



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

JOÃO CARLOS DA COSTA ASSUNÇÃO

REAÇÕES DE BIOCATÁLISE UTILIZANDO SISTEMAS DE CÉLULAS
ÍNTEGRAS E DE ENZIMAS IMOBILIZADAS DE *Saccharum officinarum*

Linn (CANA DE AÇÚCAR)

FORTALEZA

2008

JOÃO CARLOS DA COSTA ASSUNÇÃO

**REAÇÕES DE BIOCATÁLISE UTILIZANDO SISTEMAS DE PLANTAS
INTÁCTAS E DE ENZIMAS IMOBILIZADAS DE *Saccharum officinarum*
Linn (CANA DE AÇÚCAR)**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em **28/07/2008**, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Química Orgânica**.

Área de concentração: **Química Orgânica**

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte

FORTALEZA

2008

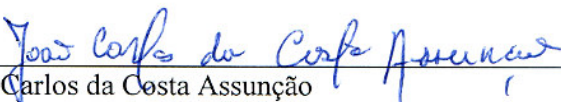
A873r Assunção, João Carlos da Costa
Reações de biocatálise utilizando sistemas de células íntegras e de enzimas imobilizadas de *Saccharum officinarum* Linn. (cana-de-açúcar) . 236f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte
Área de concentração: Química Orgânica
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2008.

1. Biorredução 2. Bioacetilação 3. Biocatálise 4. *Saccharum officinarum* I. Monte, Francisco José Queiroz (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Curso de Pós-graduação em Química Orgânica
III. Título


CDD 547

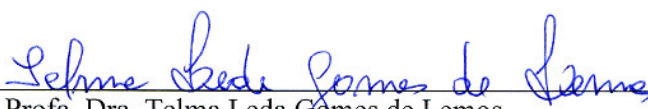
Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.



João Carlos da Costa Assunção


TESE APROVADA EM: 28/07/2008


EXAMINADORES:


Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte (orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC


Prof. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará - UFC


Prof. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil
Universidade Federal do Ceará - UFC


Prof. Dr. Jorge Mauricio David
Universidade Federal da Bahia - UFBA


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

À Deus, aos meus pais, irmãos e, especialmente, ao meu filho, Pedro Lucas, que sempre me apoiaram e estiveram comigo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por conceder-me a vida e força, diariamente, para vencer todos os obstáculos, que não foram poucos.

A minha família, principalmente meus pais (Fátima e Francisco) pelo amor, apoio e ensinamentos que alicerçaram meu caráter e, também, ao meu filho Pedro Lucas que desde seu nascimento me encoraja a seguir sempre em frente em buscar do melhor.

A minha namorada Lidyane que esteve sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins e por quem tenho um grande amor.

Ao meu orientador Professor Francisco Monte e a Professora Telma Leda pelos ensinamentos e amizade oferecidos desde os tempos de iniciação científica, e quem considero como meus segundos pais.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Química Orgânica pelos ensinamentos que foram imprescindíveis para o meu aperfeiçoamento e qualificação profissional.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação Orgânica: Alexandre Praxedes, Rudy, Cláudio, Lobinha, Ayla, Luciana, Bertini, João Sammy, Henrique, Artur, Rosa, Cristiane, Mozarina, Alana, Fátima, Glauber, Daniel, Gizele, Antônia, Max, Guga, Ceíça, Simone, Isabel, Andreza, Cleia, Daniele, Aluisio, Delcio, Milena, Elton, Mônica, Grazielle, Jackson, Jefferson, Renata Mendonça, Biel e a todos os outros que de forma direta e indireta ajudaram a torna os dias de trabalho muito mais agradáveis.

Aos funcionários do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica: Lana, Mundinha, Célia e Paulo não apenas pelos serviços prestados, mas também pela amizade.

Aos operadores de todos os aparelhos da central analítica da UFC pelos serviços prestados no registro dos espectros.

Aos órgãos financiadores CAPES, FUNCAP e, principalmente, CNPq pelo suporte financeiro e a Universidade Federal do Ceará pela por toda estrutura concedida.

RESUMO

O presente trabalho relata a utilização do caldo de cana e suas enzimas imobilizadas como biocatalisadores em reações de redução e acetilação. Numa primeira parte, uma série de reações de redução utilizando como catalisador o sistema enzimático contido no caldo de cana (CC) foi realizada, tendo como substratos: acetofenona, 3-metoxi-acetofenona, benzaldeído, anisaldeído, m-anisaldeído, vanilina, cinamaldeído, α -metilcinamaldeído, furfural, citronelal, 3-hexanona, ciclopentanona, ciclohexanona, pulegona, carvona, acetoacetato de etila, benzoato de etila, butirato de etila, benzonitrila, benzamida, isoniazida e nitrobenzeno. A metodologia aplicada consistiu na utilização de proporções definidas dos substratos e do sistema biocatalisador. Para vários dos compostos citados, os alcoóis foram obtidos com excelentes rendimentos, em alguns casos as reações procederam com quimiosseletividade e, em outros, com enantioseletividade. A segunda parte do trabalho consistiu na utilização do sistema enzimático do caldo de cana em reações de esterificação. Nestas reações foram utilizados como biocatalisador as enzimas imobilizadas do caldo de cana (EICC), aplicando metodologia adaptada da literatura. O álcool anísico, selecionado como substrato padrão para os testes iniciais, em mistura com anidrido acético e em presença de EICC originou o produto identificado como acetato de anisila. Em seguida, após vários experimentos, os parâmetros reacionais: quantidade de EICC, quantidade de substrato, tempo reacional, solvente, velocidade de agitação, temperatura e reutilização do sistema enzimático foram determinados. As condições que permitiram a obtenção do produto esterificado com melhor rendimento foram: 150 mg de EICC, 200 mg de substrato, 20 mL de hexano, 150 rotações por minuto (rpm), 60 horas de reação a 30°C e 24 h a 70°C. Estas condições foram utilizadas nas reações de acetilação de outros compostos, obtendo-se bons rendimentos de conversão. Assim, as reações com os alcoóis: anísico, benzílico, 3-metoxi-benzílico, cinâmico, furfurílico, 1-fenil-etan-1-ol e 3-metoxi-1-fenil-etan-1-ol e alcoóis alifáticos: amílico, octílico, decanóico, citronelol, alílico, ciclopentanol, ciclohexanol, 3-hidroxi-butirato de etila, α -terpineol e com um composto fenólico o carvacrol foram testadas, demonstrando a eficiência de EICC nestas reações. Os produtos, nas misturas reacionais, foram analisados através de CCD, CG-EM e RMN ^1H .

Palavras-chave: biorredução; bioacetilação; biocatálise; *Saccharum officinarum*

ABSTRACT

The present work reports the use of integral cells and immobilized enzymes of the sugar cane (*Saccharum officinarum*) juice as biocatalyst applied in reactions of reduction and acetylation reactions. In a first part, a set of reduction reactions was carried out using sugar cane juice (CC) as catalyst and, as substrates: acetophenone, 3-methoxyacetophenone, benzaldehyde, anisaldehyde, *m*-anisaldehyde, vanillin, cinnamaldehyde, α -methyl-cinnamaldehyde, furfuryl, citronellal, 3-hexanone, cyclopentanone, cyclohexanone, pulegone, carvone, β -keto ethyl butyrate, ethyl benzoate, ethyl butyrate, benzonitrile, benzamide, isoniazide, nitrobenzene. For several of the mentioned compounds, were obtained alcohols with excellent yields, in some cases the reactions proceeded with chemoselectivity and, in other, with enantioselectivity. The second part of this work it was used immobilized enzymes of cane juice in esterification reactions of alcohols. In this sense, the alcohols: anisyc, benzylic, 3-methoxy-benzylic, cinnamyc, furfurylic, 1-phenyl-ethan-1-ol, 3-methoxy-1-phenyl-ethan-1-ol, amylic, octylic, decanoic, citronellol, allylic, cyclopentanol, cyclohexanol, 3-hydroxy-ethyl-butyrate, α -terpineol and carvacrol were tested. In the esterifications reactions were using as biocatalisador the immobilized enzymes of the cane juice (EICC), using adapted methodology of the literature. The alcohol anisyc, selected as substrate for the tests initials, in mixture with acetic anhydride and in presence of EICC it afforded an identified product as anisyl acetate. After several experiments, reactional parameters: amount of EICC, amount of substrate, time reacional, solvent, agitation speed, temperature and reuse of the enzymatic system were determined. The conditions that allowed the obtaining of the esterified derivative with better yields were: 150 mg of EICC, 200 mg substrate, 20 mL hexane, 150 rpm, 60 hours of reaction to 30°C and 24 h to 70°C. So, acetylation reactions with other alcohols were processed, being obtained good yields. Consequently, the immobilized enzymes of *Saccharum officinarum* constitute a promising biocatalysts in acetylation reactions, although, other tests need to be made in the sense of optimizing the potential of the biocatalysts. The products, in the reactional mixtures were analyzed by TLC, GC-MS and ^1H NMR.

Keywords: bioreduction; bioacetylation; biocatalysis; *Saccharum officinarum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografia da cana de açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> Linn.).....	14
Figura 2: Fotografia mostrando detalhe do caule da cana de açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> Linn.)	14
Figura 3: Representações tridimensionais das estruturas secundária e terciária de uma proteína.....	18
Figura 4: Estrutura química do NADH e NADPH.....	20
Figura 5: Esquema ilustrativo do modelo chave-fechadura	21
Figura 6: Esquema ilustrativo do encaixe induzido.....	21
Figura 7: Representação esquemática da seletividade enzimática	22
Figura 9: Principais métodos de imobilização enzimática	26
Figura 10: Exemplos de álcoois quirais obtidos por biorredução utilizados na síntese de fármacos.....	29
Figura 11: Sistema de reciclagem do cofator NADH.....	30
Figura 12: Representação esquemática da regra de Prelog	31
Figura 13: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do caldo de cana (CC) bruto.....	78
Figura 14: Cromatograma CG-EM do caldo de cana (CC) bruto.....	78
Figura 15: Espectro de massa do pico 1, tr: 4,36 min	79
Figura 16: Espectro de massa do pico 2, tr: 4,73 min	79
Figura 17: Espectro de massa do pico 3, tr: 9,23 min	79
Figura 18: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da acetofenona (1) padrão	83
Figura 19: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do feniletan-1-ol (1a) padrão.....	84
Figura 20: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução da acetofenona (1) com CC.....	84
Figura 21: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da acetofenona (1) com CC.....	85
Figura 22: Espectro de massa da acetofenona (1), tr: 22,69 min.....	85
Figura 23: Espectro de massa do feniletan-1-ol (1a), tr: 22,01 min.....	85
Figura 24: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3-metoxi-acetofenona (2) padrão.....	86
Figura 25: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3-metoxi-feniletan-1-ol (2a) padrão	86

