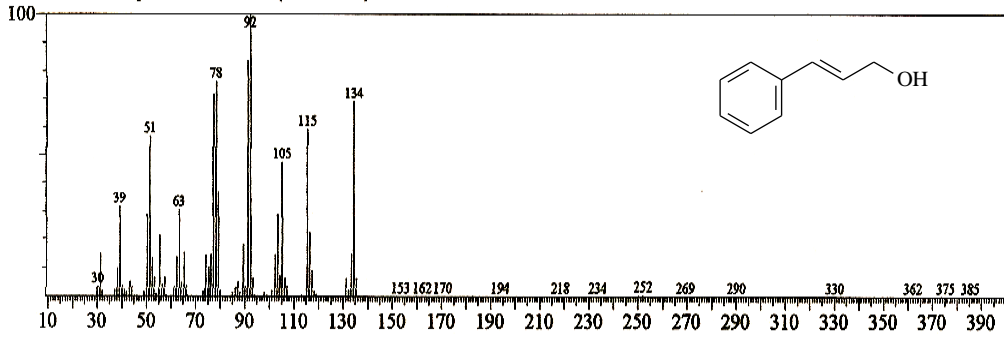


Figura 90 – Espectro de massas do ácido cinâmico (25c), tr: 8,35 min.

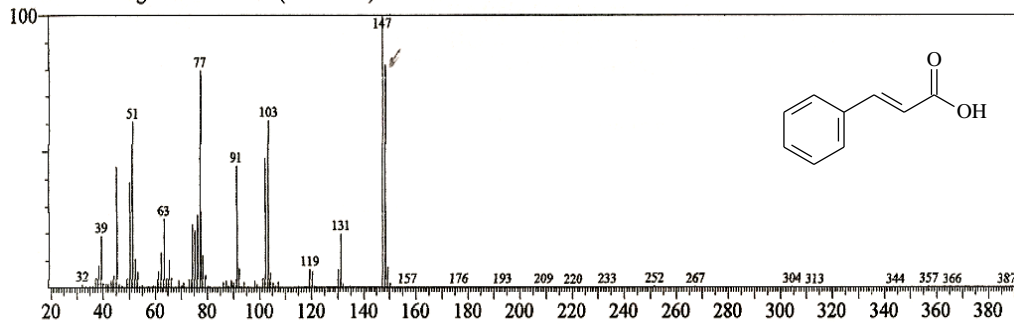


Figura 91 – Biorredução dos aldeídos aromáticos com LC.

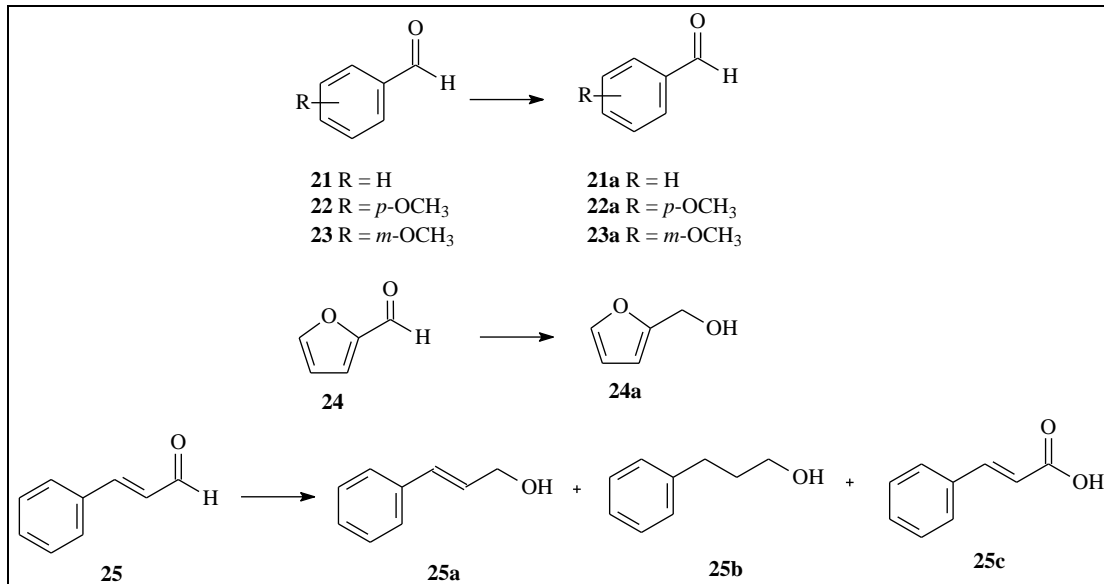


Tabela 13 - Biorredução dos aldeídos aromáticos usando LC.

Entrada	Aldeído	Bioconversão (%)
1	21	≥ 99
2	22	96
3	23	95
4	24	≥ 99
5	25	11 (a), 29 (b) e 60 (c)

4.5.3 Nitrocompostos aromáticos

A redução de nitrocompostos é importante na produção de aminas que são utilizadas como intermediários em vários setores industriais, tais, como pesticidas, polímeros, tintas, farmacêuticos (YE; SINGH; WARD, 2004). Adicionalmente, esta reação também é de interesse nos processos de bioremediação. Alguns trabalhos sobre a biorredução quimiosseletiva a partir de aldeídos e cetonas aromáticas nitro-substituídas são conhecidos (BIZERRA *et al.*, 2010), nos quais, o processo de redução ocorreu exclusivamente no grupo carbonila. Como a redução de nitroacetofenonas (**7-9**) utilizando LC foi observada no presente trabalho (subitem 4.4.2, p. 54), os estudos foram estendidos no sentido de verificar sua capacidade em reduzir outros nitrocompostos aromáticos. Inicialmente a reação de biorredução foi testada tendo o nitrobenzeno (**26**) como substrato modelo, resultando em uma alta eficiência de conversão (80%) em benzamina (**26a**), maior do que a obtida utilizando *Vigna unguiculata* (16%) (BIZERRA *et al.*, 2010) e *Beta vulgaris* (52%) (ANDRADE *et al.*, 2006a). Os espectros de massa do substrato (**26**), (Figura 94, p. 79) e do produto de redução (**26a**) (Figura 93, p. 79) exibiram os picos de íons moleculares em m/z 123 e 93, respectivamente, conforme previsto. A seguir, vários compostos aromáticos nitro-substituídos foram submetidos ao mesmo processo de reação. Efeitos eletrônicos e estéricos foram observados durante o

curso da reação devido a presença de diferentes substituintes no anel aromático (Figura 114 e Tabela 14, p. 87). Todas as análises foram determinadas por CG-EM, com os cromatogramas e espectros de massas mostrados nas Figuras 92-94.

Figura 92 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do nitrobenzeno (26) com LC.

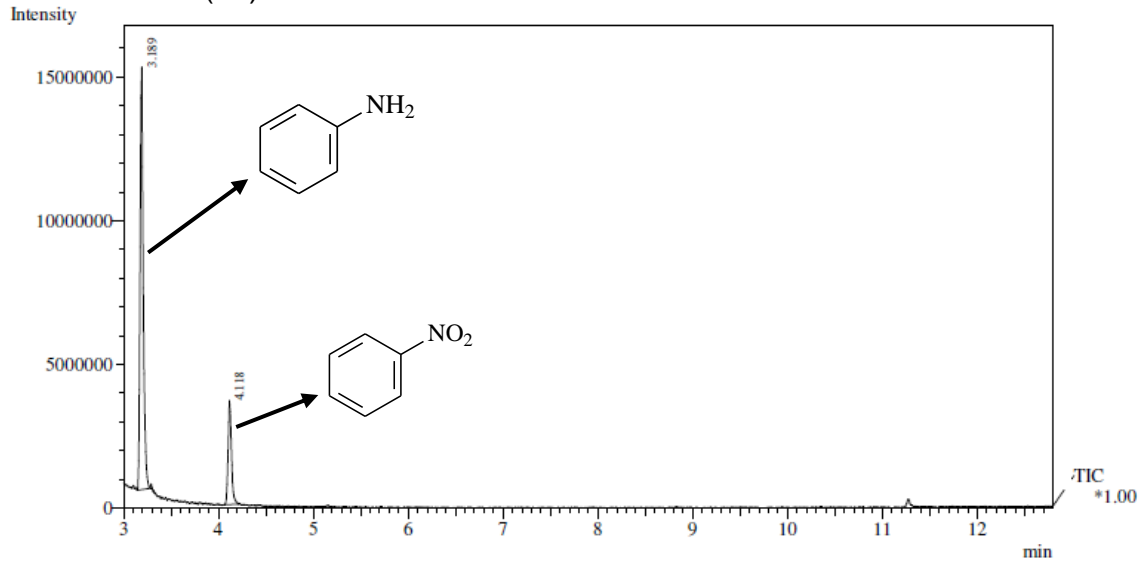


Figura 93 – Espectro de massas do aminobenzeno (26a), tr: 3,18 min.

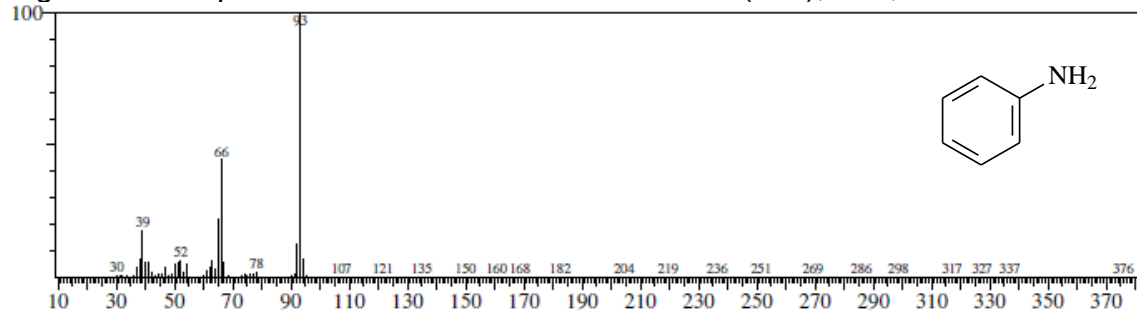
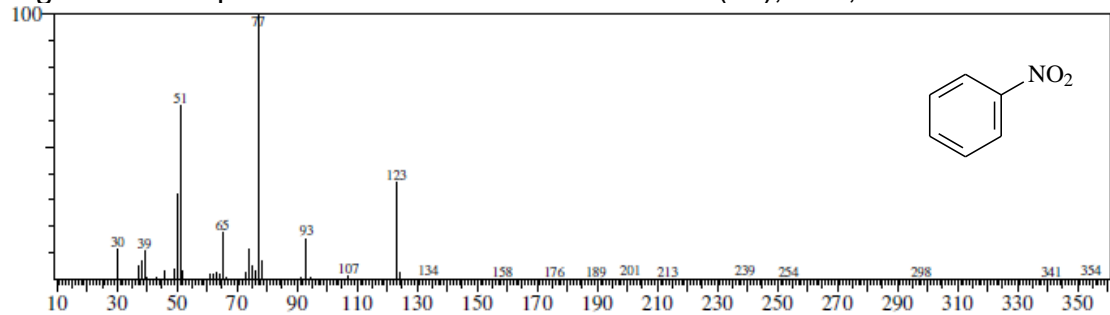


Figura 94 – Espectro de massas do nitrobenzeno (26), tr: 4,11 min.



Como pode ser observado na Tabela 14 (p.87), *p*-cloronitrobenzeno (**27**) foi reduzido a *p*-cloroaminobenzeno (**27a**) com menor rendimento (68%) (Figuras 95 a 97, p. 81), enquanto, *m*-metilnitrobenzeno (**31**), *p*- metilnitrobenzeno (**32**), *o*-hidroxinitrobenzeno (**33**) e *p*-hidroxinitrobenzeno (**34**), praticamente, não foram reduzidos (Figuras 104 a 113, p. 83 a 87). Esses resultados indicaram que a presença de substituintes doadores de elétrons (-CH₃, -OMe, -OH), diminuíram o rendimento da reação. Para os derivados *m*-nitrotolueno (**31**) e *p*-nitrotolueno (**32**), com substituintes doadores de elétrons relativamente fracos, foram observadas baixas conversões (4 e 2%, respectivamente). A menor reatividade de **32** pode ser justificada ainda, pela maior influência do efeito doador do grupo metil (indução e hiperconjugação) na posição *para*, diminuindo ainda mais a eletrofilicidade do grupo nitro. Quando os substituintes foram doadores eletrônicos mais efetivos (mesomeria) como *o*-nitrofenol (**33**) e *p*-nitrofenol (**34**) foram verificados uma neutralização total da atividade enzimática, não sendo observada evidência de formação de aminofenol (Figuras 110 a 113, p. 87 e 88). Em contraste, quando *orto*- (**28**), *meta*- (**29**) e *para*-carboxilnitrobenzeno (**30**) foram tratados com LC, os isômeros *orto*- e *meta*- não foram reduzidos, ao passo que, o isômero *para*-(**30**) foi reduzido com um excelente rendimento (≥99%) (Figuras 98 a 103, p. 82 a 83). Em **30**, o grupo carboxilo, retirador de elétrons, está localizado na posição *para*, ou seja, conjugado ao átomo de carbono ligado ao grupo nitro, enquanto, em **29** o grupo carboxilo está em posição *meta* (não diretamente conjugado com o carbono ligado ao grupo nitro). Já, no caso do isômero **28**, um possível efeito estérico devido ao grupo carboxilo na posição *orto* em relação ao grupo nitro impediu a reação.

Figura 95 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 4-cloronitrobenzeno (27) com LC.

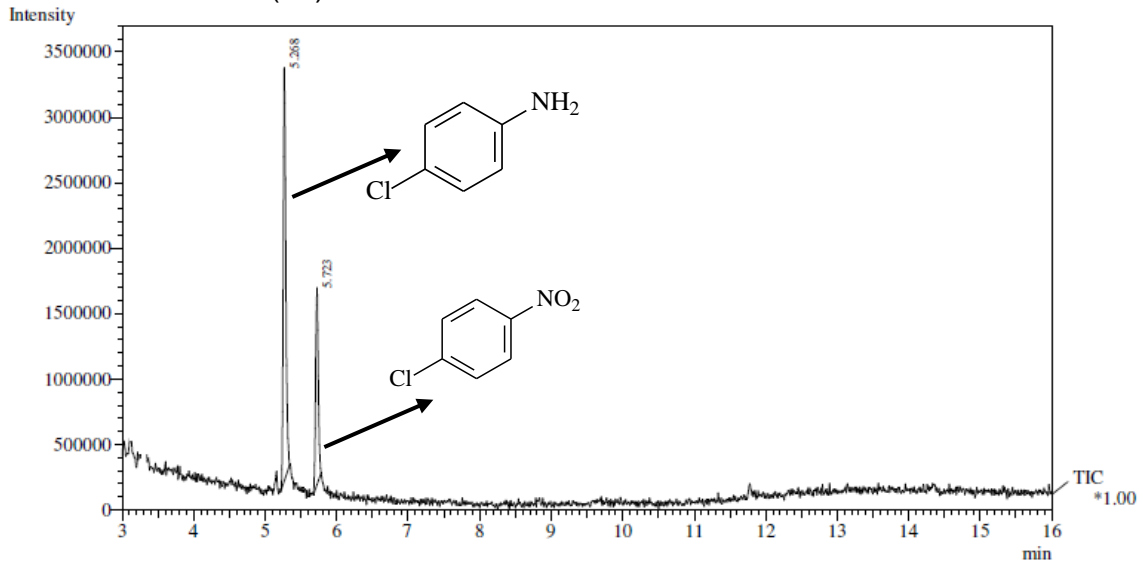


Figura 96 – Espectro de massas do 4-cloroaminobenzeno (27), tr: 5,26 min.

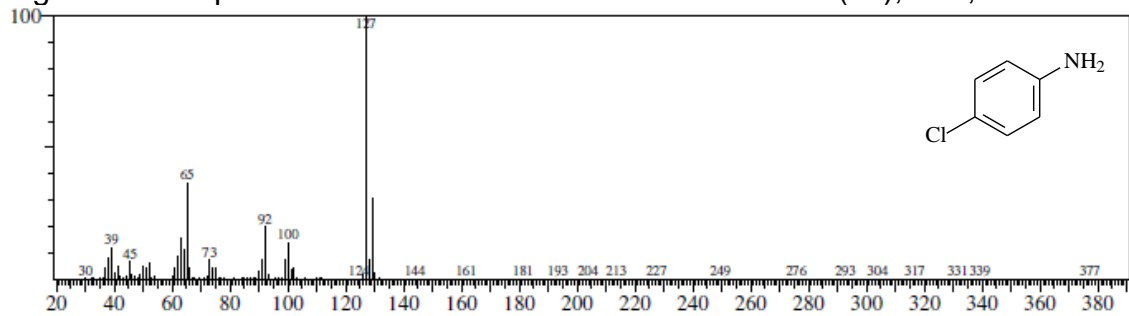


Figura 97 – Espectro de massas do 4-cloronitrobenzeno (27), tr: 5,72 min.

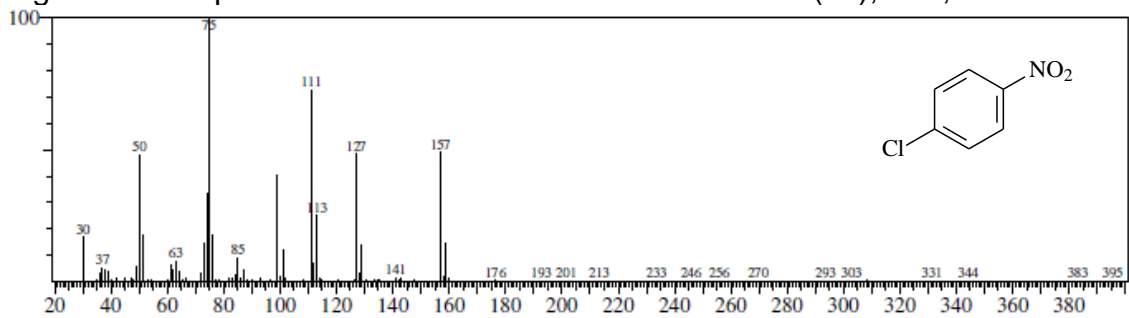


Figura 98 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do ácido 2-nitrobenzóico (28) com LC.

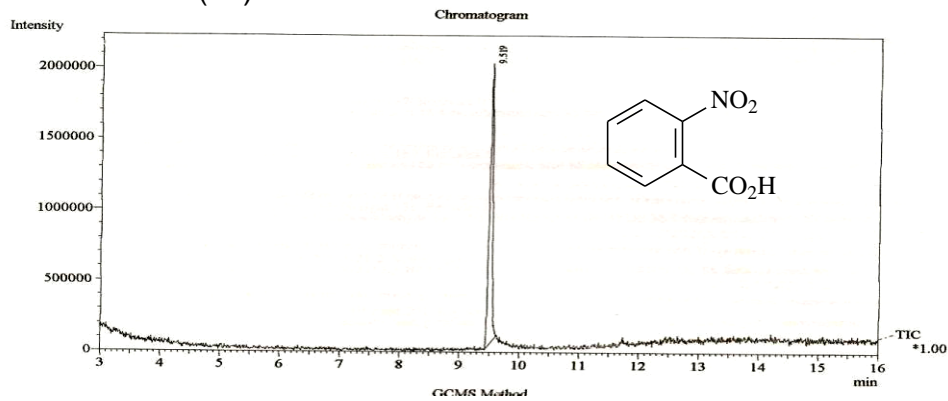


Figura 99 – Espectro de massas do ácido 2-nitrobenzóico (28), tr: 9,51min.

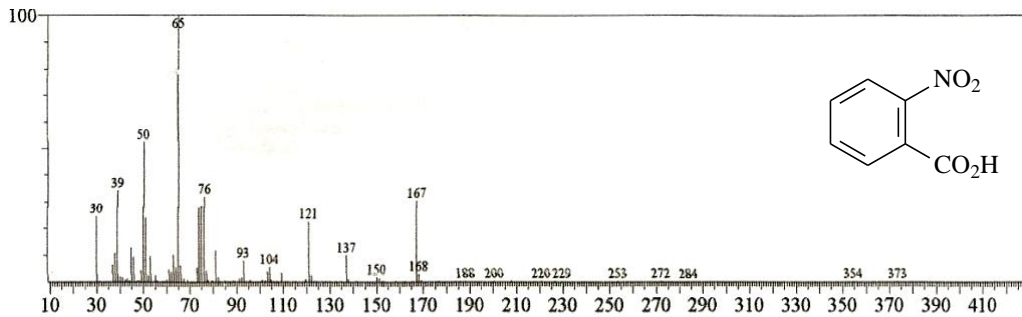


Figura 100 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do ácido 3-nitrobenzóico (29) com LC.

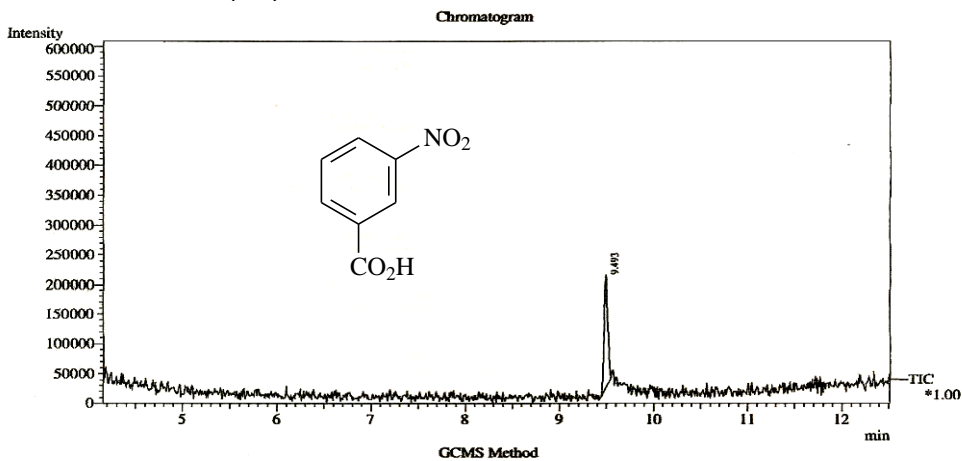


Figura 101 – Espectro de massas do ácido 3-nitrobenzóico (29), tr: 9,49min.

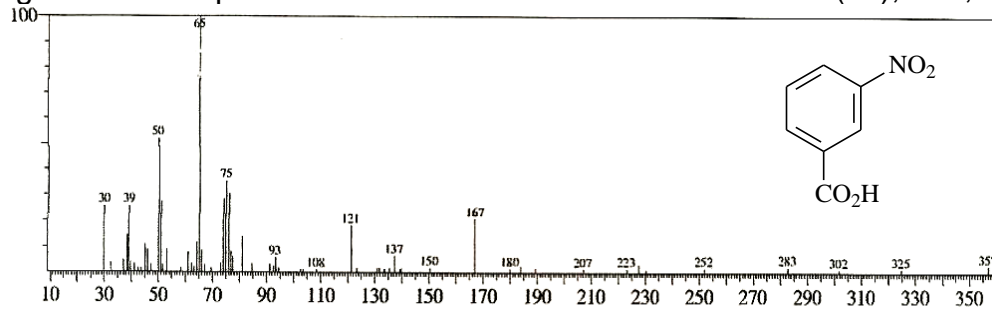


Figura 102 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do ácido 4-nitrobenzóico (30) com LC.

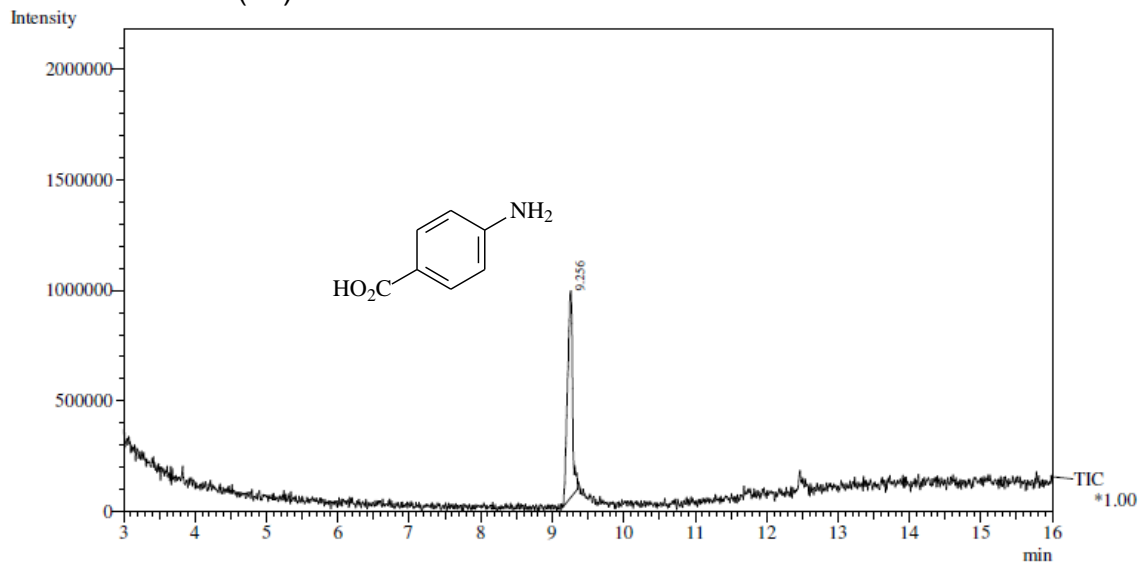


Figura 103 – Espectro de massas do ácido 4-aminobenzóico (30a), tr: 9,25 min.

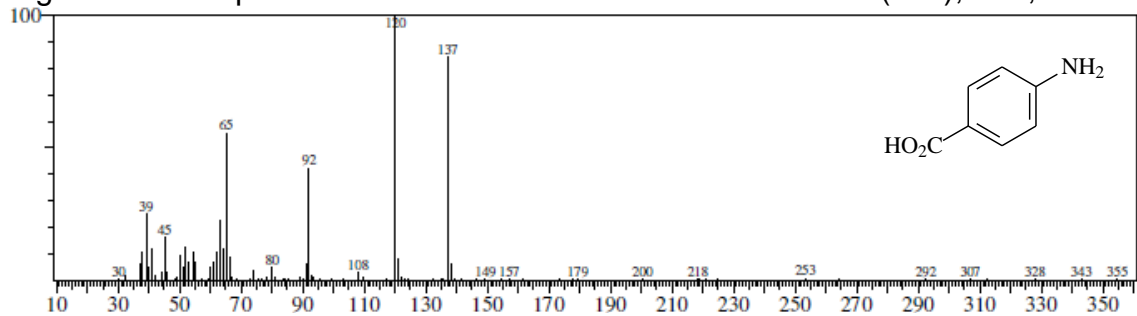


Figura 104 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 3-nitrotolueno (31) de LC.

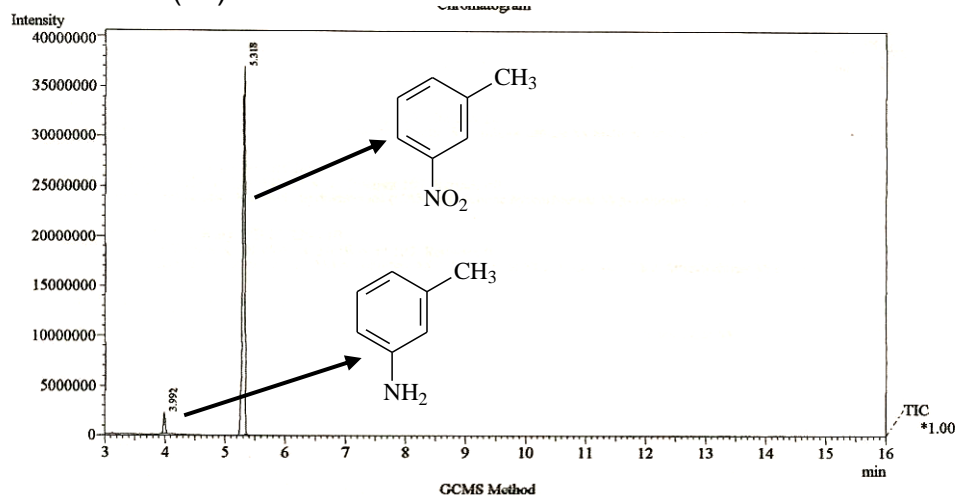


Figura 105 – Espectro de massas do 4-aminotolueno (30a), tr: 3,99 min.

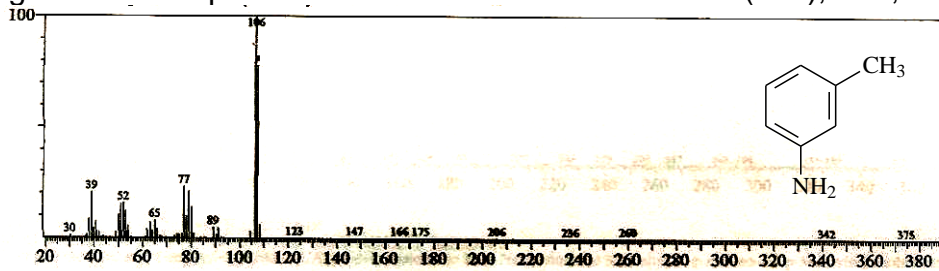


Figura 106 – Espectro de massas do ácido 4-nitrotolueno (31), tr: 5,31 min.