Figura 26: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução da 3-metoxi-acetofenona (2) com CC.....	87
Figura 27: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da 3-metoxi-acetofenona (2) com CC.....	87
Figura 28: Espectro de massa da 3-metoxi-acetofenona (2), tr: 9,97 min.....	88
Figura 29: Espectro de massa do 3-metoxi-feniletan-1-ol (2a), tr: 9,76 min	88
Figura 30: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do benzaldeído (3) padrão	88
Figura 31: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do álcool benzílico (3a) padrão	89
Figura 32: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do benzaldeído (3) com CC.....	89
Figura 33: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução do benzaldeído (3) com CC.....	90
Figura 34: Espectro de massa do benzaldeído (3), tr: 8,59 min	90
Figura 35: Espectro de massa do álcool benzílico (3a), tr: 11,14 min	90
Figura 36: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do anisaldeído (4) padrão	91
Figura 37: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do álcool anísico (4a) padrão.....	91
Figura 38: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do anisaldeído (4) com CC	92
Figura 39: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução do anisaldeído (4) com CC.....	92
Figura 40: Espectro de massa do anisaldeído (4)	93
Figura 41: Espectro de massa do álcool anísico (4a), tr: 11,96 min.....	93
Figura 42: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do m-anisaldeído (5) padrão.....	93
Figura 43: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do álcool 3-metoxi-benzílico (5a) padrão	94
Figura 44: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do m-anisaldeído (5) com CC.....	94
Figura 45: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução do m-anisaldeído (5) com CC.....	95
Figura 46: Espectro de massa do m-anisaldeído (5).....	95
Figura 47: Espectro de massa do 3-metoxi-benzílico (5a), tr: 12,03 min	95

Figura 48: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da vanilina (6) padrão.....	96
Figura 49: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do álcool vanílico (6a) padrão	96
Figura 50: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução da vanilina (6) (sem dissolução em DMSO) com CC	97
Figura 51: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução da vanilina (6) (com dissolução em DMSO) com CC	97
Figura 52: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da vanilina (6) (sem dissolução em DMSO) com CC	98
Figura 53: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da vanilina (6) (com dissolução em DMSO) com CC	98
Figura 54: Espectro de massa da vanilina (6), tr: 25,53 min (Fig. 52).....	99
Figura 55: Espectro de massa do álcool vanílico (6a), tr: 27,93 min (Fig. 52) e tr: 14,29 min (Fig. 53)	99
Figura 56: Espectro de massa do éter etil vanílico (6b), tr: 13,68 min (Fig. 53).....	99
Figura 57: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do cinamaldeído (7) padrão.....	100
Figura 58: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do álcool cinâmico (7a) padrão	100
Figura 59: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do cinamaldeído (7) com CC.....	101
Figura 60: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução do cinamaldeído (7) com CC.....	101
Figura 61: Espectro de massa do cinamaldeído (6).....	102
Figura 62: Espectro de massa do álcool cinâmico (6a), tr: 12,36 min	102
Figura 63: Espectro de massa do álcool dihidrocinâmico (6b), tr: 11,22 min.....	102
Figura 64: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do α -metil-cinamaldeído (8) padrão.....	103
Figura 65: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do α -metil-cinamaldeído (8) com CC	103
Figura 66: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução do α -metil-cinamaldeído (8) com CC.....	104
Figura 67: Espectro de massa do álcool α -metil-cinâmico (8a), tr: 7,42 min	104
Figura 68: Espectro de massa do álcool dihidroxi- α -metil-cinâmico (8b), tr: 6,42 min	104
Figura 69: Espectro de massa do ácido α -metil-cinâmico (8c), tr: 9,09 min.....	105

Figura 70: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do furfural (9) padrão	105
Figura 71: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do álcool furfurílico (9a) padrão	106
Figura 72: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do furfural (9) com CC	106
Figura 73: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução do furfural (9) com CC.....	107
Figura 74: Espectro de massa do furfural (9)	107
Figura 75: Espectro de massa do álcool furfurílico (9a), tr: 6,06 min.....	107
Figura 76: Cromatograma da mistura racêmica R-1a (tr: 4,47 min) e S-1a (tr: 4,67 min) obtida por redução com NaBH_4	109
Figura 77: Cromatograma da mistura dos álcoois quiral R-1a (tr: 4,55 min) e S-1a (tr: 4,78 min) obtida por biorredução com CC	109
Figura 78: Cromatograma da mistura racêmica R-2a e S-2a obtida por redução com NaBH_4	110
Figura 79: Cromatograma da mistura dos álcoois quiral R-2a (tr: 23,23 min) e S-2a (tr: 23,74 min) obtida por biorredução com CC	110
Figura 80: Cromatograma da mistura racêmica R-15a (tr: 6,27 min) e S-15a (tr: 5,84 min) obtida por redução com NaBH_4	111
Figura 81: Cromatograma da mistura dos álcoois quiral R-15a (tr: 6,24 min) e S-15a (tr: 5,98 min) obtida por biorredução com CC	112
Figura 82: Cromatograma da mistura racêmica R-16a (tr: 5,47 min) e S-16a (tr: 5,39 min) obtida por redução com NaBH_4	113
Figura 83: Cromatograma do álcool S-16a (tr: 5,30 min) obtida por biorredução com CC	113
Figura 84: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do citrônalo (10) padrão	115
Figura 85: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do citrônalo (10a) padrão	115
Figura 86: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do citrônalo (10) com CC	116
Figura 87: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução do citrônalo (10) com CC.....	116
Figura 88: Espectro de massa do citrônalo (10), tr: 9,98 min.....	117

Figura 89: Espectro de massa do citrionelol (10a), tr: 11,09 min	117
Figura 90: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da 3-hexanona (11) padrão	117
Figura 91: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da biorredução da 3-hexanona (11) com CC	118
Figura 92: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da 3-hexanona (11) com CC	118
Figura 93: Espectro de massa da 3-hexanona (11)	119
Figura 94: Espectro de massa do 3-hexanol (11a), tr: 4,37 min	119
Figura 95: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da ciclopentanona (12) padrão	119
Figura 96: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do ciclopentanol (12a) padrão	120
Figura 97: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da biorredução da ciclopentanona (12) com CC	120
Figura 98: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da ciclopentanona (12) com CC	121
Figura 99: Espectro de massa da ciclopentanona (12), tr: 4,94 min	121
Figura 100: Espectro de massa do ciclopentanol (12a), tr: 5,08 min	121
Figura 101: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da ciclohexanona (13) padrão	122
Figura 102: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do ciclohexanol (13a) padrão	122
Figura 103: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da biorredução da ciclohexanona (13) com CC	123
Figura 104: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da ciclohexanona (13) com CC	123
Figura 105: Espectro de massa da ciclohexanona (13)	124
Figura 106: Espectro de massa do ciclohexanol (13a), tr: 5,60 min	124
Figura 107: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da carvona (15) padrão	124
Figura 108: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da biorredução da carvona (15) com CC	125
Figura 109: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução da carvona (15) com CC	125
Figura 110: Espectro de massa da carvona (15), tr: 11,59 min	126
Figura 111: Espectro de massa do carvol (15a), tr: 10,78 min	126

Figura 112: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do acetoacetato de etila (16) padrão	126
Figura 113: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do 3-hidroxi-butanoato de etila (16a) padrão	127
Figura 114: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do acetoacetato de etila (16) com CC.....	127
Figura 115: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução do acetoacetato de etila (16) com CC	128
Figura 116: Espectro de massa do acetoacetato de etila (16).....	128
Figura 117: Espectro de massa do 3-hidroxi-butanoato de etila (16a), tr: 6,35 min	128
Figura 118: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do butirato de etila (18) padrão	130
Figura 119: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido da biorredução do butirato de etila (18) com CC	130
Figura 120: Cromatograma CG-EM do produto obtido da biorredução do butirato de etila (18) com CC	131
Figura 121: Espectro de massa do butirato de etila (18), tr: 4,42 min.....	131
Figura 122: Espectro de massa do ácido butírico (18a), tr: 4,54 min.....	131
Figura 123: Estrutura química do álcool anísico	138
Figura 124: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do álcool anísico.....	139
Figura 125: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do álcool anísico.....	139
Figura 126: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) do álcool anísico.....	140
Figura 127: Estrutura química do acetato de anisila.....	141
Figura 128: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do acetato de anisila	141
Figura 129: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do acetato de anisila	142
Figura 130: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) do acetato de anisila	142
Figura 131: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto obtido da bioacetilação do álcool anísico com EICC a 70°C	155
Figura 132: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do produto obtido da bioacetilação do álcool anísico com EICC a 70°C	155
Figura 133: Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) do produto obtido da bioacetilação do álcool anísico com EICC a 70°C.....	156

Figura 134: Cromatograma do produto obtido da bioacetilação do álcool anísico com EICC a 70°C	156
Figura 135: Espectro de massa do álcool anísico, tr=6,40 min (Fig. 134)	157
Figura 136: Espectro de massa do acetato de anisila, tr=8,10 (Fig. 134).....	157
Figura 137: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do álcool benzílico (3a) padrão	159
Figura 138: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool benzílico (3a) com EICC a 30°C	160
Figura 139: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool benzílico (3a) com EICC a 70°C	160
Figura 140: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool benzílico (3a) com EICC a 30°C.....	161
Figura 141: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool benzílico (3a) com EICC a 70°C.....	161
Figura 142: Espectro de massa do álcool benzílico (3a), tr: 8,06 min (Fig. 140)	162
Figura 143: Espectro de massa do acetato de benzila (3a'), tr: 10,12 min (Fig. 140).....	162
Figura 144: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do álcool 3-metoxibenzílico (5a) padrão	163
Figura 145: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool 3-metoxibenzílico (5a) com EICC a 30°C.....	164
Figura 146: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool 3-metoxibenzílico (5a) com EICC a 70°C.....	164
Figura 147: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool 3-metoxibenzílico (5a) com EICC a 30°C.....	165
Figura 148: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool 3-metoxibenzílico (5a) com EICC a 70°C.....	165
Figura 149: Espectro de massa do álcool 3-metoxibenzílico (5a), tr: 11,95 min (Fig. 147)	166
Figura 150: Espectro de massa do acetato de 3-metoxibenzila (5a'), tr: 13,63 min (Fig. 147)	166
Figura 151: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do álcool cinâmico (7a) padrão	166

Figura 152: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool cinâmico (7a) com EICC a 30°C	167
Figura 153: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool cinâmico (7a) com EICC a 70°C	167
Figura 154: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool cinâmico (7a) com EICC a 30°C.....	168
Figura 155: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool cinâmico (7a) com EICC a 70°C.....	168
Figura 156: Espectro de massa do álcool cinâmico (7a), tr: 12,31 min (Fig. 154)	169
Figura 157: Espectro de massa do acetato de cinamila (7a'), tr: 14,23 min (Fig. 154).....	169
Figura 158: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do álcool furfúrico (9a) padrão ..	169
Figura 159: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool furfúrico (9a) com EICC a 30°C	170
Figura 160: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool furfúrico (9a) com EICC a 30°C.....	170
Figura 161: Espectro de massa do álcool furfúrico (9a), tr: 5,59 min (Fig. 160).....	171
Figura 162: Espectro de massa do acetato de furfurila (9a'), tr: 9,77 min (Fig. 160)	171
Figura 163: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do álcool amílico (27) padrão.....	173
Figura 164: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool amílico (23) com EICC a 30°C.....	174
Figura 165: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool amílico (23) com EICC a 30°C	174
Figura 166: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool amílico (23) com EICC a 70°C	175
Figura 167: Espectro de massa do álcool amílico (23), tr: 4,36 min (Fig. 165).....	175
Figura 168: Espectro de massa do acetato de amilila (23a), tr: 7,80 min (Fig. 165).....	175
Figura 169: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do álcool octílico (24) padrão.....	176
Figura 170: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool octílico (24) com EICC a 30°C.....	176
Figura 171: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool octílico (24) com EICC a 70°C.....	177