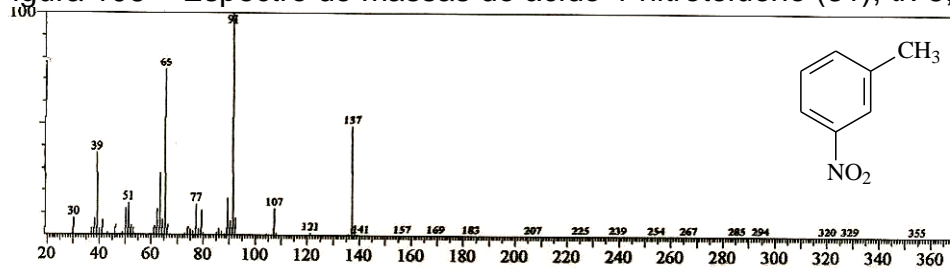


Figura 107 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 4-nitrotolueno (32) com LC.

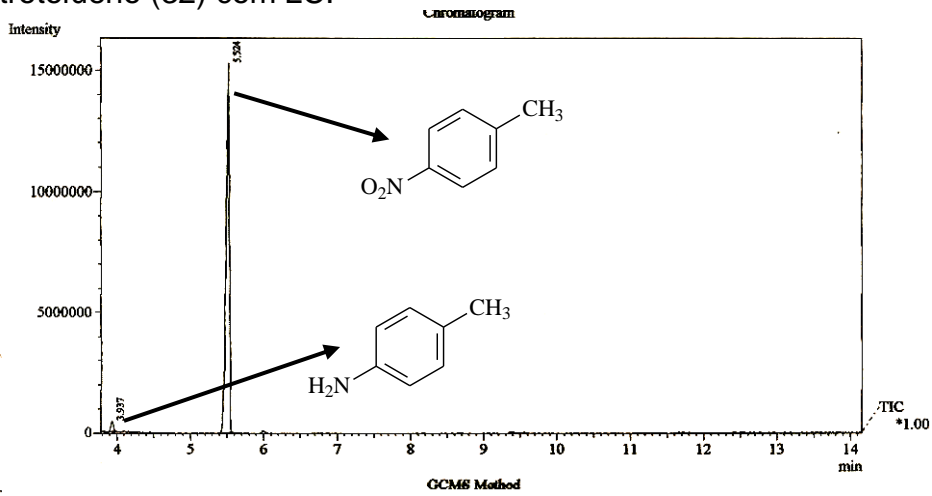


Figura 108 – Espectro de massas do 4-aminotolueno (32a), tr: 3,93 min.

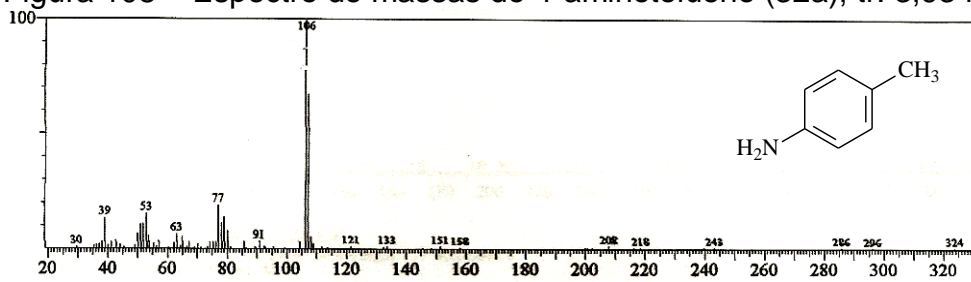


Figura 109 – Espectro de massas do 4-nitrotolueno (32), tr: 5,52 min.

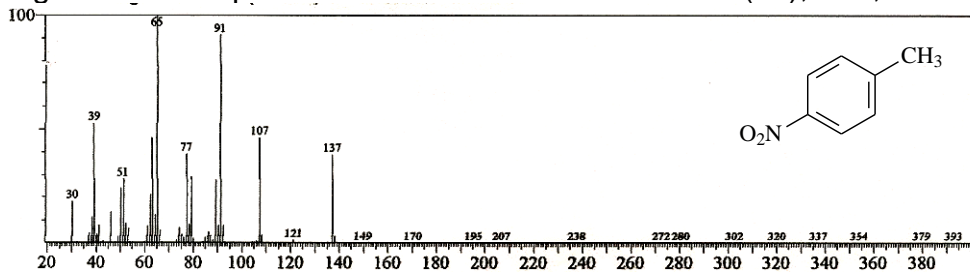


Figura 110 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 2-nitrofenol (33) com LC.

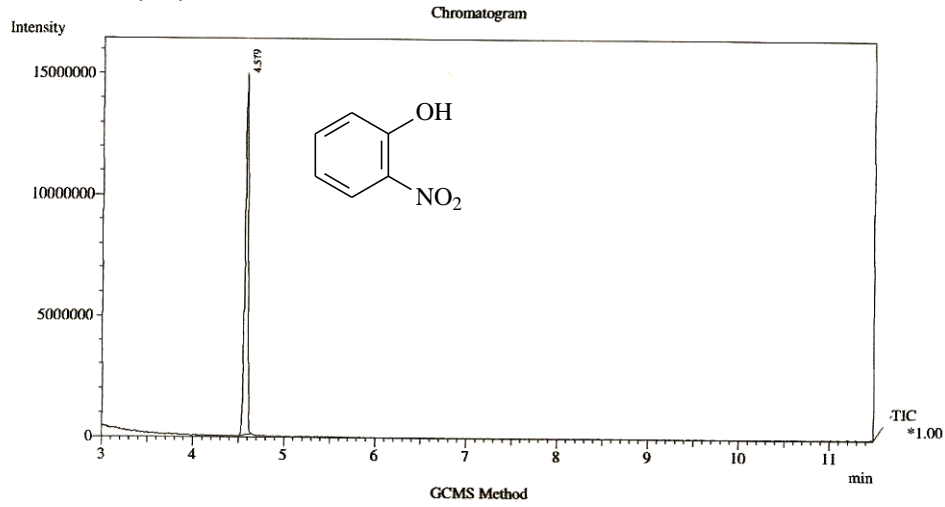


Figura 111 – Espectro de massas do 2-nitrofenol (33), tr: 4,57 min.

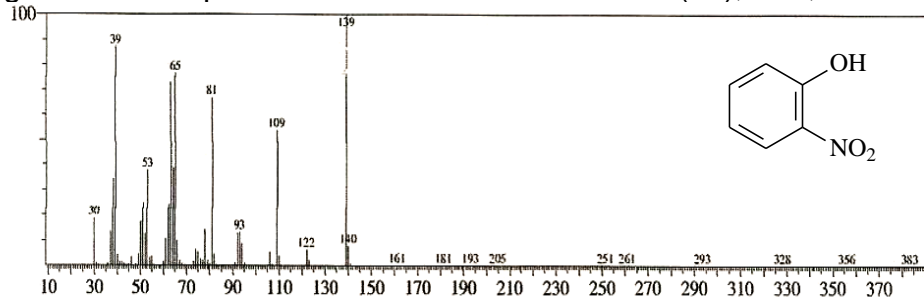


Figura 112 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da biorredução do 4-nitrofenol (34) com LC.

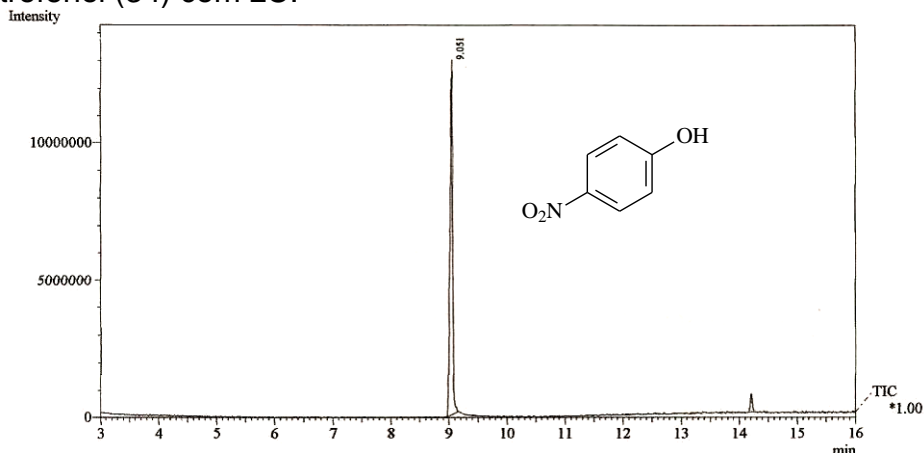


Figura 113 – Espectro de massas do 4-nitrofenol (34), tr: 9,05 min.

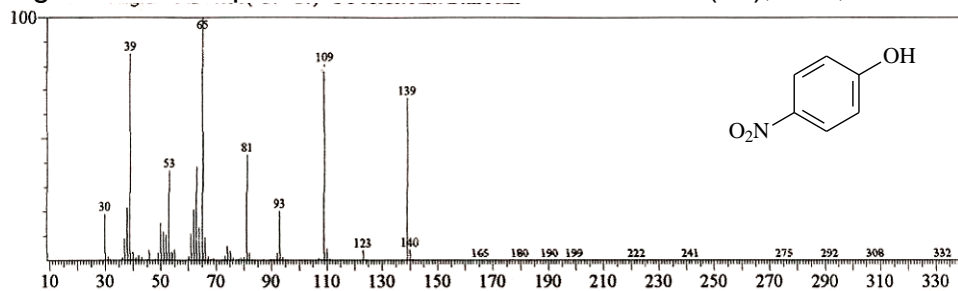


Figura 114 – Biorredução de nitrocompostos usando LC.

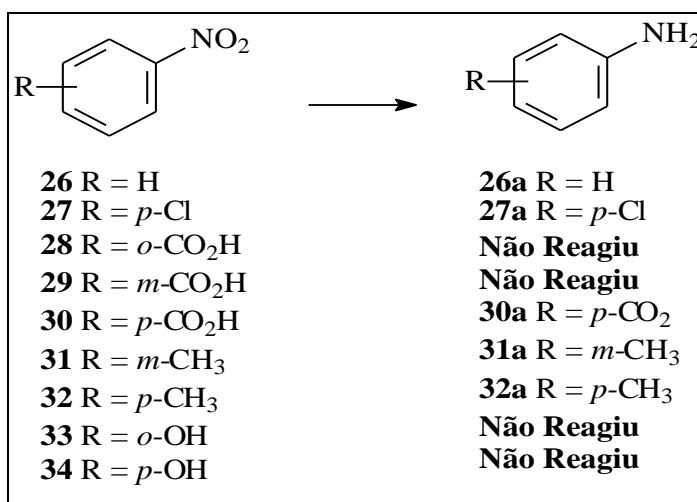


Tabela 14 - Biorredução dos nitrocompostos usando LC.

Entrada	Nitrocomposto	Bioconversão ^a (%)
1	26	80
2	27	68
3	28	N.R
4	29	N.R
5	30	≥ 99
6	31	4
7	32	2
8	33	N.R
9	34	N.R

N.R - Não Reagiu

^aBioconversão determinado por CG-EM

4.6 Hidrólises de ésteres

Estudos anteriores já mostraram a capacidade de sistemas intactos de plantas para hidrolisar misturas racêmicas de ésteres quirais, onde a comparação de hidrólises de uma série de acetatos alifáticos e aromáticos e metil ésteres indicaram acentuadas diferenças nas velocidades de reações (MIRONOWICZ; JAROSZ; SIEWINSKI, 1995). Conseqüentemente, um variado número de diferentes enzimas, inclusive hidrolases, têm sido envolvidas no objetivo de efetuar hidrólises de ésteres na formação de ácidos e álcoois quirais. O sistema enzimático de LC foi testado no objetivo de promover a hidrólise de acetatos aromáticos e outros ésteres com resultados que se coadunam com aqueles registrados na literatura utilizando outras fontes vegetais (ASSUNÇÃO *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2009; BIZERRA *et al.*, 2010).

Esses testes começaram por investigar a capacidade hidrolítica de LC tendo como substrato o acetato de *p*-nitrofenila (**35**). Para tanto, o primeiro passo consistiu em obter **35** através de reação química clássica a partir do *p*-nitrofenol (**34**).

4.6.1 Reação de acetilação convencional do *p*-nitrofenol

O composto *p*-nitrofenol (**34**) foi submetido uma reação de acetilação, conforme metodologia descrita do subitem 5.4.8 (p. 110), a fim de obter acetato de *p*-nitrofenila (**35**) (Esquema 6, p. 89). Rendimento reacional na obtenção a 99% (Figura 115, p. 89).

Esquema 6 – Reação de acetilação convencional do *p*-nitrofenol (34).

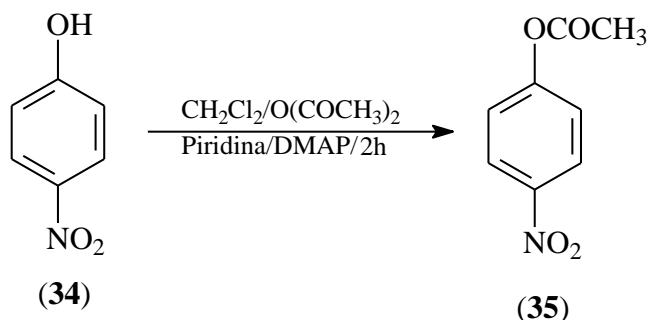
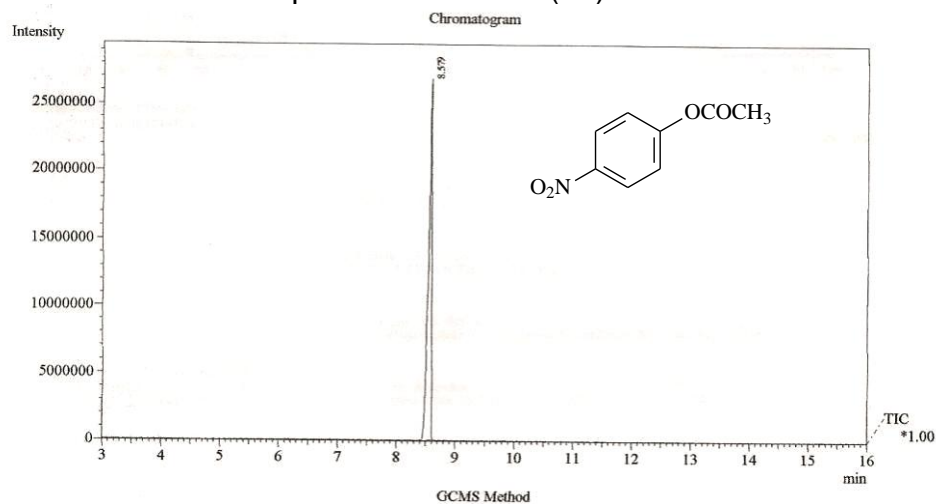


Figura 115 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da reação de acetilação convencional do composto 4-nitrofenol (34).