Figura 172: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool octílico (24) com EICC a 30°C	177
Figura 173: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool octílico (24) com EICC a 70°C	178
Figura 174: Espectro de massa do álcool octílico (24), tr 8,52 min (Fig. 172).....	178
Figura 175: Espectro de massa do acetato de octila (24a), tr: 10,73 min (Fig. 172).....	178
Figura 176: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do álcool decanóico (25) padrão ..	179
Figura 177: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool decanóico (25) com EICC a 30°C	179
Figura 178: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do álcool decanóico (25) com EICC a 70°C	180
Figura 179: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool decanóico (25) com EICC a 30°C	180
Figura 180: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool decanóico (25) com EICC a 70°C	181
Figura 181: Espectro de massa do álcool decanóico (25), tr: 11,72 min (Fig. 179).....	181
Figura 182: Espectro de massa do acetato de decanoíla (25a), tr: 13,66 min (Fig. 179) ...	181
Figura 183: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do citrônolol (10a) padrão	182
Figura 184: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do citrônolol (10a) com EICC a 30°C	182
Figura 185: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do citrônolol (10a) com EICC a 70°C	183
Figura 186: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do citrônolol (10a) com EICC a 30°C	183
Figura 187: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do citrônolol (10a) com EICC a 70°C	184
Figura 188: Espectro de massa do álcool citrônolol (10a), tr: 11,00 min (Fig. 186).....	184
Figura 189: Espectro de massa do acetato de citrônolila (10a'), tr: 12,84 min (Fig. 186) .	184
Figura 190: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do álcool alílico (26) com EICC a 30°C	185
Figura 191: Espectro de massa do álcool alílico (26), tr: 2,24 min (Fig. 190).....	185

Figura 192: Espectro de massa do acetato de alila (26a), tr: 3,42 min (Fig. 190).....	185
Figura 193: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do feniletan-1-ol (1a) padrão.....	187
Figura 194: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do feniletan-1-ol (1a) com EICC a 30°C.....	188
Figura 195: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do feniletan-1-ol (1a) com EICC a 30°C.....	188
Figura 196: Espectro de massa do feniletan-1-ol (1a), tr: 8,36 min (Fig. 195).....	189
Figura 197: Espectro de massa do acetato de feniletan-1-ila (1a'), tr: 10,45 min (Fig. 195).....	189
Figura 198: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do 3-metoxi-feniletan-1-ol (2a) padrão.....	189
Figura 199: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do 3-metoxi-feniletan-1-ol (2a) com EICC a 30°C.....	190
Figura 200: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do 3-metoxi-feniletan-1-ol (2a) com EICC a 30°C.....	190
Figura 201: Espectro de massa do 3-metoxi-feniletan-1-ol (2a), tr: 11,77 min (Fig. 200)	191
Figura 202: Espectro de massa do acetato de 3-metoxi-feniletan-1-ila (2a'), tr: 15,47 min (Fig. 200).....	191
Figura 203: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do ciclopentanol (12a) com EICC a 30°C.....	192
Figura 204: Espectro de massa do ciclopentanol (12a), tr: 4,90 min (Fig. 203).....	193
Figura 205: Espectro de massa do acetato de ciclopentila (12a'), tr: 9,47 min (Fig. 203).	193
Figura 206: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do ciclohexanol (13a) padrão.....	193
Figura 207: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do ciclohexanol (13a) com EICC a 30°C.....	194
Figura 208: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do produto obtido da bioacetilação do ciclohexanol (13a) com EICC a 70°C.....	194
Figura 209: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do ciclohexanol (13a) com EICC a 30°C.....	195
Figura 210: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do ciclohexanol (13a) com EICC a 70°C.....	195

Figura 211: Espectro de massa do ciclohexanol (13a), tr: 5,49 min (Fig. 209)	196
Figura 212: Espectro de massa do acetato de ciclohexila (13a'), tr: 8,01 min (Fig. 209)..	196
Figura 213: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do α -terpineol (27) com EICC a 30°C	197
Figura 214: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do α -terpineol (27) com EICC a 70°C	198
Figura 215: Espectro de massa do α -terpineol (27), tr: 5,42 min (Fig. 213)	198
Figura 216: Espectro de massa do acetato de α -terpinila (27a), tr: 7,24 min (Fig. 213)	198
Figura 217: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do carvacrol (28) padrão.....	200
Figura 218: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido da bioacetilação do carvacrol (28) com EICC a 70°C.....	200
Figura 219: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do carvacrol (28) com EICC a 30°C	201
Figura 220: Cromatograma CG-EM do produto obtido da bioacetilação do carvacrol (28) com EICC a 70°C	201
Figura 221: Espectro de massa do carvacrol (28), tr: 6,60 min (Fig. 219).....	202
Figura 222: Espectro de massa do acetato de carvacrila (28a), tr: 7,45 min (Fig. 219).....	202
Figura 223: Fotografia das enzimas imobilizadas do caldo de cana (EICC) após filtração e lavagem.....	210
Figura 224: Fotografia das enzimas imobilizadas do caldo de cana (EICC) após secagem a temperatura ambiente	210
Figura 225: Fotografias MEV com 65X de aumento de três partículas de (EICC).....	211
Figura 226: Fotografias MEV com 125X de aumento de uma partícula de (EICC)	211
Figura 227: Fotografias MEV com 250X de aumento de uma partícula de (EICC)	212
Figura 228: Fotografias MEV com 500X de aumento de uma partícula de (EICC)	212

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das enzimas segundo a IUBMB	19
Tabela 2: Principais cofatores em biocatálise.....	19
Tabela 3 : Resultados obtidos para biorredução de 1-piridinil-4-etanona com <i>C. roseus</i>	32
Tabela 4: Desracemização de 1-piridinil-4-etanol por <i>C. roseus</i>	32
Tabela 5: Resultados das biorreduções da 2-(4-nitro-fenil)-N-(2-oxo-2-piridin-3-il-etil)-acetamida com vários microorganismos.....	33
Tabela 6: Excessos enantioméricos dos produtos da biorredução de 1,2-indanediona com microorganismos	34
Tabela 7 : Resultados da biorredução de derivados da 2-oxociclopentanocarboxamidas com fungos	35
Tabela 8 : Biorredução assimétrica da diaril cetona utilizando microorganismos	36
Tabela 9 : Produtos obtidos da biorredução de β -ceto-nitrilas por <i>Curvularia lunata</i>	37
Tabela 10: Produtos obtidos da biorredução de β -ceto-nitrilas aromáticas com <i>Curvularia lunata</i>	38
Tabela 11: Biorredução do fenilglioxal e de alguns de seus derivados alquilados por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Tabela 12: Redução de α -metilenocetonas com microorganismos	40
Tabela 13: Biorredução de acetofenonas cloradas e de uma bifenila por microorganismos com concentração inicial de 1g/L.....	41
Tabela 14: Rendimentos de conversão na redução da 2-cloro-1-fenil-2-propen-1-ona com <i>S. cerevisiae</i> e composição dos estereoisômeros obtidos	42
Tabela 15: Redução enantiosseletiva de β -ceto sulfonas	43
Tabela 16: Redução de acetofenonas com <i>D. carota</i>	44
Tabela 17: Redução de β -ceto ésteres com <i>D. carota</i>	44
Tabela 18: Redução de α -azido-aril-cetonas com <i>D. carota</i>	45
Tabela 19: Redução de cetonas de cadeia aberta com <i>D. carota</i>	45
Tabela 20: Redução de cetonas com <i>D. carota</i> em escala preparativa.....	46
Tabela 21: Redução de (\pm)1-metil-2-oxociclopentanocarbonitrila (n=1) e (\pm)1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila (n=2) por <i>M. isabellina</i> em escala preparativa (1g de substrato)	47

Tabela 22: Biorredução de (\pm)2-oxociclopentanocarbonitrila (n=1) e (\pm)2-oxociclohexantanocarbonitrila (n=2) por microorganismos em escala analítica	48
Tabela 23: Biorredução de ésteres α,γ -dioxo-esteres por <i>S. cerevisiae</i>	49
Tabela 24: Biorredução de α -haloacetofenonas por <i>R. glutinis</i> CCT 2182 e <i>G. candidum</i> CCT 1205	50
Tabela 25: Redução microbiana de <i>orto</i> , <i>meta</i> e <i>para</i> fluoracetofenonas com células inteiras de fungos	50
Tabela 26: Redução de β -cetoesteres aromáticos por <i>D. carota</i>	51
Tabela 27: Biorredução de cetonas por <i>Trichothecium</i> sp	52
Tabela 28: Resultados da redução de α -ceto- β -lactamas com microorganismos.....	53
Tabela 29: Reduções de α -ceto- β -lactamas por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
Tabela 30: Resultados da redução enantiosseletiva de cetonas alicíclicas por LSADH	54
Tabela 31: Resultados da redução enantiosseletiva de α -cetoesteres por LSADH	55
Tabela 32: Resultados da redução enantiosseletiva de β -cetoesteres por LSADH	55
Tabela 33: Resultados da redução enantiosseletiva de acetofenonas por LSADH	56
Tabela 34: Resultados da redução enantiosseletiva de fenil alcanonas por LSADH	56
Tabela 35: Biorredução enantiosseletiva da acetofenona com <i>S. cerevisiae</i>	57
Tabela 36: Redução da 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutanoato de etila com microorganismos em diferente pH.....	58
Tabela 37: Influencia do tamanho das partículas na biorredução da 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutanoato de etila usando <i>S. cerevisiae</i> imobilizada.....	59
Tabela 38: Biorredução da 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutanoato de etila mediada por <i>S. cerevisiae</i> imobilizada em diferentes matrizes porosas.....	59
Tabela 39: Biorredução de α -azidoacetofenona mediada por <i>Geotrichum candidum</i> CCT 2182 e <i>Rhodotorula glutinis</i> CCT 1205	60
Tabela 40: Biorredução de acetofenonas <i>para</i> -substituídas com vegetais	61
Tabela 41: Resultados da biorredução de aldeídos e cetonas com <i>Manihot esculenta</i> e <i>Manihot dulcis</i>	63
Tabela 42: Efeito dos substituintes na biorredução com <i>C. tropicallis</i> PBR-2 MTCC 5158	64