4.7 Reação enzimática do acetato de *p*-nitrofenila (35)

O acetato de *p*-nitrofenila (35) em presença de LC, utilizando mesma metodologia descrita para as reações de biorredução, foi hidrolisado para formar *p*-nitrofenol (35a) em excelente conversão (>99%) (Esquema 7, p. 90; Figura 118, p. 91). Quando realizada em branco (reação sem o biocatalisador) foi observado apenas uma pequena taxa de conversão (3%) de 35 no produto hidrolisado (Figuras 116-118, p. 90).

Esquema 7 – Reação de hidrólise de acetato de *p*-nitrofenila (35) usando LC.

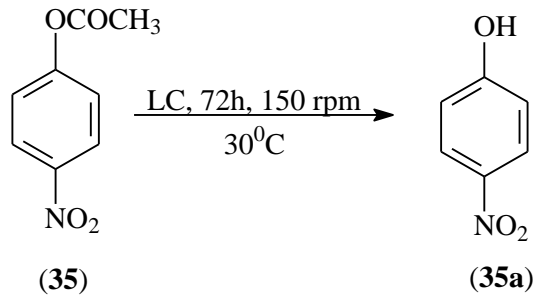


Figura 116 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto da reação em branco do acetato de 4-nitrofenila (35).

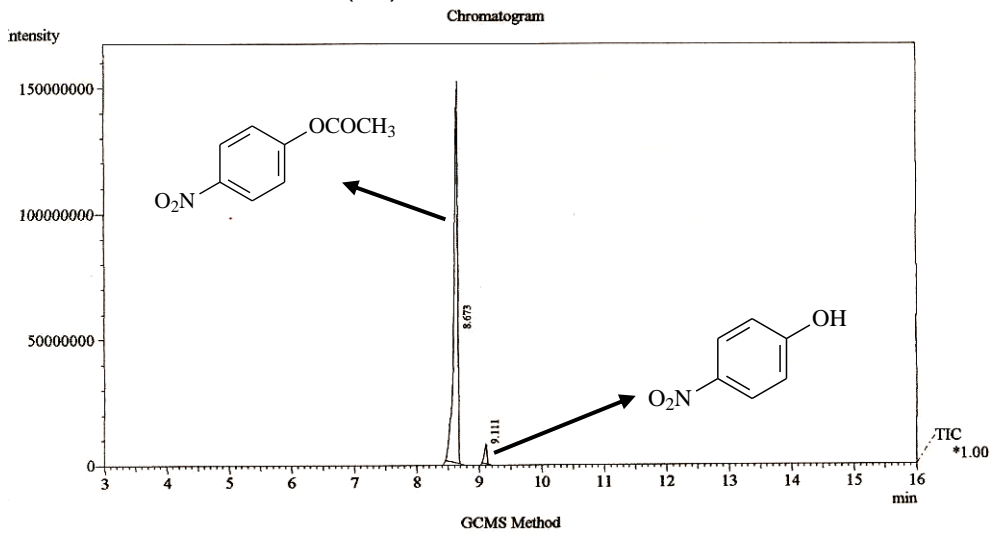


Figura 117 – Espectro de massas do acetato 4-nitrofenila (35), tr: 8,67 min.

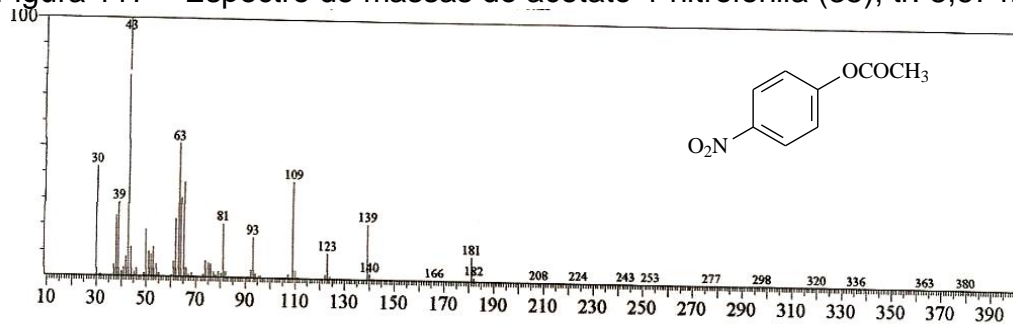


Figura 118 – Espectro de massas do 4-nitrofenol (35a), tr: 9,11 min.

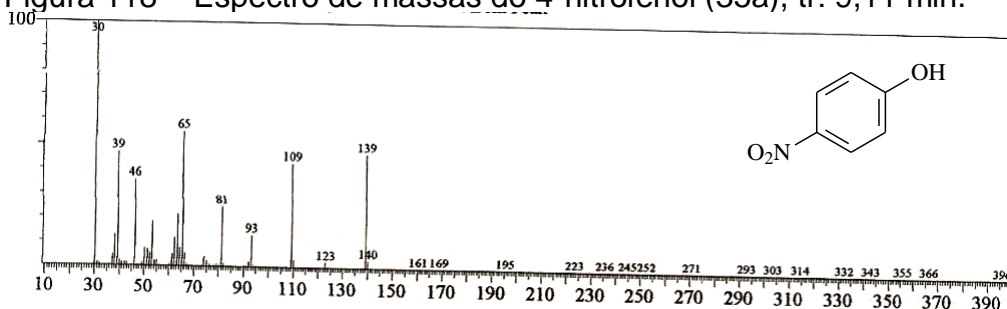
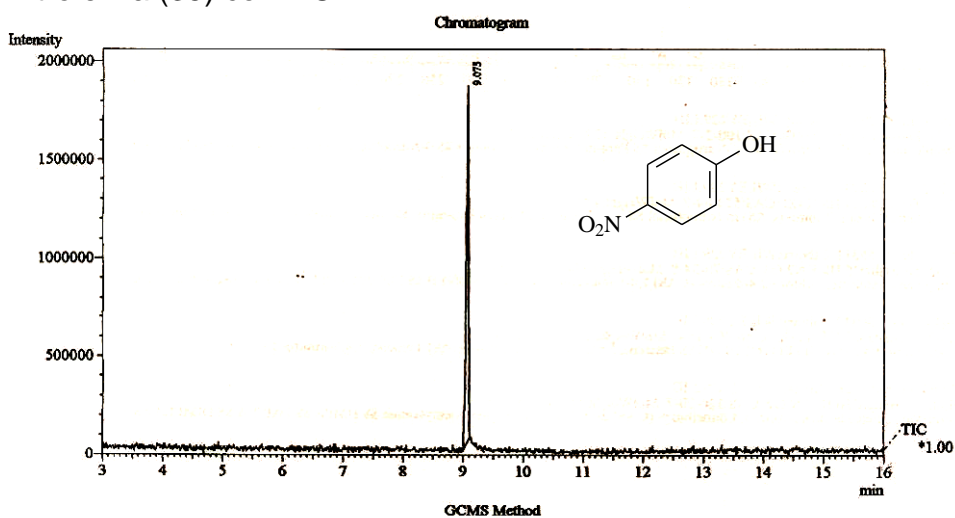


Figura 119 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto de hidrólise do acetato de 4-nitrofenila (35) com LC.



Foi também investigada a possibilidade de hidrólise de outros dois ésteres aromáticos, benzoato de metila (**38**) e benzoato de etila (**39**). Porém, somente o éster **38** mostrou indício de reatividade, com uma conversão de apenas 5% em ácido benzóico (**38a**) (Figuras 124 a 128, p. 93 a 94).

4.8 Outras reações enzimáticas de hidrólise com LC

A capacidade hidrolítica do complexo enzimático de LC foi avaliada, conforme metodologia das reações de biorredução, frente a outros derivados de ácido carboxílico como nitrilas e amidas. Os compostos aromáticos testados foram benzonitrila (**36**) e benzamida (**37**) (Esquema 8, p. 92), que não mostraram nenhuma evidência de reação (Figuras 120 a 123, p. 92 e 93).

Esquema 8 – Reações de hidrólise usando LC.

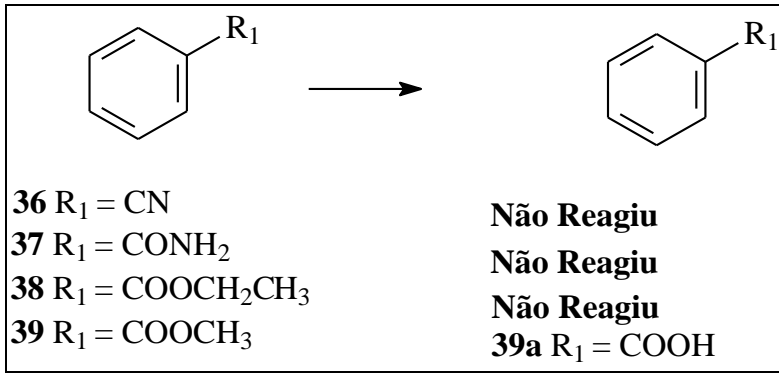


Figura 120 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto de hidrólise do benzonitrila (36) com LC.

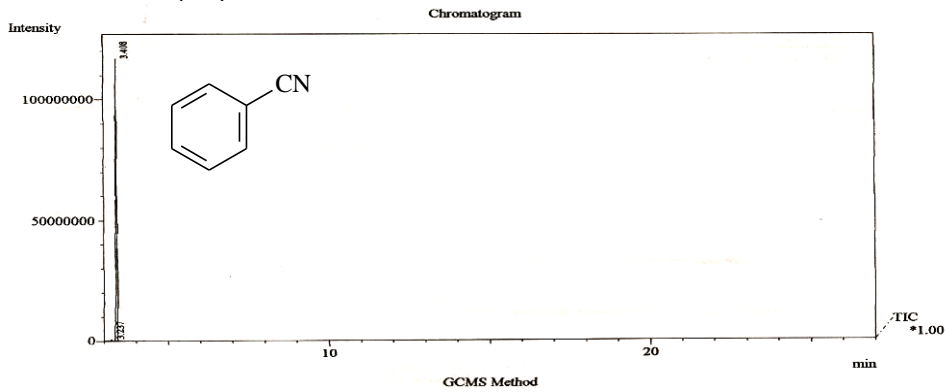


Figura 121 – Espectro de massas da benzonitrila (36), tr: 3,40 min.

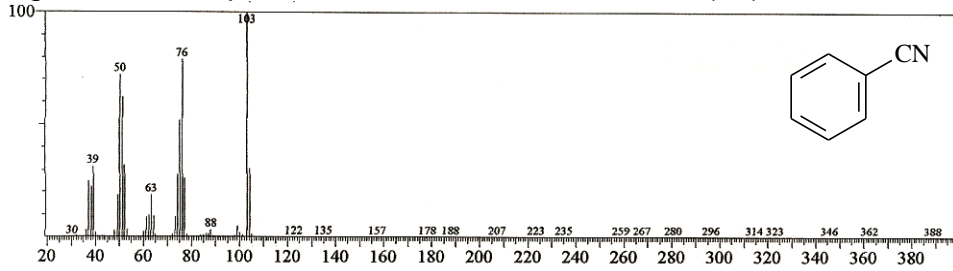


Figura 122 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto de hidrólise da benzamida (37) com LC.

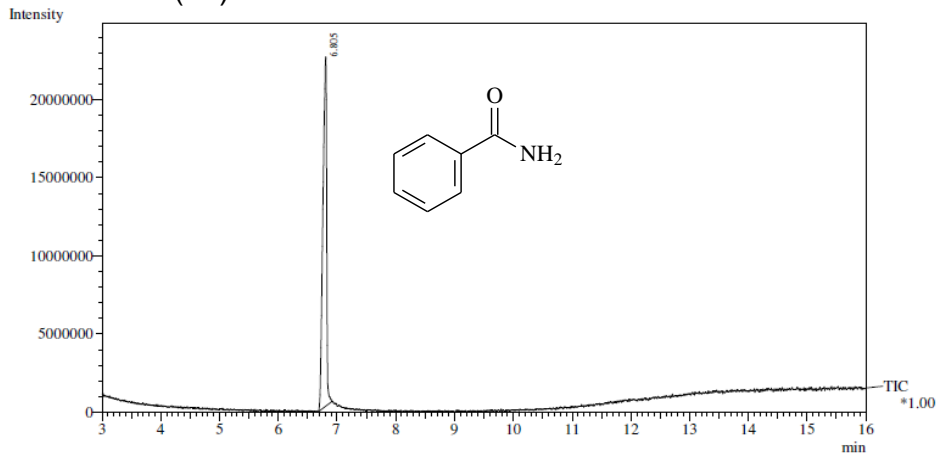


Figura 123 – Espectro de massas da benzamida (37), tr: 6,80 min.

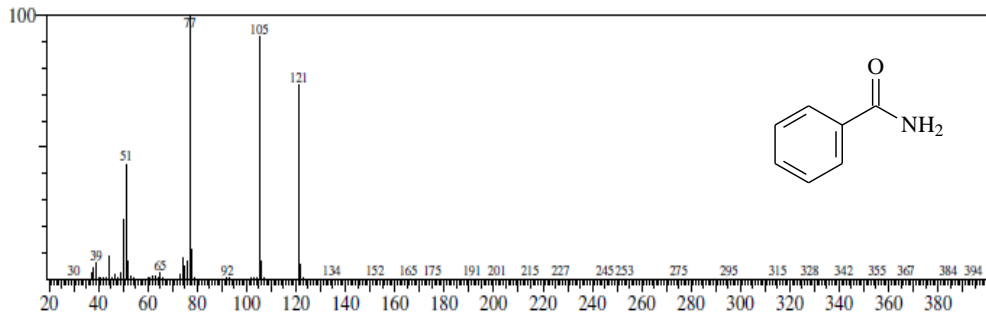


Figura 124 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto de hidrólise do benzoato de etila (38) com LC.

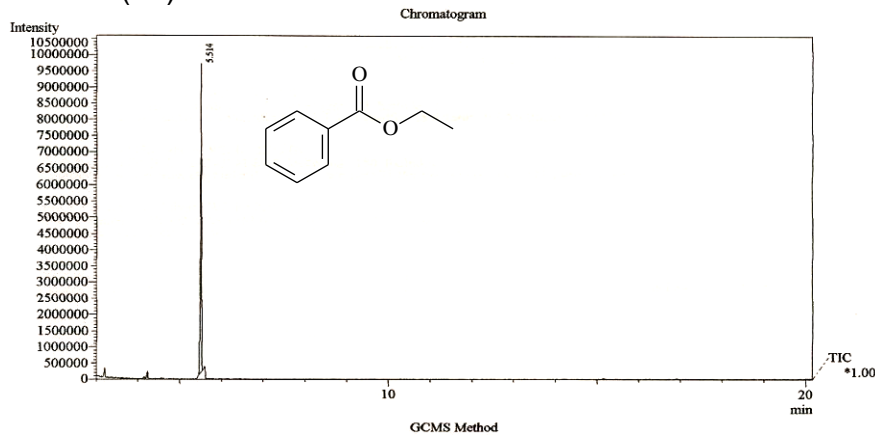


Figura 125 – Espectro de massas do benzoato de etila (38), tr: 5,51 min.

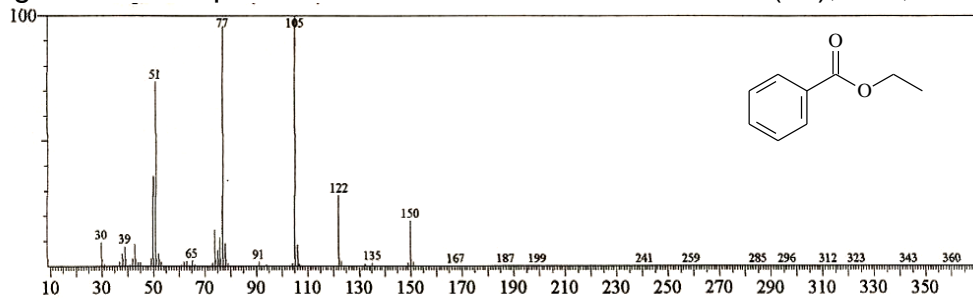


Figura 126 – Cromatograma obtido por CG-EM do produto de hidrólise do benzoato de etila (39) com LC.

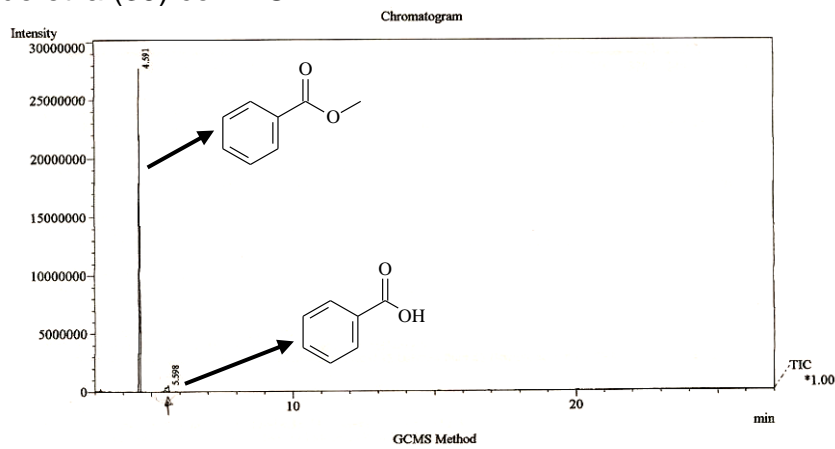


Figura 127 – Espectro de massas do benzoato de metila (39), tr: 4,59 min.

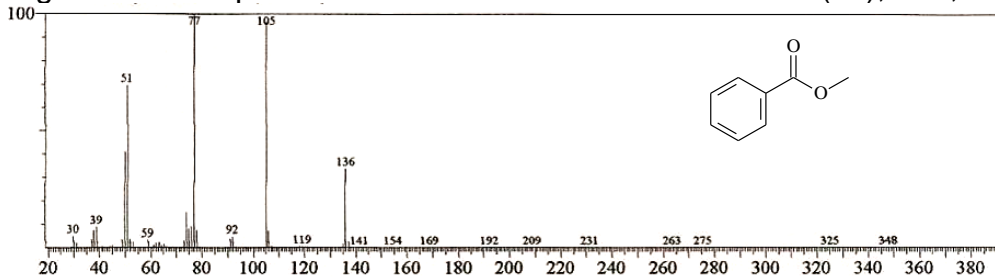
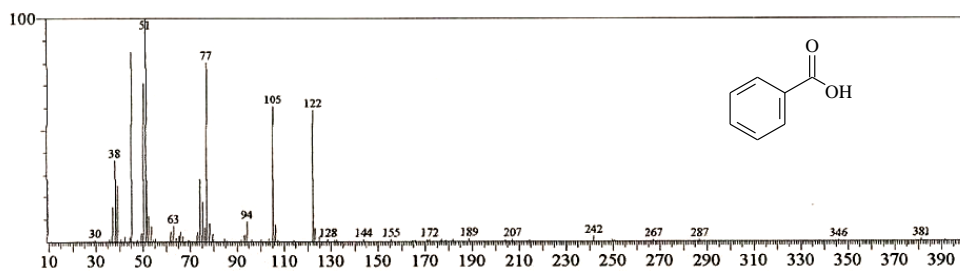


Figura 128 – Espectro de massas do ácido benzóico (39a), tr: 5,59 min.

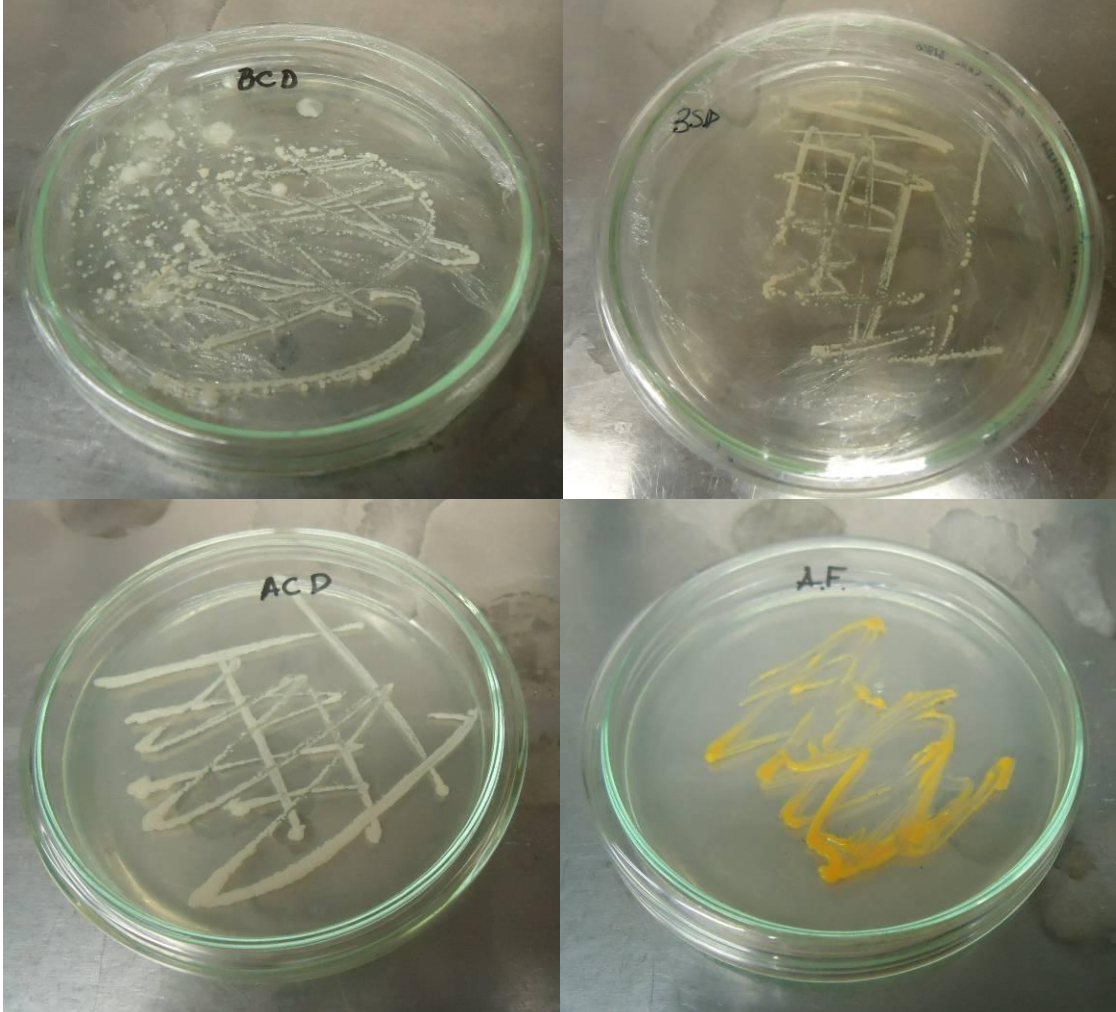


4.9 Determinação de micro-organismos endofíticos em LC

Objetivando a determinação da presença de possíveis micro-organismos (principalmente fungos/leveduras) endofíticos nas sementes de LC, realizou-se um estudo exploratório que consistiu no cultivo dos mesmos em meio de crescimento adequado com antibiótico. A importância desta investigação foi avaliar se houve a possível participação destes nos processos catalíticos. O procedimento deste experimento está descrito no subitem 5.4.10 (p. 111).

Ao final dos experimentos, pode-se verificar o crescimento de três micro-organismos ao final de oito dias e mais um em doze dias. Estes foram designado como: branca com disco (BCD), branca sem disco (BSD), amarelo com disco (ACD) e amarelo forte (AF). Ver Figura 129 (p. 96).

Figura 129 – Fotografia dos quatros micro-organismo repicados individualmente.



Fonte: Daniele Alves Ferreira

Os resultados mostraram a presença de possíveis interferentes no sistema enzimático do vegetal. Porém, deve-se ressaltar que o tempo de crescimento dos mesmos foi de no mínimo oito dias e todas as reações biocatalíticas foram realizadas em três dias, indicando que aparentemente durante a reação enzimática não houve crescimento dos micro-organismos, principalmente leveduras ou fungos. Cabe ressaltar que não foi realizado um estudo de qual meio seria o melhor para o crescimento dos micro-organismos.

4.10 Teste de atividade lipasíca dos micro-organismos endofíticos de LC

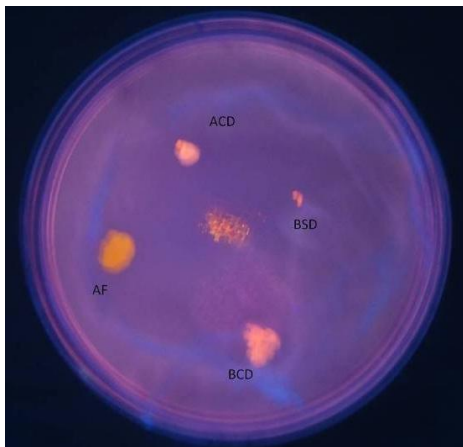
O teste de atividade lipolítica foi realizado para os quatro micro-organismos, usando como controle positivo *Candida rugosa* Lipase. Após incubação durante doze dias, à 23 °C, as colônias foram transferidas para o meio de cultura (BDA), contendo Rodamina B (0,02% m/v) (Figura 130). Após 24 horas de incubação os microorganismos foram analisados por fluorescência sob irradiação UV-365 nm, sendo observada uma cor laranja no material, indicativa de teste positivo de atividade lipolítica (Figura 131) (CADIRCI; YASA, 2010). O procedimento experimental encontra-se descrito no subitem 5.4.11 (p. 111).

Figura 130 – Fotografia dos quatros micro-organismos sem irradiação UV para o teste de lipase.



Fonte: Daniele Alves Ferreira

Figura 131 – Fotografia dos quatros micro-organismos sob irradiação UV para o teste de lipase.



Fonte: Daniele Alves Ferreira

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Material utilizado

Todos os reagentes comerciais usados nos ensaios de biotransformação foram de procedência MERCK, SINC ou SIGMA-ALDRICH. O biocatalisador, sementes de lentilha (*Lens culinaris*), foi comprado em loja de produtos naturais (Celeiro Alimentos e Produtos Naturais) no Mercado Central de Fortaleza-Ceará. Os solventes utilizados nos tratamentos das reações e colunas cromatográficas são de procedência comercial SYNTH. Os reagentes: tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), carbonato de sódio (Na_2CO_3), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), Tween 80 P. S, Rodamina B são todos de procedência VETEC. Borohidreto de sódio (NaBH_4) foi adquirido da PROSYNTH, reagente de Folin-Cicateau da QEEL – Química Especializada Erich LTDA, batata-dextrose-ágar foi adquirido da DIFCO™, Lipase de *Candida rugosa* de procedência SIGMA-ALDRICH, azeite de oliva extra virgem de procedência La Española.

As determinações de massas foram realizadas numa balança analítica Ohaus Analytical Plus. As reações enzimáticas foram realizadas em mesa agitadora modelo 109 da NOVA ÉTICA.

5.2. Métodos de Análise

As análises necessárias para obtenção dos espectros e cromatogramas, incluindo técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV/VIS) foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

5.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As cromatografias de adsorção em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando cromatoplasmas de gel de sílica 60 ($\Phi = 2-25 \mu\text{m}$) sobre poliéster T-6145, compradas da SIGMA CHEMICAL CO., com camada de $250 \mu\text{m}$ de espessura e dimensões de $20 \times 20 \text{ cm}$ com fluorescência.

A revelação das substâncias nas cromatoplasmas foi realizada através de pulverização com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, 5 g) e ácido perclórico (HClO_4 , 0,75 mol/L, 100 mL) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 100 mL) ou por imersão da placa em solução de permanganato de potássio (KMnO_4 , 2 g) com hidróxido de sódio (NaOH , 8-10 lentilhas), carbonato de potássio (K_2CO_3 , 10 g) e 200 mL de água destilada, seguida de aquecimento em chapa aquecedora em temperatura em torno de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente 5 minutos.

5.2.2. Cromatografia em Coluna por adsorção

Os produtos reacionais, após extração, foram purificados em coluna cromatográfica utilizando como adsorvente sílica gel 60 ($\Phi = 0,025-0,020 \text{ mm}$) de procedência VETEC. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as massas das amostras e de sílica utilizadas. Para eluição foram usadas diclorometano, hexano e acetato de etila puros ou misturas binárias.

5.2.3. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Os produtos reacionais obtidos foram analisados e quantificados por CG-EM em um equipamento SHIMADZU QP5050A equipado com coluna capilar de dimetilpolisiloxano OV-5 ($30,0 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$) usando hélio a $1,0 \text{ mL/min}$ como gás carregador, em modo split, operando com gradientes de temperatura que variavam dependendo da natureza química dos compostos analisados. Os programas de aquecimento utilizados foram: $3 \text{ }^\circ\text{C/min}$ de $100-130 \text{ }^\circ\text{C}$; $3 \text{ }^\circ\text{C/min}$ de $100-130 \text{ }^\circ\text{C}$ e $40 \text{ }^\circ\text{C/min}$ de $130-300 \text{ }^\circ\text{C}$; $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ de $100-180 \text{ }^\circ\text{C}$ e de $40 \text{ }^\circ\text{C/min}$ de $180-300 \text{ }^\circ\text{C}$ (5min), com a temperatura de injetor de $250 \text{ }^\circ\text{C}$ e detector de $280 \text{ }^\circ\text{C}$.