Tabela 43: Biorredução assimétrica de ciclohexen-1-onas com <i>S. carisbergensis</i> como fonte de enoatos redutases	65
Tabela 44: Redução enantiosseletiva de cetonas por <i>Escherichia coli</i> Sar268 e LSADH...	65
Tabela 45: Biorredução assimétrica de ácidos dicarboxílicos (31-33) e dimetil ésteres (34-36) com enoatos redutases OPR1, OPR3 e YqjM.....	67
Tabela 46: Biorredução de α -oxo-esteres mediada por <i>S. cerevisiae</i> em sistema sem solvente.....	68
Tabela 47: Biorredução da acetofenona com culturas de células e tecidos de plantas.....	69
Tabela 48: Biorredução da croman-4-ona com culturas de células e tecidos de plantas.....	70
Tabela 49: Biorredução da 6-acetil-2,2-dimetil-2,3-dihidro-4H-crome-4-ona com culturas de células	71
Tabela 50: Biorredução da 6-acetil-2,2-dimetil-2,3-dihidro-4H-crome-4-ona com tecidos vegetais	72
Tabela 51: Percentagem relativa dos produtos da biorredução de 1-13, 15, 16 e hidrólise de 18 obtidos por RMN ^1H e CG-EM.....	80
Tabela 52: Sinais de RMN ^1H utilizados na integração dos hidrogênios selecionados para os compostos 1-13, 15 e 16, comparados com a integração dos sinais dos produtos, álcoois 1a-13a, 15a e 16a, obtidos por biorredução com CC.....	132
Tabela 53: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o álcool anísico e acetato de anisila	143
Tabela 54: Rendimentos reacionais da bioacetilação dos álcoois aromáticos primários ...	159
Tabela 55: Rendimentos reacionais da bioacetilação dos álcoois alifáticos primários	172
Tabela 56: Rendimentos reacionais da bioacetilação dos álcoois aromáticos secundários	187
Tabela 57: Rendimentos reacionais da bioacetilação dos álcoois alifáticos cíclicos secundários	192
Tabela 58: Rendimentos reacionais da bioacetilação do carvacrol	199
Tabela 59: Sinais de RMN ^1H e integração dos hidrogênios selecionados dos álcoois primários e secundários comparados com a integração dos sinais dos produtos obtidos por bioacetilação com EICC	203
Tabela 60: Massas recuperadas nas reações de biorredução	214
Tabela 61: Massas recuperadas nas reações de bioacetilações e quantidade de anidrido acético utilizado.....	215

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Evolução dos trabalhos publicados sobre biocatálise entre 1997 e 2007.....	28
Gráfico 2: Resultados do estudo cinético da biorredução do benzaldeído (3) com CC realizado entre 12 e 72 horas	133
Gráfico 3: Resultados do estudo cinético da biorredução do anisaldeído (4) com CC realizado entre 12 e 72 horas	134
Gráfico 4: Resultados do estudo cinético da biorredução do furfural (9) com CC realizado entre 12 e 72 horas.....	134
Gráfico 5: Resultados do estudo cinético da biorredução da ciclohexanona (13) com CC realizado entre 12 e 72 horas	135
Gráfico 6: Resultados do estudo cinético da biorredução do β -cetoéster (16) com CC realizado entre 12 e 72 horas	135
Gráfico 7: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico obtidos pela variação da quantidade de EICC.....	145
Gráfico 8: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos pela variação do tempo reacional.....	146
Gráfico 9: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos pela variação do solvente	147
Gráfico 10: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos pela variação da quantidade do substrato (álcool anísico)	149
Gráfico 11: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos pela variação da velocidade de agitação.....	150
Gráfico 12: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos a 50°C.....	151
Gráfico 13: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos a 70°C.....	152
Gráfico 14: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos após cinco reações com o mesmo material enzimático a 30°C	153
Gráfico 15: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos após cinco reações com o mesmo material enzimático a 70°C.....	154

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Soro Albumina Bovina
CC	Caldo de cana
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CG-DIC	Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTP	Citosina Trifosfato
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EICC	Enzima Imobilizada do Caldo de Cana
ES	Complexo Enzima Substrato
FDH	Formiato Desidrogenase
GTP	Guanosina Trifosfato
IUBMB	Internation Union of Biochemistry and Molecular Biology
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
Log P	Logaritmo do Coeficiente de Partição

LSADH	Enzima Álcool Desidrogenase
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
QEEL	Química Especializada Erich LTDA
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SAM	S-adenosil metionina
tr	Tempo de Retenção
UTP	Uridina Trifosfato
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
δ	Deslocamento Químico
Φ	Diâmetro Interno

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	2
2. CONSIDERAÇÕES SOBRE A CANA DE AÇÚCAR	12
3. CONSIDERAÇÕES SOBRE BIOCATÁLISE.....	16
3.1. Biocatálise	16
3.2. Enzimas	17
3.3. Catálise enzimática.....	20
3.3.1. Mecanismos de atuação enzimática.....	20
3.4. Vantagens e Desvantagens dos biocatalisadores	23
3.4.1. Vantagens	23
3.4.2. Desvantagens	24
3.5. Fatores importantes no desenvolvimento de um trabalho de biocatálise	25
3.6. Imobilização de enzimas	25
4. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
5.1. Métodos para Determinação de Proteínas	74
5.1.1. Determinação de Proteínas no CC pelo Método de Lowry	75
5.1.2. Determinação de Proteínas no CC pelo Método de Bradford	76
5.2. Biorreduções Utilizando Caldo de Cana (CC)	77

5.2.1. Estudo Cinético das reações de biorredução de compostos carbonílicos com CC.	133
5.3. Bioacetilações Utilizando as Enzimas Imobilizadas do Caldo de Cana (EICC)....	136
5.3.1. Imobilizações Enzimáticas	136
5.3.2. Lipases	137
5.3.3. Acetilação Convencional do Álcool Anísico.....	137
5.3.4. Acetilação Enzimática do Álcool Anísico.....	143
5.3.4.1. Influência da Quantidade Enzimática.....	144
5.3.4.2. Influência do Tempo Reacional.....	145
5.3.4.3. Influência do Solvente.....	146
5.3.4.4. Influência da Quantidade de Substrato.....	148
5.3.4.5. Influência da Velocidade de Agitação.....	149
5.3.4.6. Influência da Temperatura.....	150
5.3.4.7. Reutilização das Enzimas Imobilizadas (EICC).....	152
5.3.5. Acetilação Enzimática de outros Álcoois.....	157
5.3.5.1. Acetilação Enzimática de Álcoois Primários	158
5.3.5.2. Acetilação Enzimática de Álcoois Secundários	186
5.3.5.3. Acetilação Enzimática de Álcoois Terciários.....	197
5.3.5.4. Acetilação Enzimática de Fenóis.....	199
6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	205
6.1. Material Utilizado.....	205
6.2. Métodos Cromatográficos	205
6.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	205
6.2.2. Cromatografia em Coluna por Adsorção.....	206
6.3. Métodos Espectrométricos	206
6.3.1. Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	206
6.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H) e de Carbono-13 (RMN ¹³ C).....	206
6.3.3. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	207
6.3.4. Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama (CG-DIC)....	207

6.4. Métodos para obtenção de dados físicos	207
6.4.1. Rotações ópticas	207
6.5. Determinação do Teor de Proteínas no Caldo de Cana	208
6.5.1. Método de Lowry	208
6.5.2. Método de Bradford	209
6.6. Imobilização das Enzimas do Caldo de Cana de Açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	
.....	209
6.7. Métodos Reacionais.....	212
6.7.1. Redução dos compostos carbonílicos com NaBH ₄ (boridreto de sódio).....	212
6.7.2. Acetilação Convencional do Álcool Anísico.....	213
6.7.3. Biorreduções dos compostos carbonílicos utilizando caldo de cana.....	213
6.7.4. Bioacetilações dos álcoois utilizando enzima imobilizada em alginato do caldo de cana	215
7. CONCLUSÕES.....	218
8. DADOS ESPECTROSCÓPICOS	221
REFERÊNCIAS.....	226

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Quando se fala em reações catalisadas por enzimas, naturalmente, vem à tona, uma das biotransformações mais antigas que se conhece e que permeia a própria história do desenvolvimento da humanidade: a conversão de açúcares em álcool no processo da fermentação. Na evolução histórica desse processo, foi verificado, então, que na técnica de fermentação, a reação de biotransformação tinha como responsável direto não o microorganismo (*Saccharomyces cerevisiae*) em si, mas suas enzimas, originando, assim, a compreensão dos fundamentos químicos do processo. No caso específico da fermentação alcoólica, foi observado que os carboidratos são metabolizados pelo sistema enzimático dos microorganismos com produção de álcool etílico e ácido carbônico através de reação catalisada por enzimas da levedura. Neste ponto, é importante ressaltar que um catalisador químico como um ácido inorgânico, pode, de modo geral, catalisar as reações de hidrólise de carboidratos, proteínas, glicérides, como também, de diversas outras substâncias orgânicas. As enzimas, pelo contrário, são mais específicas em sua ação catalisadora. Por exemplos: um ácido mineral transforma o amido em glicose (monossacarídeo) pela hidrólise, ao passo que, a enzima diastátase transforma o mesmo amido em maltose (dissacarídeo), também pela hidrólise; pela hidrólise os ácidos minerais transformam as proteínas em aminoácidos, enquanto, as proteases não levam a reação além de peptídeos (dois ou mais aminoácidos).

A partir não somente das descobertas acima, mas também de várias outras, a biocatálise, sobretudo nos últimos anos, experimentou significativo desenvolvimento, tornando-se um importante ramo da química orgânica na obtenção de intermediários e de produtos acabados de ordem farmacêutica e comercial, em geral. Em consequência, várias classes de reações tem sido introduzidas e otimizadas. Novas técnicas de biologia molecular estão sendo aplicadas em biocatálise para obtenção de organismos mais eficientes e resistentes a temperatura (principal limitação na utilização dos mesmos, na forma nativa, em processos industriais) (DE CONTI, RODRIGUES e MORAN, 2001).

A obtenção dos mais diversos compostos orgânicos por via sintética, sejam como intermediários, sejam como produtos finais, de fármacos, cosméticos ou agrícolas, tem como

base uma grande complexidade de reações e reagentes. Isto levou a de síntese orgânica tradicional a um grande desenvolvimento, considerando vários aspectos, podendo-se destacar dois de importância fundamental, quais sejam, rendimento e seletividade. Muitos esforços foram devotados no sentido de obter intermediários de sínteses contendo centros quirais tendo em vista o aumento da atividade biológica em determinadas substâncias. Um recente estudo mostrou que de 128 drogas, 69 continham dois ou mais centros quirais (CAREY et al., 2006). Logo, quiralidade tornou-se a força propulsora para a química de síntese orgânica e, conseqüentemente, a investigação de qualquer reação com capacidade para introduzir quiralidade revestiu-se de interesse na obtenção de princípios ativos de drogas ou intermediários a elas destinados. Desde que, a habilidade de fontes naturais para induzir quiralidade é conhecida há muitos anos, um grande número de enzimas foi envolvido nessa investigação, incluindo hidrolases, oxirredutases, lipases, isomerasas, etc. (CORDELL et al., 2007). O uso de vegetais ou derivados de vegetais como biocatalisadores em reações orgânicas, pode oferecer uma excelente alternativa na investigação de reações na obtenção de produtos de interesse, considerando, sobretudo, dois fatores primordiais: economia (fontes vegetais abundantes e renováveis) e ecologia (evita o uso de catalisadores clássicos, caros e nocivos ao meio ambiente). Dependendo do vegetal, diversas vantagens podem ser agregadas. Por exemplo, a utilização de vegetal intacto geralmente dispensa a necessidade de co-fatores (geralmente caros) desde que a planta automaticamente suprime esta exigência. Em adição, dependendo do vegetal usado, um determinado enantiômero pode ser obtido em alto rendimento e com alto excesso enantiomérico, fator crítico com relação à ação de um determinado medicamento. Enfim, fatores como menor tempo, menor custo e a acessível parte experimental do sistema de reação, tornam o uso de plantas uma alternativa muito satisfatória.