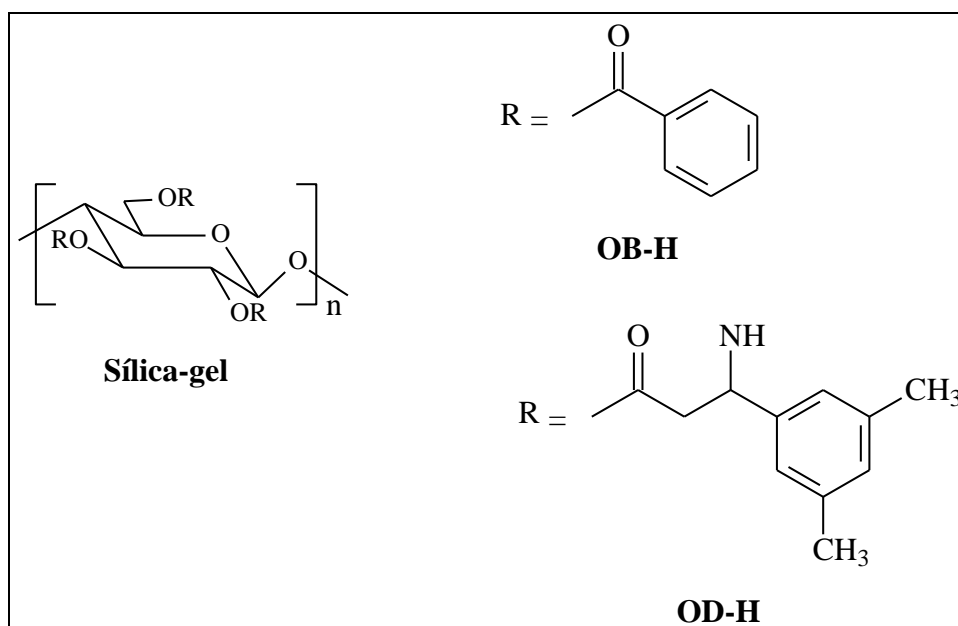
5.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As determinações dos excessos enantioméricos (ee) dos produtos de biorredução foram determinadas em Cromatógrafos Líquido de Alta Eficiência da Shimadzu LC-LC-20AT (detector UV-Vis Shimadzu SPD-M20A) e 10Advp (detector de UV-Vis Shimadzu SPD-10A). As colunas quirais baseadas em derivados de celulose foram avaliadas frente a diversas condições cromatográficas de análise no modo fase normal, com fases móveis variadas, constituídas de misturas binárias de hexano e isopropanol, em diferentes proporções, respeitando as limitações de cada coluna estabelecidas por seus fabricantes.

Com o objetivo de definir a fase estacionária quiral mais apropriada para separação dos enantiômeros, com tempo de análise considerando relativamente curto. Assim, foram avaliadas as seguintes colunas quirais (Figura 132, p. 101):

- Coluna Chiralcel OD-H (150 mm x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA) constituída do derivado de carbamato de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica-gel de 5 μm ;
- Coluna Chiralcel OB-H (150 mm x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA) constituída do derivado de éster de celulose tribenzoato recobrindo partículas de sílica-gel de 5 μm .

Figura 132 – Empacotamento das colunas quirais (OB-H e OD-H).



As condições de separação dos alcoóis aromáticos são apresentadas na Tabela 15 (p. 102).

Tabela 15 – Condições de separação dos alcoóis aromáticos em CLAE.

Entrada	Composto	Hexano: Isopropanol (%)	Coluna quiral	Fluxo (mL/min)	Tempo de Ret. (min)-Configuração
1	1-feniletanol	95:5	OD-H	0.5	9.3 – <i>R</i> , 11.4 – <i>S</i>
2	1-(2-bromofenil)- etanol	95:5	OD-H	0.5	10.75 – <i>S</i> , 11.68 – <i>R</i>
3	1-(3-bromofenil)- etanol	95:5	OB-H	0.5	10.74 – <i>S</i> , 14.48 – <i>R</i>
4	1-(4-bromofenil)- etanol	95:5	OD-H	0.5	12.74 – <i>S</i> , 14.74 – <i>R</i>
5	1-(4-clorofenil)- etanol	95:5	OB-H	0.5	9.28 – <i>S</i> , 10.31 – <i>R</i>
6	1-(4-flúorfenil)- etanol	95:5	OB-H	0.5	8.86 – <i>S</i> , 9.73 – <i>R</i>
7	1-(2-nitrofenil)- etanol	92:8	OB-H	0.7	12.17 – <i>R</i> , 12.85 – <i>S</i>
8	1-(3-nitrofenil)- etanol	92:8	OB-H	0.7	12.07 – <i>R</i> , 13.50 – <i>S</i>
9	1-(4-nitrofenil)- etanol	92:8	OB-H	0.8	10.79 – <i>S</i> , 11.48 – <i>R</i>
10	1-(3-metoxifenil)- etanol	92:8	OB-H	0.7	10.37 – <i>R</i> , 14.13 – <i>S</i>
11	1-(4-metoxifenil)- etanol	95:5	OB-H	0.5	24.04 – <i>S</i> , 31.21 – <i>R</i>
12	1-(2,5-dimetilfenil)- etanol	92:8	OB-H	0.8	6.29 – <i>S</i> , 7.97 – <i>R</i>
13	α -tetralona	99:1	OD-H	0.8	7.13 – <i>S</i> , 7.56 – <i>R</i>

5.2.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Outra técnica utilizada para determinação da bioconversão dos produtos reacionais foi a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H). Os espectros de RMN ^1H foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) desta universidade, da marca BRUKER, modelo Advance DPX – 500, que operam na frequência de 500 MHz para hidrogênio. Para dissolução das amostras utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3).

5.2.6. Espectroscopia na Região do UV/VIS

As medidas de absorvância na região do ultravioleta-vísivel foram obtidas utilizando-se um espectrofotômetro modelo Cary 50 Conc da Varian. As leituras foram realizadas no comprimento de onda determinado para cada análise, todas em triplicata (no mínimo).

5.2.7. Rotação ótica

As medidas de rotação ótica dos compostos foram determinadas em um polarímetro digital da PERKIN ELMER, modelo 341. As amostras foram diluídas em 1 mL (diclorometano, clorofórmio, metanol). As medidas foram feitas em um comprimento de onda 589 nm a temperatura de 20 °C.

5.2.8. Solução tampão de Sorensen ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$)

As soluções tampões foram preparadas pela mistura de soluções Na_2HPO_4 11,876 g/L e KH_2PO_4 9,078 g/L. O pH desejado foi obtido pela mistura apropriada das referidas soluções de acordo com tabela encontrada no artigo de Morita e Assumpção (1995).

5.3. Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas nos extratos aquosos das espécies vegetais foi realizada como um estudo preliminar da sua utilização como biocatalisadores. Os vegetais foram primeiramente lavados com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 5 % por 10 minutos e, posteriormente, lavados com água destilada. Para obtenção dos extratos aquosos dos vegetais (Figura 23, p. 40) 10 g do material (inteiro/triturado) e 20 mL água destilada foram adicionados em erlenmeyers de 50mL, mantidos em repouso por 24 h. Os vegetais testados foram sementes de lentilha (*Lens culinaris*), sabugos e grãos de milho verde (*Zea mays*), cascas e sementes de romã frescas (*Punica granatum*). Os extratos foram filtrados e submetidos às metodologias de determinação de proteínas solúveis descrita por Lowry (modificada por HARTREE, 1972) e Bradford (BRADFORD, 1976).

5.3.1. Método de Lowry

Para a realização de determinação de proteínas dos vegetais analisados pelo método de Lowry foi necessário o preparo das seguintes soluções:

- **Solução A:** 50 g de Na_2CO_3 que foi dissolvido em 250 mL de solução de NaOH 1M, seguida de adição de 1,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). O volume foi aferido para 500mL de água destilada.
- **Solução B:** 1,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 0,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em 45 mL de água, seguida de adição de 5 mL de NaOH 1M.
- **Solução C:** 1,0 mL do reagente de Folin-Cicateau 2M diluído em 15 mL de água destilada.

Procedimento geral: 0,9 mL da solução A foi adicionado a um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de amostra de extrato vegetal diluído (1,0 mL de amostra em 50,0 mL de água destilada). A mistura reacional foi aquecida em banho-maria à 50 °C durante 10 minutos. Após este período, o material foi resfriado a temperatura ambiente e adicionados 0,1 mL de solução B, que foi deixada por um período de 10

minutos. Em cada tubo de ensaio acrescentou-se 3,0 mL de solução C seguida de aquecimento durante 10 minutos a 50 °C em banho-maria. Após resfriamento o material foi analisado em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 650 nm. Uma curva de calibração com Soro Albumina Bovina (BSA) como padrão foi utilizada nas medidas. Os experimentos foram realizados em triplicada, tendo como controle 1,0 mL de água destilada.

5.3.2. Método de Bradford

As análises foram feitas seguindo metodologia de Bradford, 1976. Para este ensaio foram utilizados os seguintes reagentes:

➤ **Solução Bradford:** 50 mg de Comassie G250 foram dissolvidos em 25 mL de álcool etílico. Essa solução foi agitada por 1 hora em um erlenmeyer envolto com papel alumínio. Em seguida, foram adicionados 50 mL de ácido fosfórico 85 %. O volume foi aferido para 500 mL com água destilada. A solução resultante foi filtrada (três vezes) com papel de filtro e acondicionada em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Procedimento geral: em um tubo de ensaio foi colocado 1,0 mL da amostra diluída (1,0 mL de amostra em 50,0 mL de água destilada) e 2,5 mL da Solução Bradford. Após 5 minutos, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. O processo foi realizado em triplicada e o branco continha 1,0 mL de água destilada e 2,5 mL da Solução Bradford. Os valores de absorbância foram aplicados numa curva de calibração utilizando Albumina Bovina como padrão.

5.4. Processo Biocatalítico

5.4.1. Redução das cetonas pró-quirais por via química

Os alcoóis racêmicos **1a-17a** foram obtidos a partir de cetonas pró-quirais usando como agente redutor borohidreto de sódio (NaBH₄) em metanol (CH₃OH) (ASSUNÇÃO *et al.*, 2008).

A mistura reacional foi mantida sob agitação mecânica e banho de gelo por 2 horas, sendo esta analisada por CCD após este tempo, para confirmação do final da reação. Em seguida, o metanol foi evaporado sob pressão reduzida, o material foi misturado à água destilada, e o respectivo álcool extraído com acetato de etila (AcOEt). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida.

Estes alcoóis foram purificados em coluna cromatográfica com gel de sílica, utilizando como eluente uma mistura binária hexano/AcOEt (8:2). A amostra foi analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

5.4.2. Usos dos vegetais como potencial biocatalítico

Inicialmente, os materiais [sementes de cabacinha (*Luffa operculata*), sementes de lentilha (*Lens culinaris*), sabugos e grãos de milho frescos (*Zea mays*), cascas e sementes de romã frescas (*Punica granatum*)] passaram por assepsia utilizando solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 5% por 10 minutos e, posteriormente, lavagem com água destilada. Foram pesados 20,0 g de cada vegetal em erlenmeyers de 250 mL, 100 mg do substrato e adicionado 80 mL de meio reacional (água destilada ou tampão).

Os frascos foram lacrados e submetidos à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 150 rpm durante 72 horas a temperatura ambiente (30 °C). Após esse período as amostras foram filtradas para a retirada do material vegetal e a fase aquosa foi submetida à extração com acetato de etila (3x60 mL). A fase orgânica concentrada a pressão reduzida e purificada em coluna cromatográfica com sílica gel utilizando hexano/acetato de etila (90/10, v/v) como eluente. O processo foi realizado em duplicada.

Os produtos reacionais foram analisados inicialmente por cromatografia delgada de sílica gel (CCD), utilizando como eluente mistura binária de hexano/AcOEt (8:2) e visualizadas utilizando vanilina (C₈H₈O₃) como revelador.

5.4.3. Otimização da biorredução da acetofenona com LC

Acetofenona (**1**) foi selecionado como substrato modelo em busca de uma condição ótima para biorredução, sendo testados os parâmetros concentração de biocatalisador (*Lens culinaris*) (5-40g), cinética da reação (12-96h), velocidade de rotação (150, 175 e 200) rpm e meio reacional [água destilada e soluções tampão pH's de 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0, compostas por fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)], utilizando mesma metodologia descrita no subitem 5.4.2 (p. 106). Apenas uma das condições descritas neste subitem foi variada.

5.4.4. Cetonas aromáticas pró-quirais

Após seleção do biocatalisador (lentilha) e a melhor condição para as reações de biorredução, subitem 5.4.2 (p. 106) e 5.4.3 (p. 107), respectivamente, foram selecionados 16 cetonas aromáticas pró-quirais para novos estudos. Os substratos testados foram: 2-bromoacetofenona (**2**), 3-bromoacetofenona (**3**), 4-bromoacetofenona (**4**), 4-cloroacetofenona (**5**), 4-fluoroacetofenona (**6**), 2-hidróxiacetofenona (**7**), 3-metóxiacetofenona (**8**), 4-metóxiacetofenona (**9**), 2,5-dimetilacetofenona (**10**), 2-nitroacetofenona (**11**), 3-nitroacetofenona (**12**), 4-nitroacetofenona (**13**), 2-aminoacetofenona (**14**), 3-aminoacetofenona (**15**), 4-aminoacetofenona (**16**). Dois meios reacionais foram utilizados neste estudo, água destilada (pH 5,6) e solução tampão fosfato pH 7,0.

5.4.5. Determinação dos excessos enantioméricos (ee)

Para determinar os excessos enantioméricos dos alcoóis quirais foram utilizados Cromatógrafos Líquido de Alta Eficiência da Shimadzu, modelos LC-LC-20AT e 10ADvp, equipados com dois tipos de colunas quirais: OD-H (com detector de UV-Vis Shimadzu SPD-10A) e OB-H (com detector UV-Vis e Shimadzu SPD-M20A), ambas de dimensões 150 x 4,6 mm. O excesso enantiomérico (ee) foi

calculado utilizando a razão da área dos picos, fornecendo a pureza enantiomérica da amostra como mostra a equação abaixo (FABER, 2004).

$$ee (\%) = \frac{E - D}{E + D} \times 100$$

D= área do enantiômero minoritário

E= área do enantiômero majoritário

5.4.6. Determinação das configurações absolutas (S/R)

As configurações absolutas dos alcoóis obtidos a partir das cetonas aromáticas pró-quirais (**1a-17a**) foram determinados por polarímetro, como descrito no subitem 5.2.7 (p. 103). Os valores obtidos com as amostras foram comparados com outros obtidos na literatura, para os mesmo alcoóis. Valores de rotação ótica das amostras com sinal igual aos da literatura indicaram a presença do mesmo enantiômero. Na Tabela 16 (p. 109) mostra os valores de rotação específica e configuração absoluta dos alcoóis em comparação aos da literatura.