O amplo potencial biotecnológico demonstrado pelos biocatalisadores tem atraído a atenção de muitos pesquisadores de áreas, como: agrotóxicos (DE CONTI, RODRIGUES e MORAN, 2001), cosméticos (VEIT et al., 2004) e farmacêuticas (FARNSWORTH et al., 1985; LUNA et al., 2004) considerando aspectos relevantes como eficiência, regiosseletividade, quimiosseletividade e, principalmente, enantiosseletividade destes biocatalisadores.

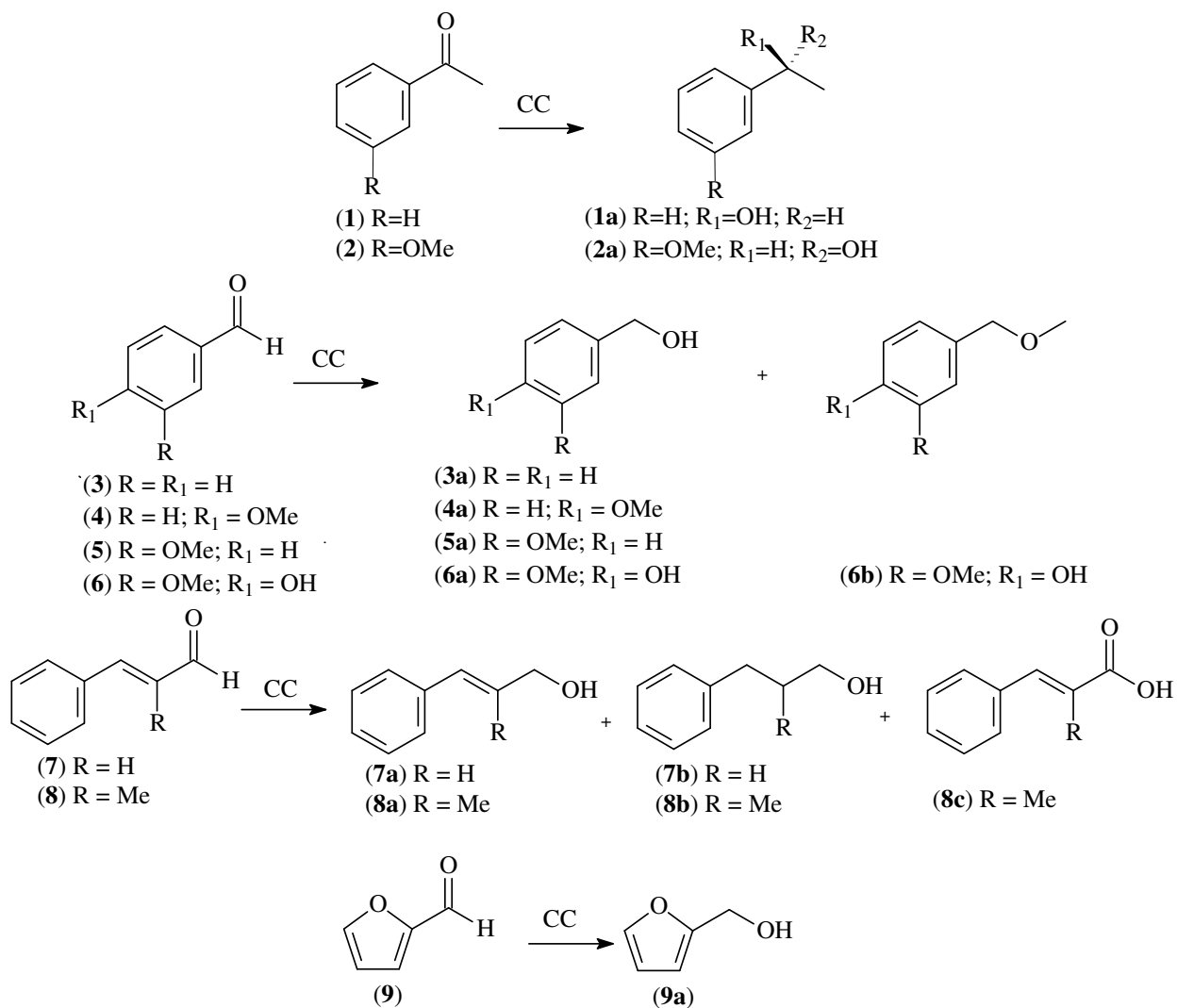
Vale salientar que, embora a maior parte das biotransformações descritas na literatura, refira-se a sistemas derivados de microorganismos (fungos, bactérias, leveduras), vários trabalhos

demonstraram há alguns anos atrás a capacidade biotransformadora de culturas de células de plantas sobre diferentes substratos tais como: cumarinas, alcalóides, terpenóides, esteróides e substâncias aromáticas em geral (REINHARD e ALFERMANN, 1980). Com o progresso na utilização de plantas como agentes de biotransformações, três distintos sistemas de transformações químicas a partir de plantas são empregados mais comumente: a) culturas de células; b) enzimas isoladas; c) partes integrais. Exemplos diversos e interessantes podem ser citados para cada um dos sistemas acima mencionados. Por exemplo, Suga et al. (1976) detectaram a biotransformação de alguns monoterpenos utilizando cultura de células de *Nicotiana tabacum*, quando a reação principal foi a oxidação regioseletiva de grupos metil em ligações olefínicas com configuração *E* a grupos hidroximetil (SUGA et al., 1976; HIRATA et al., 1981). Yadav et al. (2002), examinaram o uso da raiz de *Daucus carota* para a redução assimétrica de azidocetonas, importantes intermediários quirais de produtos farmacêuticos (β -amino e aril etanóis) (BALDASSARRE et al., 2000). Baraldi e Correa (2004) utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* na obtenção de intermediários quirais que podem ser empregados na síntese de feromônios. Ainda como exemplo, relatamos aqui, experimentos preliminares de pesquisadores do nosso grupo com espécies vegetais, usando plantas íntegras, para a redução de uma série de aldeídos e cetonas aromáticos, com destaque para as espécies *Manihot* (*Manihot dulcis* e *Manihot esculenta*). As duas espécies geraram produtos com rendimentos na faixa de 84 a 100 % e excessos enantioméricos superiores a 94 % (MACHADO et al., 2006).

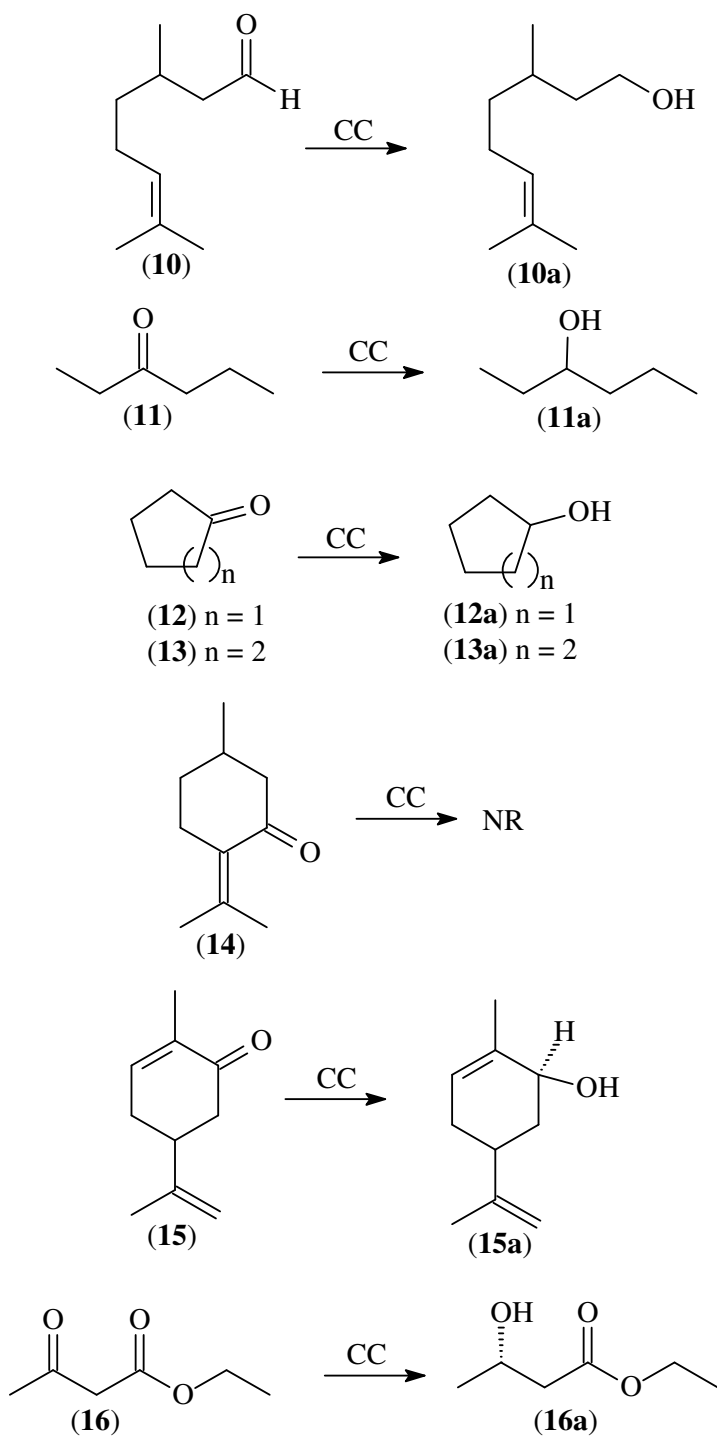
Enfim, pode-se verificar o emprego de plantas em fitorremediação de poluentes orgânicos, biorredução de cetonas e aldeídos, acetilações de álcoois, reações de hidroxilação e oxidação, entre as mais citadas (ANDRADE et al., 2006).

O presente trabalho consistiu na utilização do líquido resultante da moagem da cana de açúcar (caldo de cana = CC), amplamente utilizado na obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas (principalmente a “cachaça”), como fonte enzimática (biocatalisador) para redução de uma série de cetonas, aldeídos e outros, assim como também, na bioacetilação de álcoois (primários, secundários e terciários) e fenóis. As biorreduções dos compostos carbonílicos foram realizadas utilizando o CC bruto e as acetilações dos álcoois com a enzima imobilizada do caldo de cana (EICC). Os esquemas das reações das biorreduções de compostos carbonilados com CC e bioacetilações de álcoois e fenóis com EICC encontram-se a seguir.