Tabela 16 – Configurações absolutas dos produtos de biorredução comparados com os da literatura

Entrada	Composto	$[\alpha]_{589}^{20}$; $[c]^a$ - R/S	$[\alpha]_{589}^{20}$; $[c]^b$ -R/S	Literatura
1	1-feniletanol	-18; [0,080]-S	-22,9; [1,0]-S	BARROS-FILHO <i>et. al.</i> , 2009.
2	1-(2-bromofenil)-etanol	-11; [0,069]-S	-50,45; [1,33]-S	CHATTOPADH; SALVI, 2008.
3	1-(3-bromofenil)-etanol	-15; [0,062]-S	-25,7; [1,33]-S	CHATTOPADH; SALVI, 2008.
4	1-(4-bromofenil)-etanol	-13; [0,064]-S	-37,3; [1,1]-S	HORIUCHI <i>et. al.</i> , 2006.
5	1-(4-clorofenil)-etanol	-11; [0,072]-S	-45; [0,9]-S	HORIUCHI <i>et. al.</i> , 2006.
6	1-(4-fluorofenil)-etanol	-26; [0,041]-S	-40; [0,9]-S	HORIUCHI <i>et. al.</i> , 2006.
7	1-(3-metoxifenil)-etanol	+14; [0,066]-R	-29,8; [0,85]-S	BARROS-FILHO <i>et. al.</i> , 2009.
8	1-(4-metoxifenil)-etanol	-21; [0,046]-S	-29,1; [1,5]-S	BARROS-FILHO <i>et. al.</i> , 2009.
9	1-(2,5-dimetilfenil)-etanol	-23; [0,048]-S	+64; [0,5]-R	WILLS; MARTINS, 2009.
10	1-(2-nitrofenil)-etanol	-17; [0,040]-R	+18,5; [0,23]-S	BARROS-FILHO <i>et. al.</i> , 2009.
11	1-(3-nitrofenil)-etanol	+11; [0,072]-R	-4,9; [1,22]-S	CHATTOPADH; SALVI, 2008.
12	1-(4-nitrofenil)-etanol	-16; [0,054]-S	-22,4; [1,42]-S	CHATTOPADH; SALVI, 2008.
13	α -tetralona	+20; [0,05]-S	-15; [0,37]-R	WILLS; MARTINS, 2009.

^a produto da biorredução^b dados comparados da literatura

[c] concentração

5.4.7. Biorredução com outros tipos de compostos carbonílicos

Tendo em vista a presença de enzimas redutase, em face de resultados positivos com outros substratos, foi utilizada metodologia do subitem 5.4.2 (p. 106), na avaliação da capacidade de redução de LC frente a outros compostos carbonílicos, como: cetonas aromáticas e alifáticas [α -tetralona (**17**), benzofenona (**18**), ciclo-hexanona (**19**), ciclopentanona (**20**)], aldeídos [benzaldeído (**21**), *p*-metoxibenzaldeído (**22**), *m*-metoxibenzaldeído (**23**), furfural (**24**) e cinamaldeído (**25**)] e nitrocompostos aromáticos [nitrobenzeno (**26**), *p*-cloronitrobenzeno (**27**), ácido *o*-nitrobenzóico (**28**), ácido *m*-nitrobenzóico (**29**), ácido *p*-nitrobenzóico (**30**), *m*-nitrotolueno (**31**), *p*-nitrotolueno (**32**), *o*-nitrofenol (**33**) e *p*-nitrofenol (**34**)].

5.4.8. Reação de acetilação do composto *p*-nitrofenol (**34**)

O composto *p*-nitrofenol (**34**) foi submetido a reação de acetilação, seguindo o seguinte procedimento: 7,2 mmol de *p*-nitrofenol (**34**) foi dissolvido em 15mL de diclorometano, seguido de adição de 20,4 mmol de anidrido acético e 12,4 mmol de piridina. Traços do catalisador 4-dimetilaminopiridina (DMAP) foram adicionados, seguido de agitação magnética por 2 horas. Posteriormente, foi tratado com sulfato de cobre 0,4 M, para retirada de traços de piridina, e extraído com diclorometano (3x60 mL).

5.4.9. Reação de hidrólise de nitrila, amida e ésteres

A capacidade hidrolítica do complexo enzimático de LC foi avaliada, utilizando mesma metodologia das reações de biorredução (subitem 5.4.2, p. 106), frente a derivados de ácido carboxílico (amida, nitrila e ésteres). As reações de hidrólise foram testadas para os compostos aromáticos: benzonitrila (**35**), benzamida (**36**), benzoato de etila (**37**) e benzoato de metila (**38**) e acetato de *p*-nitrofenila (**39**)

5.4.10. Culturas biológicas para determinar micro-organismo endofíticos

O meio de cultura foi preparado adicionando 39 g de BDA sintético em 1 L de água destilada, autoclavado a 120 °C, 1 kgf/cm² por 15 minutos, seguido de distribuição em placas de Petri (20 mL para cada placa).

Pesou-se 25 g das sementes de lentilhas, esterilizou-as em uma solução de hipoclorito de sódio (5%) por 15 minutos. Triturou-se as sementes com 80 mL de solução tampão de fosfato (0,1 M) de pH 7,0.

Em seguida, retirou-se 1 mL do extrato aquoso (solução tampão e lentilhas trituradas) e adicionou-se em um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina de cloreto de sódio (0,9%). Desta solução foi retirado 1 mL e colocado em outro tubo de ensaio contendo 9 mL da mesma solução salina. Por fim, foi retirado 1 mL do segundo tubo de ensaio e adicionado em um terceiro tubo contendo uma solução de NaCl (0,9%), designadas como: 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ mL.

Essas três diluições diferentes foram estriadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio Ágar/dextrose de batata (BDA) e cloranfenicol 100 µg/mL. As placas contendo os micro-organismos foram mantidas a 23 °C. Todo material utilizado foi esterilizado em autoclave (120 °C, 1 kgf/cm² por 15 minutos) e por UV-254nm em 20 minutos (CAMPOS, 2009).

Após a incubação notou-se o crescimento de 3 tipos de microorganismos em 8 dias e mais um micro-organismo em 12 dias, que foram repicadas individualmente em outras placas de Petri. Os micro-organismos foram designados como: branco com disco (BCD), branco sem disco (BSD), amarelo com disco (ACD) e amarelo forte (AF).

5.4.11. Teste de lipase dos micro-organismos endofíticos de LC

Utilizou-se 3 mL de azeite de oliva, 25 μ L de Tween 80 e 5 mL de água destilada, na qual a mistura foi homogeneizada por agitação e autoclavado separadamente e, em seguida, adicionou-se ao meio uma solução de Rodamina B (2 mg/2 mL). Tendo como controle positivo a *Candida rugosa* Lipase. Após 24h de incubação a 23 °C os micro-organismos que apresentaram fluorescência laranja sob irradiação UV-365 nm demonstraram atividade lipolítica (CADIRCI; YASA, 2010).

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, verificou-se que as espécies vegetais testadas como fonte enzimática mostram-se promissoras em estudos de biotransformação, visto que, todas foram capazes de reduzir acetofenona (**1**), exceto as sementes de cabacinha. *Lens culinaris* foi o vegetal que apresentou melhor resultado na relação bioconversão (17%) e excesso enantiomérico (75%-S).

A investigação das condições ideais de reação, usando acetofenona como substrato modelo, mostrou que o meio reacional influenciou significativamente na atividade enzimática. Em pH 5,6 (água destilada) observou-se os melhores ee (16-99%), ao passo que, em pH 7,0 obteve-se os maiores rendimentos de conversão (3-99%). Na maioria dos casos, os produtos obtidos foram alcoóis tipo Prelog. Em geral, a presença de substituintes retiradores de elétrons provocou o aumento e doadores a redução da atividade enzimática.

O complexo enzimático mostrou-se bastante ativo frente a aldeídos aromáticos (conversões de 95-99%), e moderadamente em relação a outras cetonas aromáticas e alifáticas (conversões de 8-82%). Nitrobenzeno apresentou-se bastante reativo, porém, substituições no anel aromático em seus derivados provocaram reduções significativas nas conversões (0-68%), exceto *p*-carboxilnitrobenzeno reduzido em sua quase totalidade.

A hidrólise completa de acetato *p*-nitrofenila a *p*-nitrofenol requer estudos adicionais para avaliar a reprodutibilidade da reação, incluindo, a possibilidade de hidrólises enantiosseletivas.

Foi observada uma possível influência mútua sobre o curso estérico da reação, na redução dos grupos carbonila e nitro no substrato 2-nitroacetofenona com resultado da produção dos derivados álcool e amina em baixíssimas conversões, 5% e 2%, respectivamente.

O comportamento da ação enzimática (*Lens culinaris*) com relação à acentuada variação nos rendimentos, assim como, na inversão de configuração do álcool na reação de redução da acetofenona em função da variação do pH do meio reacional, poderia ser conseqüência de diferenças na solubilidade dos compostos no meio aquoso, ou ainda, devido a uma rápida interconversão dos enantiômeros em

função do pH. Em adição, materiais intactos de plantas foram usados e que podem conter traços de outros diferentes tipos de proteínas, sugerindo que uma dessas proteínas foi a enzima responsável pela variação observada na enantiosseletividade nos diferentes pH.

A presença de micro-organismos nas sementes de LC, principalmente leveduras ou fungos, não descaracterizou seu potencial biocatalítico uma vez que os mesmos se desenvolveram em um período muito superior ao tempo de reação das biorreduções.

No geral, pode-se concluir que os estudos de *Lens culinaris* como biocatalisador mostraram-se bastante promissores, com relevante interesse sintético. Estudos adicionais mais aprofundados devem ser realizados com os micro-organismos detectados.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. H.; POLAK, R.; PORTO, A. L. M.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; COMASSETO, J. V. Application of bioreduction by microorganism in the enantioselective synthesis of alpha-substituted-1-phenylethanol. **Letters in Organic Chemistry**, v. 3, p. 613-618, 2006.

ANDRADE, L. H.; UTSUNOMIYA, R. S.; OMORI, A. T.; PORTO, A. L. M.; COMASSTO, J. V. Edible catalysts for clean chemical reactions: bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, p. 84-90, 2006a.

ASSUNÇÃO, J. C. C.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q. Bioacetilação de álcoois catalisada por *Saccharum officinarum*. **Química Nova**, v. 32, p. 1549-1552, 2009.

ASSUNÇÃO, J. C. C.; MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G.; CORDELL, G. A.; MONTE, F. J. Q. Sugar cane juice for the bioreduction of carbonyl compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 194-198, 2008.

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

BARBIERI, C.; BOSSI, D'ARRIGO, P.; FANTONI, G. P.; SERVI, S. Bioreduction of aromatic ketones: preparation of chiral benzyl alcohols in both enantiomeric forms. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 415-421, 2001.

BARROS-FILHO, B. A.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. *Lentinus strigellus*: a new versatile stereoselective biocatalyst for the bioreduction of prochiral ketones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 1057-1061, 2009.

BARTOLOME, B.; ESTRELLA, I.; HERNANDEZ, T. Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. **Zeitschrift Für Lebensmittelforschung und -Forschung A**, v. 205, p. 290-294, 1997.

BERTINI, L. M. **Processos biocatalíticos utilizando células íntegras de *Glycine Max* (L.) Merrill (Soja)**. 2009. 116f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

BIZERRA, A. M. C., GONZALO, G., LAVANDERA, I., GOTOR-FERNANDES, V., MATTOS, M. C., OLIVEIRA, M. C. F., LEMOS, T. L. G., GOTOR, V. Reduction processes biocatalyzed by *Vigna unguiculata*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, p. 566-570, 2010.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. **Biocatalysis Fundamental and Application**. 1 Ed. Weinheim: Editora Wiley-VHC, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREUER, M.; DITRICH, K.; HABICHER, T.; HAUER, B.; KESSELER, M.; STÜRMER, R.; ZELINSKI, T. Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 788–824, 2004.

BRUICE, P. Y. **Organic Chemistry**. 2 Ed., Prentice Hall, New Jersey, 1998.

BRUNI, R.; FANTIN, G.; MEDICI, A.; PEDRINI, P.; SACCHETTI, G. Plants in organic synthesis: an alternative to *baker's yeast*. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 3377-3379, 2002.

CAI, Y.; WU, Q.; XIAO, Y. M.; LV, DE-S.; LIN, X. F. Hydrolase-catalyzed Michael addition of imidazoles to acrylic monomers in organic medium **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 330-337, 2006.

CADIRCI, B. H.; YASA, I. An organic solvents tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 155–161, 2010.

CAMPOS, F. F. **Isolamento e identificação de substâncias bioativas produzidos por fungos endofíticos associados a *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae)**. 2009. 172f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 110, 2009.

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

CHATTOPADHYAY, S.; SALVI, N. A. Asymmetric reduction of halo-substituted arylalkanones with *Rhizopus arrhizus*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 1992-1997, 2008.

CHAUDHARI, A.; KULKARNI, M. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. **Journal of Environmental Management**, v. 85, p. 496–512, 2007.

CHAUHAN, A.; SAMANTA, S. K.; JAIN, R. K. Degradation of nitrophenolic compounds by microorganisms. In: PATHADE, G. R., GOEL, P. K. (Eds.), *Environmental Pollution and Management of Wastewaters by Microbial Techniques*. ABD Publishers, Jaipur, p. 219–232, 2001.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, p. 369-374, 1985.

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

DAI, R.; CHEN, J.; LIN, J.; XIAO, S.; CHEN, S.; DENG, Y. Reduction of nitro phenols using nitroreductase from *E. coli* in the presence of NADH. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 141–143, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.623-630, 2004.

DALLA-VECCHIA, R.; SEBRÃO, D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. **Process Biochememistry**, v. 40, n. 8, p. 2677-2682, 2005.

DAUBMANN, T.; ROSEN, T. C.; DUNKELMANN, P. Oxidoreductases and hydroxynitrilase lyases: Complementary enzymatic technologies for chiral alcohols. **Engineering in Life Science**, v. 6, n. 2, p. 125-129, 2006.