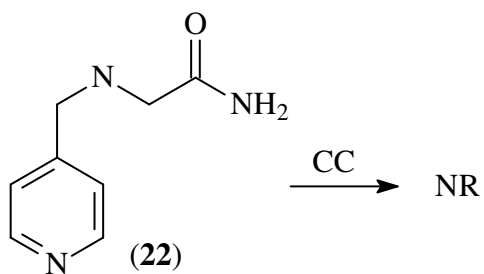
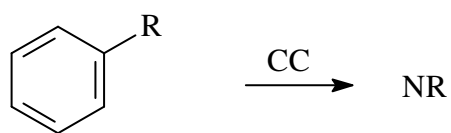
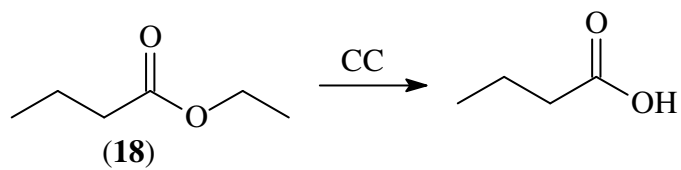
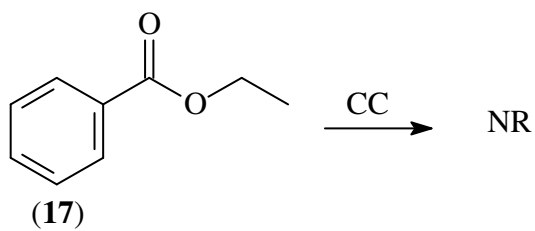
Esquema 1



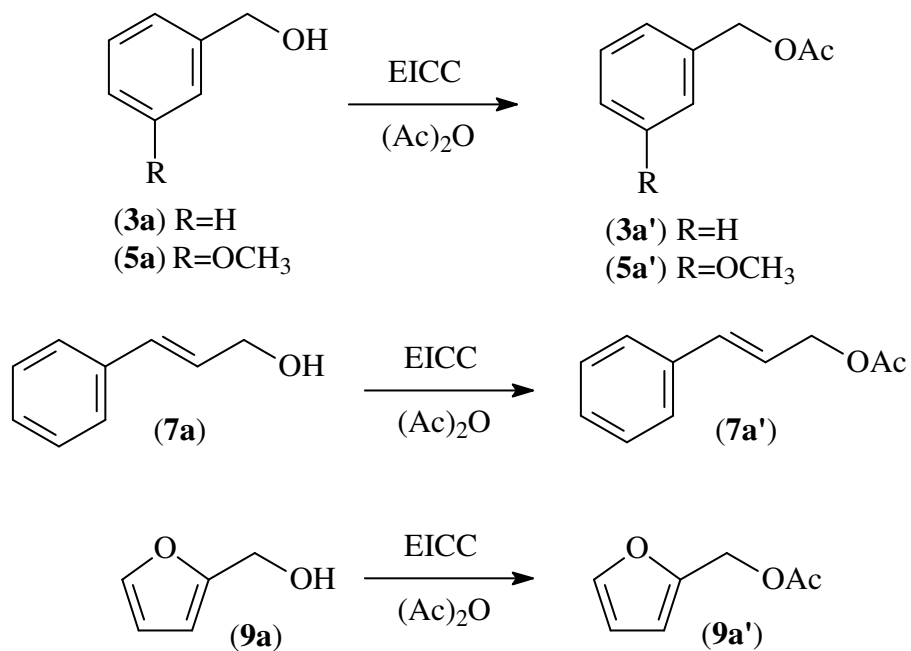
Esquema 2



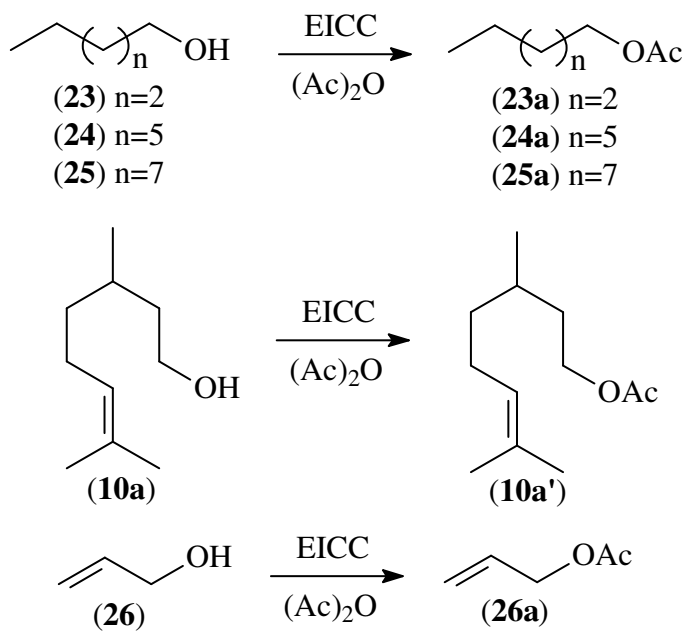
Esquema 3

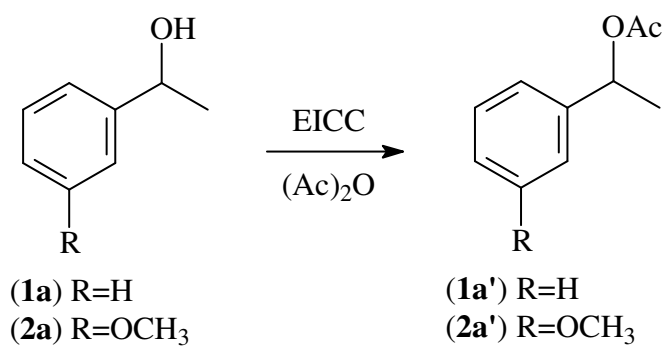
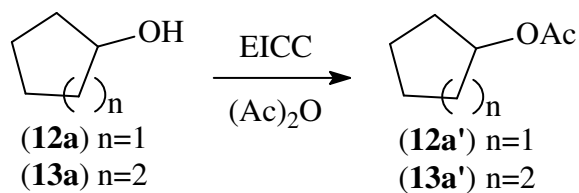
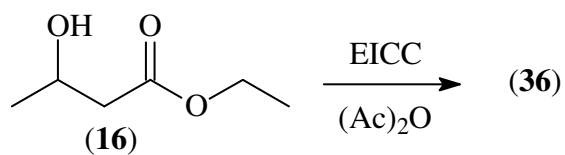
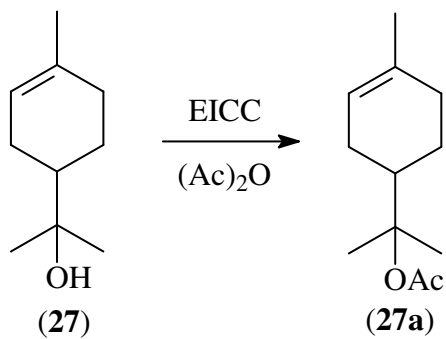


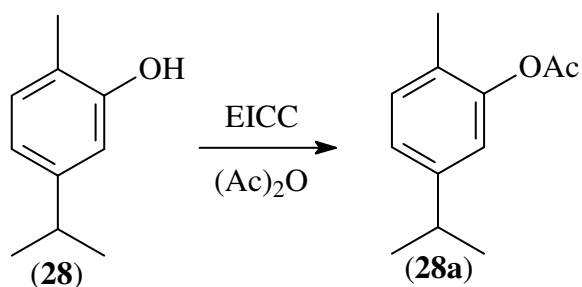
Esquema 4



Esquema 5



Esquema 6**Esquema 7****Esquema 8****Esquema 9**

Esquema 10

Este trabalho encontra-se dividido em oito capítulos:

- ❖ **CAPÍTULO 1:** Introdução
- ❖ **CAPÍTULO 2:** Considerações sobre a Cana de Açúcar
- ❖ **CAPÍTULO 3:** Considerações sobre Biocatálise
- ❖ **CAPÍTULO 4:** Pesquisa Bibliográfica
- ❖ **CAPÍTULO 5:** Resultados e Discussões
- ❖ **CAPÍTULO 6:** Procedimento Experimental
- ❖ **CAPÍTULO 7:** Conclusões
- ❖ **CAPÍTULO 8:** Dados Espectroscópicos

A composição deste trabalho e a apresentação final foram baseadas nas normas estabelecidas pelo curso de Pós-Graduação em Química Orgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

CAPÍTULO 2

CONSIDERAÇÕES SOBRE A CANA DE AÇÚCAR

2. CONSIDERAÇÕES SOBRE A CANA DE AÇÚCAR

Saccharum officinarum Linn (Fig. 1 e 2, p. 14) é uma planta da família das Poaceae, originária da Ásia (Índia ou Polinésia) conhecida como cana de açúcar e muito cultivada no território brasileiro. Segundo Doorembos e Kassam (1979), foi na Nova Guiné que o homem manteve o primeiro contato com a planta que chegou ao Brasil através de Martim Afonso de Souza em 1532, que iniciou seu cultivo na Capitania de São Vicente.

A cana de açúcar constitui a principal fonte de álcool etílico, obtido no Brasil em larga escala na produção de combustível e açúcar. Entretanto, segundo Belik, Ramos e Vian (1998), foi o açúcar nordestino o carro-chefe da agroindústria canavieira brasileira por quatro séculos, sempre se destacando pela sua produção e volume exportado. O Brasil é o principal produtor de cana de açúcar do mundo, com uma produção de aproximadamente 489 milhões de toneladas em 2007, segundo dados do ministério da agricultura (BRASIL, 2008).

No Ceará, a cultura da cana limita-se as regiões de serras e vales úmidos, aos baixos da região litorânea e aos brejos dos açudes sertanejos. Um de seus produtos, a aguardente, bebida fermentada com alto teor alcoólico, por ser relativamente barata é bastante consumida, sobretudo, pela população mais carente. Outro derivado é a rapadura, produto sem álcool e com alta concentração de sacarose, constituindo tempos atrás, um dos alimentos básicos da população rural.

Não é conhecido ao certo, se foi de Pernambuco ou do Rio Grande do Norte que vieram as primeiras sementes de cana **crioula**, variedade então cultivada no Brasil e trazida da Ilha da Madeira ou São Tomé pelos primeiros colonizadores. Em 1810, a crioula foi substituída pela cana de Cayenna (conhecida como caiana). Oriunda do Taiti, esta variedade foi levada às ilhas de Bourbon, passando à Guiana Francesa e de Cayenna ao Pará, em 1790. Em seguida, 1810, foi levada a Bahia onde se espalhou pelo Brasil. Tanto a caiana como outras variedades, foram quase totalmente substituídas, a partir de 1930, por variedades javanesas e outras híbridas, mais produtivas e resistentes ao mosaico (BRAGA, 1976).

A cana de açúcar (*Saccharum officinarum* Linn.) apresenta uma inflorescência em espiga, crescimento do caule na forma de colmos, folhas com lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta. Obedece a classificação botânica abaixo:

REINO	Plantae
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Liliopsida
ORDEM	Cyperales
FAMÍLIA	Poaceae
GÊNERO	<i>Saccharum</i>
ESPÉCIE	<i>Saccharum officinarum</i>

A cana colhida é processada com a retirada do caule, que é esmagado, liberando o suco que é fervido para formação do melaço, de onde o açúcar é cristalizado. O suco, bastante apreciado no Nordeste do Brasil, tem sabor muito agradável, apresentando um alto teor de açúcar (40 a 50 %) e água (65 a 75 %). Conserva todos os nutrientes da cana de açúcar, apresentando um conteúdo protéico extremamente baixo (comparado ao teor de açúcar) que o torna um alimento desbalanceado nutricionalmente. Se aquecido é usado na fabricação da rapadura. Se fermentado, na produção de bebidas alcoólicas (rum ou cachaça). As fibras, também chamadas de bagaço, podem ser utilizadas como fonte de energia (queima), suplemento de ração animal ou na obtenção de substâncias de interesse industrial.