DE NORONHA, R. G.; ROMÃO, C. C.; FERNANDES, A. C. Highly chemo- and regioselective reduction of aromatic nitro compounds using the system silane/oxorhenium complexes. **Journal Organic Chemistry**, v. 74, p. 6960–6964, 2009.

DEMIRJIAN, D. S., SHAH P. C., MORIS-VARAS, F. DEMIRJIAN, D. S.; SHAH, P. C.; MORÍS-VARAS, F. Screening for novel enzymes In: FRESSNER, W. D. (Ed.). **Biocatalysis from Discovery to Application**. Berlin: Springer, p. 1-30, 2000.

DEUSSEN, H. J.; ZUNDEL, M.; VALDOIS, M.; LEHMANN, S. V.; WEIL, V.; HJORT C. M.; OSTERGAARD, P. R.; MARCUSSEN, E.; EBDRUP, S. Process Development on the Enantioselective Enzymatic Hydrolysis of S-Ethyl-2-Ethoxy-3-(4-hydroxyphenyl)propanoate. **Organic Process Research Development**, v. 7, p. 82-88, 2003.

DUMANSKI, P. G.; FLOREY, P.; KNETTIG, M.; SMALLRIDGE, A. J.; TREWHELLA, M. A. The baker's yeast-mediated reduction of conjugated methylene groups in an organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 905-908, 2001.

ENGLYST, K. N.; VINOY, S.; ENGLYST, H. N., LANG, V. Glycaemic index of cereal products explained by their content of rapidly and slowly available glucose. **The British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 329-339, 2003.

FABER K. **Biotranformations in Organic Chemistry**. 4^a ed., Berlin: Editora Springer-Verlag; 2000.

FABER K., PATEL R. Chemical *biotechnology* a happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry. **Current Opinion Biotechnology**, v.11, p.517-519, 2000.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3.ed. Berlin: Springer-Verlag, p. 402, 1997.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 5.ed. Berlin: Springer-Verlag, p. 5, 2004.

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

FRIAS, J.; DIAZ-POLLAN, C.; HEDLEY, C. L.; VIDAL-VALVERDE, C. Evolution of trypsin inhibitor activity during germination of lentils. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2231–2234, 1995.

GANDHI, N. N. Aplications of lípases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, p. 621-634, 1997.

GARRITZ, A. E.; CHAMIZO, J. A. **Química**, Addison-Eesley Ibero-American. p. 495, 1994.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

GIRI, A.; DHINGA, V.; GIRI, C. C.; SINGH, A.; WARD, O. P.; NARASU, M. L. Biotransformation using plants, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 175-199, 2001.

GRUNWALD, P. Experimental treatment of the laws of heterogeneous catalysis with immobilized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). **Biochemical Education**, v. 28, p. 96-99, 2000.

GULEWICZ, P.; CIESIOLKA, D.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; FREJNAGEL, S.; TROJANOWSKA, K.; GULEWICZ, K. Simple method of isolation and purification of R-galactosides from legumes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3120–3123, 2000.

HARTREE, F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAWARI, J.; BEAUDET, S.; HASLAZ, A.; THIOUOT, S.; AMPLEMAN, G. Microbial degradation of explosives: biotransformation vs mineralization. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 54, p. 605–618, 2000.

HOLLAND, H. L. Microbial transformations. **Current Opinion Chemical Biology**, v. 2, p. 77–84, 1998.

HORIUCHI, A.; UTSUKIHARA, T.; MISUMI, O.; KATO, N.; KUROIWA, T. Reduction of various ketones by red algae. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, p. 1179-1185, 2006.

JARDINI, F. A. **Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum*, L.) – Participação das frações de ácidos fenólicos no processo de inibição da oxidação.** 2005. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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

JOHNSON, J. B.; JIMMERSON, J. Lentils. **Agricultural Marketing Policy Center Montana State University**, Briefing, v. 60, p. 1-4, 2003.

KAMAL, A.; SANDBHOR, M.; SHAIK, A. A. Chemoenzymatic synthesis of (S) and (R)-propranolol and sotalol employing one-pot lipase resolution protocol. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 4581-4583, 2004.

KLIBANOV, A. M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Science**, v. 219, p.722-727, 1983.

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

KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. (eds). **Enzymatic Reactions in Organic Media**. 1. ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1996.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 81-87, 1987.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3^aed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002.

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

LI, B.; XU, Z. A Nonmetal Catalyst for Molecular Hydrogen Activation with Comparable Catalytic Hydrogenation Capability to Noble Metal Catalyst **Journal of the American oil Chemists's Society**, v. 131, p. 16380–16382, 2009.

MACHADO, L. L., LEMOS, T. L. G., MATOS, M. C., OLIVEIRA, M. C. F., GONZALO, G., GOTOR-FERNANDES, V. Immobilized Manihot esculenta preparation as novel biocatalyst in the enantioselective acetylation of racemic alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 1418-1423, 2008a.

MACHADO, L. L., MONTE, F. J. Q., OLIVEIRA, [M. C. F.](#), MATOS, [M. C.](#), LEMOS, T. L. [G.](#), GOTOR-FERNANDES, V., GONZALO, G., GOTOR, V. Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 103-106, 2008b.

MACHADO, L. L., SOUZA, [J. S. N.](#), MATOS, [M. C.](#), SAKATA, S., LEMOS, T. L. G., CORDELL, G. A. Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1637-1643, 2006.

MACHADO, L. L.; GONZALO, G.; LEMOS, T. L. [G.](#); MATOS, [M. C.](#); OLIVEIRA, M. C. F.; GOTOR-FERNANDES, V.; GONZALO, G.; GOTOR, V. Enantioselective acetylation of racemic alcohols by *Manihot esculenta* and *Passiflora edulis* preparations. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 157-162, 2009.

MARKS, D. L.; BUCHSBAUM, R.; SWAIN, T. Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins. **Analytical Biochemistry**, v. 147, p. 136-143, 1985.

MATTOO, R. L.; ISHAQ, M.; [SALEEMUDDIN](#), M. Protein assay by coomassie brilliant blue g-250-binding method is unsuitable for plant tissues rich in phenols and phenolases. **Analytical Biochemistry**, v. 163, p. 376-384, 1987.

MEDSON, C.; SMALLRIDGE, A. J.; TREWHELLA, M. A. The stereoselective preparation of β -hydroxy esters using a yeast reduction in an organic solvent. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 7, p. 1049-1054, 1997.

MELCHIORRE, P.; MARIGO, M.; CARLONE, A.; BARTOLI, G. Asymmetric aminocatalysis—gold rush in organic chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, p. 6138–6171, 2008.

MIRONOWICZ, M.; JAROSZ, B.; SIEWINSKI, A. Ability of fruit and vegetable enzyme system to hydrolyse ester bonds. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 64, p. 281-285, 1995.

MIWA, A. C. P. **Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados na determinação de proteínas em lagoas de estabilização**. 2003. 133f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

MORCOS, S. R.; GABRIAL, G. N.; EL-HAFEZ, M. A. Nutritive studies on some raw and prepared leguminous seeds commonly used in the Arab Republic of Syria. **Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft**, v. 15, p. 378-386, 1976.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes & solventes**. 2 ed. São Paulo: Edgar Blücher. 629p, 1995.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA, T.; HARADA, T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with Biocatalysis. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 2659-2681, 2003.

NASCIMENTO, M. G.; ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P.; MORAN, P. J. S. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 567-571, 2002.

NELSON, D. L e COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ªed. Porto Alegre, RS, Editora Artmed, 2011.

NISHINO, S. F.; SPAIN, J. C.; HE, Z. Strategies for aerobic degradation of nitroaromatic compounds by bacteria: process discovery to field application. In: Spain, J. C., Hughes, J. B., Knackmuss, H. J. (Eds.), *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. **Lewis Publishing**, New York, p. 7–61, 2000.

NORTH, M. Baker's yeast reductin of β -keto-esters in petrol. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 1699-1702, 1996.

OKUTUCU, B.; DINCER, A.; HABIB, O.; ZIHNIUGLU, F. Comparison of Five methods for determination of total plasma protein concentration. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 709-711, 2007.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Atividade enzimática de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 204-210, 2006.

PATEL, R.N., CHU, L., CHIDAMBARAM, R., ZHU, J., KANT, J. Enantioselective microbial reduction of 2-oxo-2-(10203040-tetrahydro-10104040-tetramethyl-60-naphthalenyl) acetic acid and its ethyl ester. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 3, p. 349–355, 2002.

PENG, F.; SHAO, Z. [Advances in asymmetric organocatalytic reactions catalyzed by chiral primary amines](#) **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 285, p. 1-13, 2008.

PEREIRA, R. S. Projeto e construção de um bioreator para a síntese química orgânica assimétrica por *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Biológico da Padaria). **Química Nova**, v. 20, p. 551-554, 1997.

QUEMENER, B.; BRILLOUET, J. M. Ciceritol, a pinitol digalactoside form seeds of chickpea, lentil and white lupin. **Phytochemistry**, v. 22, p. 1745–1751, 1983

RAHMAN, M. B. A.; YUNUS, N. M. M.; HUSSEIN, M. Z.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Application of advanced materials as support for immobilisation of lipase from *Candida rugosa*. **Biocatalysis Biotransformation**, v. 23, p. 233-239, 2005a.

RAHMAN, M. B.; TAJUDIN, S. M.; HUSSEIN, M. Z.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. **Applied Clay Science**, v. 29, p. 111-116, 2005b.

RAKIC, S.; PETROVIC, S.; KUKIC, J.; JADRANIN, M.; TESEVIC, V.; POVRENOVIC, D.; SILER-MARINKOVIC, S. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant. **Food Chemistry**, v. 104, p. 830-834, 2007.

ROZZELL, J. D. Commercial scale biocatalysis: myths and realities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 2253-2261, 1999.

RUIZ, R. G.; PRICE, K. R.; ARTHUR, A. E.; ROSE, M. E.; RHODES, M. J. C.; FENWICK, R. G. Effect of Soaking and Cooking on the Saponin Content and Composition of Chickpeas (*Cicer arietinum*) and Lentils (*Lens culinaris*). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1526-1530, 1996.

SAX, I. R.; LEWIS, R. J. Nitro-compounds of aromatic hydrocarbons. In: **Dangerous Properties of Industrial Material**. 7ed., v. 2, p. 2534–2536, 1999.

SHAFIEE, A., MOTAMEDI, H., KING, A. Purification, characterization and immobilization of an NADPH-dependent enzyme involved in the chiral specific reduction of the keto ester M, an intermediate in the synthesis of an anti-asthma drug, Montelukast, from *Microbacterium campoquemadoensis* (MB5614). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 709–717, 1998.

SHAW, N. M., ROBINS, K. T., KIENE, A. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 4, p. 425-435, 2003.

SHELDON, R. A. Catalysis and Pollution Prevention. **Chemistry & Industry**, v. 1, p. 12-15, 1997.

SHONS, P. F.; LEITE, P. F.; NOVELLO, D.; BERNARDI, D. M.; MORATO, P. N.; ROCHA, L. M.; REIS, S. M. P. M.; MIYASAKA, C. K. Eficiência protéica da lentilha (*lens culinaris*) no desenvolvimento de ratos wistar **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v. 20, p. 255-260, 2009.

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

SOLANO, D. M.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; HOYOS, P.; HERNAIZ, M. J.; ALCANTARA, A. R. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresource Technology**, v. x, p. x, 2012.

SOSULSKI, F. W.; DABROWSKI, K. J. Composition of free and hydrolysable phenolic acids in the flours and hulls of ten legume species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 131–133, 1984.

SPENCER, J.; RATHNAM, R. P.; PATEL, H.; ANJUM, N. Microwave mediated reduction of heterocycle and fluorine containing nitroaromatics with Mo(CO)₆ and DBU **Tetrahedron**, v. 64, p. 10195–10200, 2008.

STENUIT, B.; EYERS, L.; FANTROUSSI, S.; AGATHOS, S. N. Promising strategies for mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene. **Review of Environmental Science and Biotechnology**, v. 4, p. 39–60, 2005.

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

STRAATHOLF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHIMID, A. The production of fine chemical by biotransformation. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 548-556, 2002.
SUÁREZ-FRANCO, G.; HERNÁNDEZ-QUIROZ, T.; NAVARRO-OCAÑA, A.; OLIART-ROS, R. M.; VALERIO-ALFARO, G. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 441-445, 2010.

TAYLOR, W. G.; FIELDS, P. G.; SUTHERLAND, D. H. Fractionation of lentil seeds (*Lens culinaris* Medik.) for insecticidal and flavonol tetraglycoside components. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 5491–5498, 2007

THARANATHAN, R. N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes - a boon to human nutrition. **Trends Food Science Technology**, v. 14, n. 12, p. 507-518, 2003.

TSOPMO A. E MUIR A. D. Chemical Profiling of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Cultivars and Isolation of Compounds. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 8715–8721, 2010.

VEIT, T. Biocatalysis for the production of cosmetic ingredients. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, p. 508-511, 2004.

VIEIRA, M. R. **Estudo da biorredução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp.** 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.

VILELA, E. S. D., SGARBIERI, V. C., ALVIM, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* Sp.) **Revista de Nutrição: Campinas**, v. 13, p. 185-192, 2000.

[WAN, N. S;](#) [GU, J. D.;](#) [HAO, F. Q.;](#) [XIAO, X. Q.](#) Degradation of p-nitrophenol by a mangrove bacterial *Rhodococcus* sp. Ns. [Huan Jing Ke Xue](#), v. 28, p. 431-435, 2007.

WANG, N. et al. Influence of cooking and dehulling on nutritional composition of several varieties of lentils (*Lens culinaris*). **Lwt-Food Science and Technology**, v. 42, p. 842-848, 2009.

WANG, N.; DAUN, J. K. Effects of variety and crude protein content on nutrients and anti-nutrients in lentils (*Lens culinaris*). **Food Chemistry**, v. 95, p. 493-502, 2006.

WILLS, M.; MARTINS, J. E. D. Ir (III) complexos of diamine ligands for asymmetric ketone hydrogenation. **Tetrahedron**, v. 65, p. 5782-5786, 2009.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; REDDY, P. T.; RAO, A. B. Efficient Enantioselective Reduction of Ketones with *Daucus carota* Root. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 3900-3903, 2002.

YANG, Z. H.; ZENG, R.; YANG, G.; WANG, Y.; LI, L. Z.; LV, Z. S.; YAO, M.; LAI, B. Asymmetric reduction of prochiral ketones to chiral alcohols catalyzed by plants tissue. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 1047-1051, 2008.

YE, J.; SINGH, A.; WARD, O. P. Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen containing xenobiotics. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 117–135, 2004.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.

ZHANG, J.; SUN, Z.; LI EL, Y. Biodegradation of p-nitrophenol by *Rhodococcus* sp. CN6 with high cell surface hydrophobicity, **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 723–728, 2008.