Figura 1: Fotografia da cana de açúcar (*Saccharum officinarum* Linn.)

Fonte: <http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://baixaki.ig.com.br/imagens>, acesso em 05/05/2008



Figura 2: Fotografia mostrando detalhe do caule da cana de açúcar (*Saccharum officinarum* Linn.)

Fonte: <http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.agroanalysis.com.br/imagens>, acesso em 05/05/2008

CAPÍTULO 3

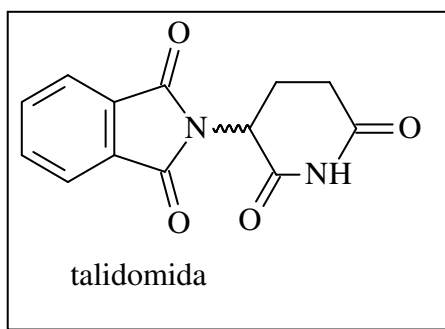
CONSIDERAÇÕES SOBRE BIOCATÁLISE

3. CONSIDERAÇÕES SOBRE BIOCATÁLISE

3.1. Biocatálise

As reações da química orgânica sintética, através das quais são obtidos os mais variados e importantes produtos, utilizam-se, em muitos casos, da catálise, fenômeno físico-químico resultante do uso de certas substâncias ou elementos denominados catalisadores e que permitem alterar a velocidade das reações. Especialmente, nos processos naturais, quase todas as transformações químicas no corpo (humano) ocorrem com a ajuda das enzimas como catalisadores. As enzimas são muito atuantes em seu trabalho e, como se sabe, são altamente seletivas. Assim, um tipo de enzima influencia somente um tipo de reação para somente uma particular molécula ou tipo de molécula. Por exemplo, a hidrólise das ligações amídicas no sistema digestivo catalisada pelas proteases, é a reação chave que transforma as proteínas em aminoácidos. Entretanto, diferentes proteases catalisam a reação de modo específico. Por exemplo, a tripsinase, catalisa, especificamente, somente a hidrólise de peptídeos nos quais um dos aminoácidos é lisina ou arginina.

A biocatálise é um campo que utiliza o potencial catalítico de organismos vivos (microorganismos, vegetais, etc), células de plantas ou enzimas isoladas, para obtenção de produtos de interesse comercial, particularmente, farmacêuticos. Neste campo, torna-se obrigatório salientar casos extremamente interessantes em relação a alguns medicamentos que apresentam moléculas quirais em sua composição, em que um dos enantiômeros exerce o efeito fisiológico desejado, enquanto o outro, é inativo ou pouco ativo. Como exemplo, pode-se citar o caso da talidomida onde o enantiômero *S* está relacionado com os efeitos teratogênicos enquanto o enantiômero *R* é responsável pelas propriedades sedativas (GARRITZ e CHAMIZO, 1994). Este e muitos outros exemplos demonstram a efetiva relação entre quiralidade e atividade biológica. Embora o uso de microorganismos date de muitos e muitos anos, na última década a biocatálise experimentou significativo desenvolvimento e um grande número de reações foram desenvolvidas e otimizadas, especialmente para a síntese de moléculas quirais de interesse biológico e industrial, tais como drogas, cosméticos e produtos agrícolas.



Tendo em vista a relação entre atividade biológica e quiralidade, a síntese orgânica procurou expandir-se também, no sentido de desenvolver vias que imitassem a comum quiralidade dos produtos resultantes de processos naturais, tornando-se este fator, a força propulsora na busca de reações com capacidade de introduzir quiralidade em substâncias com diversas finalidades, principalmente, medicamentosa. Consequentemente é crescente o interesse por reações que produzam compostos enantiomericamente puros. Na química orgânica sintética clássica, os químicos modernos procuram desenvolver métodos cada vez mais seletivos (especialmente os enantiosseletivos), que utilizam reagentes e catalisadores químicos quirais. Contudo, o emprego desses últimos que, além de caros, são tóxicos e não degradáveis, origina problemas ambientais muitos sérios (HANSON, 1997). Os biocatalisadores, oriundos dos vegetais surgem como uma alternativa ecologicamente correta (química verde) para obtenção dos mesmos produtos, isto é, de forma mais “limpa”. Apresentam características bastante atrativas, como a capacidade de agir em muitas reações com eficiência, biodegradabilidade e condições brandas de ação, além de mostrar aspectos químicos importantes tais como regiosseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade. Em adição, as reações utilizando catalisadores biológicos, apresentam uma outra vantagem muito importante, ou seja, a possibilidade de atuar não somente em meio aquoso, mas também em solvente orgânico, contrariamente ao que se pensava no passado. Normalmente, utilizam-se para esse fim enzimas imobilizadas em um suporte polimérico adequado, propiciando às enzimas uma maior resistência as variações das condições do meio.

3.2. Enzimas

As enzimas, em geral, são proteínas naturais com atividades catalíticas surpreendentes, formadas por longas cadeias de aminoácidos (peptídeos) (CAMPBELL, 1995). Estas longas

cadeias, onde os aminoácidos estão unidos por ligações amídicas (ligações peptídicas), formam a estrutura das enzimas, apresentando grupos polares tais como COO^- , OH , NH_3^+ , SH e CONH_2 . A seqüência exata dos aminoácidos na cadeia protéica é chamada estrutura primária. A conformação tridimensional dessa seqüência é denominada estrutura secundária (**Fig. 3a e 3b, p. 18**) e a disposição dessas estruturas tridimensionais forma a estrutura terciária (**Fig. 3c, p. 18**) da proteína.

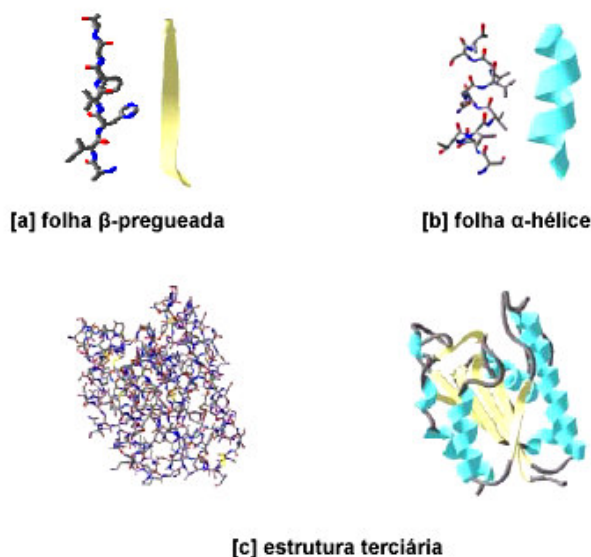


Figura 3: Representações tridimensionais das estruturas secundária e terciária de uma proteína: [a] β -pregueada, [b] α -hélice e [c] estrutura terciária

Essas gigantescas estruturas terciárias apresentam pequenas regiões (em relação ao tamanho total da enzima), localizadas próximas ou na superfície, chamada sítio ativo. A posição em que se encontra o sítio ativo facilita o acesso das moléculas do substrato, para que possam ser transformados. Aminoácidos localizados estrategicamente nesses sítios formam uma superfície complementar ao substrato. Dessa forma, a conformação e a composição química do sítio ativo da enzima determinam sua especificidade numa reação de biocatálise (LEHNINGER, 2002). As enzimas diminuem a barreira de energia entre os reagentes e produtos de forma versátil.

As enzimas são classificadas e codificadas pela IUBMB (Internation Union of Biochemistry and Molecular Biology). São divididas em seis classes principais e em várias outras subclasses (BOMMARIUS e RIEBE, 2004), de acordo com a reação química envolvida (**Tab. 1, p. 19**).

Tabela 1: Classificação das enzimas segundo a IUBMB

CLASSE	TIPO DE REAÇÃO	SUBCLASSE
Oxirredutase	Reações de oxi-redução, ou seja, transferência de elétrons.	Oxidases, redutases, hidrogenases
Transferases	Transferência de grupos (aminas, acilas, carboxilas)	Transaminases, transcarboxilases
Hidrolases	Reações de hidrólise covalente	Lípases, esterases
Liases	Reações de adição de grupos a dupla ligações ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, fosfatases
Isomerases	Reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos	Racemases, epimerases, mutases
Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e ésteres de fosfato	sintetases

Muitos biocatalisadores requerem a presença de cofatores, que podem ser moléculas orgânicas (coenzimas) ou íons metálicos (Co^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mo^{+2} , Zn^{+2}). Muitas coenzimas são derivadas de vitaminas, atuando em conjunto com as enzimas. Algumas coenzimas comumente encontradas estão relacionadas na **Tabela 2** (BRUICE, 1998).

Tabela 2: Principais cofatores em biocatálise

COENZIMA	TIPO DE REAÇÃO
NAD^+/NADH	Remoção ou adição de hidrogênio
$\text{NADP}^+/\text{NADPH}$	Remoção ou adição de hidrogênio
ATP, GTP, CTP e UTP	Fosfoliração
SAM	C_1 -alquilação
Acetil-CoA	C_2 -alquilação
Flavinas	Oxigenação
Piridoxal-fosfato	Transaminação
Biotina	Carboxilação
Complexos metal-porfirina	Peroxidação, oxigenação

NADH e NADPH (**Fig. 4**), utilizados nas reduções de cetonas e aldeídos por oxirredutases, são uns dos cofatores mais conhecidos em biocatálise. Essas substâncias garantem a transferência dos elétrons necessários para o processo de redução.

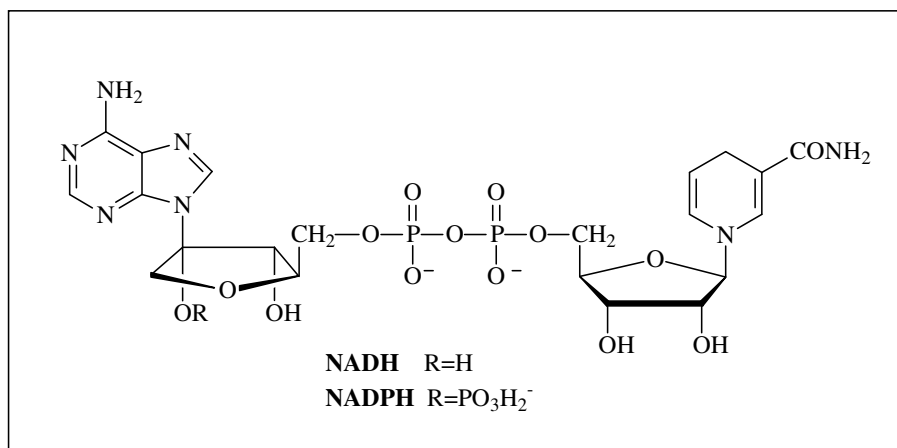


Figura 4: Estrutura química do NADH e NADPH

3.3. Catálise enzimática

As enzimas têm a capacidade de diminuir a energia de ativação das reações através da formação de um complexo intermediário com as moléculas do substrato. Este intermediário, chamado complexo enzima-substrato (ES), é formado a partir de ligações covalentes, interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, iônicas, ou ainda, forças de Van der Waals.

3.3.1. Mecanismos de atuação enzimática

A maneira com que as enzimas atuam sobre os substratos é descrita por vários modelos, sendo os principais descritos abaixo.

➤ *Modelo Chave-Fechadura*

Elaborado por Fischer em 1894, considera que a interação entre o substrato e a enzima ocorre similarmente ao encaixe de uma chave na fechadura (**Fig. 5, p. 21**). O substrato incorpora-se na estrutura enzimática através de ligações químicas com o sítio ativo, que apresenta configuração complementar ao seu, formando o complexo enzima-substrato com posterior

liberação dos produtos formados. Este modelo aceito por várias décadas, atualmente está em desuso por considerar que a enzima apresenta uma estrutura totalmente rígida (FABER, 2000).

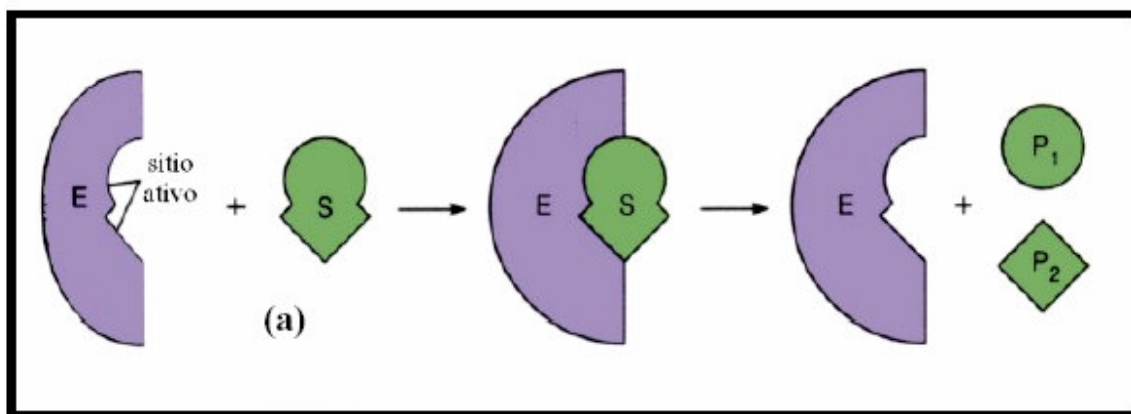


Figura 5: Esquema ilustrativo do modelo chave-fechadura

➤ *Modelo do Encaixe Induzido*

Proposto por Koshland em 1960, estabelece que a estrutura enzimática não é totalmente rígida, podendo ajustar sua conformação durante a aproximação do substrato ao sítio catalítico da enzima, para formação do complexo enzima-substrato (**Fig. 6**). O substrato encaixa-se ao sítio ativo através de uma nova conformação adquirida pela enzima (FABER, 2000).

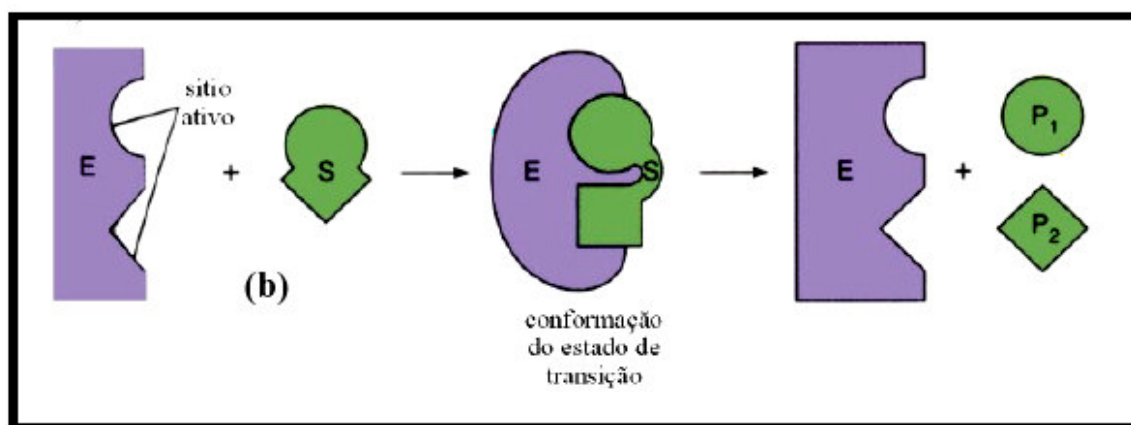


Figura 6: Esquema ilustrativo do encaixe induzido

➤ Modelo dos Três Pontos

Este modelo foi elaborado para explicar a enantiosseletividade das reações enzimáticas, sendo inicialmente proposto em 1948 por A. G. Ogston. Segundo essa teoria, para que haja um elevado grau de enantiosseletividade o substrato deve aderir-se firmemente em um espaço tridimensional. Dessa forma, considerando um substrato racêmico (*R* e *S*) cuja quiralidade encontra-se em um átomo de carbono sp^3 (Fig. 7), é necessária a presença de pelo menos três pontos distintos de ligação entre a enzima e o substrato no sítio ativo. Para compostos que possuam uma quiralidade axial ou plana envolvendo carbono sp ou sp^2 , a regra dos três pontos pode ser racionalizada.

Na **Figura 7** (caso I), a interação dos grupos A, B e C do enantiômero A são complementares aos grupos A', B' e C' do sítio ativo da enzima e com o operador químico D (grupo reativo). Portanto, a disposição espacial destes grupos leva a uma maior velocidade de reação, proporcionando uma reação estereosseletiva. Nos casos II, III e IV, observa-se que no enantiômero B as interações dos grupos A, B e C não são complementares com os grupos A', B' e C' do sítio ativo da enzima. Portanto, a catálise enzimática será menos favorecida cinética e estereoquimicamente (FABER, 2000).

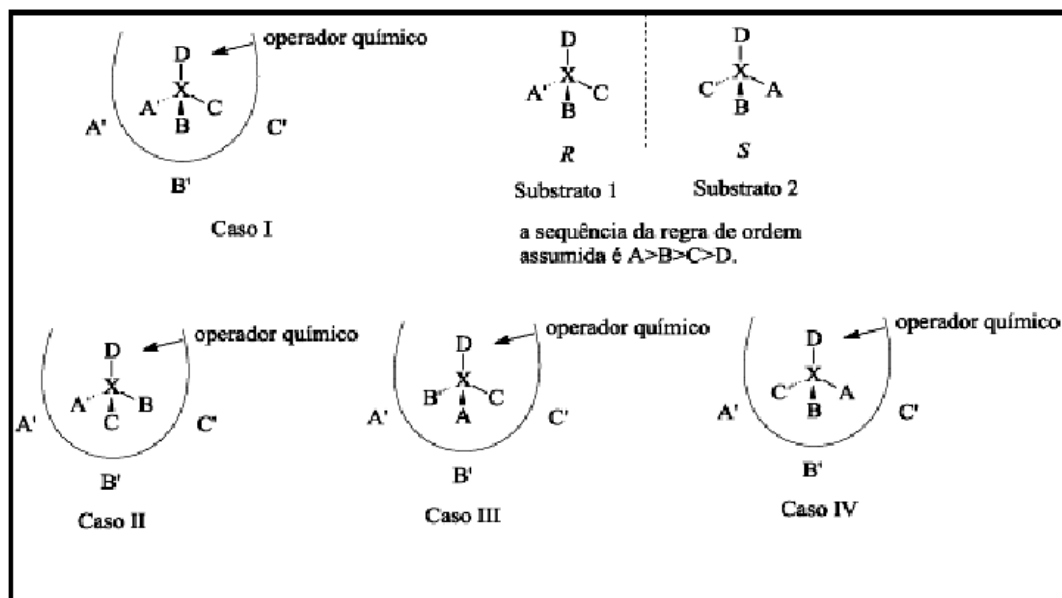


Figura 7: Representação esquemática da seletividade enzimática

3.4. Vantagens e Desvantagens dos biocatalisadores

O interesse crescente da indústria (farmacêutica, fragrâncias, entre outras) por compostos enantiomericamente enriquecidos, vem impulsionando os químicos orgânicos a pesquisarem metodologias sintéticas altamente seletivas. O desenvolvimento de biocatalisadores (microorganismos, vegetais, enzimas imobilizadas) que possam conduzir reações a elevados excessos enantioméricos, tendo em vista o enantiômero de interesse, representa uma importante alternativa. Os biocatalisadores apresentam algumas vantagens e desvantagens.

3.4.1. Vantagens

- **Catalisadores muito eficientes:** capazes de acelerar as reações de 10^6 a 10^{14} vezes em relação a correspondente reação não catalisada. Como consequência, a concentração do biocatalisador é da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} %, muito menor que a de catalisadores químicos convencionais (0,1 a 1 %).
- **Ecologicamente corretos:** são biodegradáveis e não geram resíduos altamente tóxicos, como no caso dos metais pesados.
- **Atuam sob condições brandas:** exigem normalmente intervalos de pH de 5 a 8 e temperatura de 20 a 60 °C, a pressão atmosférica.
- **Tolerância aos substratos:** interagem com uma grande variedade de substratos não naturais.
- **Atuam em meios não convencionais:** várias enzimas, e até mesmo células, tem demonstrado retenção do potencial catalítico em meios não convencionais, como solventes orgânicos.
- **Podem catalisar uma ampla faixa de reações químicas:** reações de redução, oxidação, transesterificação, hidrólise, entre outras, podem ser catalisadas por enzimas.

➤ ***Apresentam no aspecto reacional, três tipos de seletividade:***

- **Quimiosseletividade:** atuam num único tipo de grupo funcional, preservando outras funções existentes e desejáveis na molécula. Além do mais, obtém-se produtos reacionais mais limpos, facilitando o processo de purificação.
- **Regiosseletividade:** devido a sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão situados em diferentes posições da mesma molécula do substrato.
- **Enantiosseletividade:** a grande maioria das enzimas é formada por L-aminoácidos, e dessa forma atuam como catalisadores quirais. Portanto, alguma forma quiral ou pró-quiral no substrato deve ser reconhecida pela enzima, para que possa ocorrer a formação do complexo enzima substrato. Essa é a característica mais importante das enzimas.

3.4.2. Desvantagens

- ***Sensíveis a condições energéticas:*** necessitam sempre de condições brandas de operação quando em sua forma livre, constituindo um problema em situações operacionais que exijam altas temperaturas.
- ***Atividade máxima em água:*** a maioria dos substratos orgânicos são pouco solúveis em água.
- ***Algumas enzimas necessitam de cofatores:*** os cofatores são caros e de difícil recuperação.
- ***Impossibilidade de inversão quiral:*** as enzimas estão presentes na natureza em uma única forma enantiomérica, impossibilitando a inversão da indução quiral de uma determinada reação enzimática.
- ***Podem causar alergias:*** quando não manipuladas adequadamente podem causar reações alérgicas, em casos específicos.

3.5. Fatores importantes no desenvolvimento de um trabalho de biocatálise

O desenvolvimento de um trabalho com biocatalisadores exige o conhecimento de alguns fatores importantes:

- Determinar o tipo de reação (redução, oxidação, hidrólise, etc)
- Avaliar a atividade enzimática do(s) biocatalisador(es)
- Estabelecer as condições ideais de reação (temperatura, pH, solvente, concentração do substrato e do biocatalisador)
- Escolher o método mais apropriado de caracterização do(s) produto(s) (CG-DIC, CG-EM, CLAE, RMN, IV)
- No caso de produtos quirais, determinar o(s) excesso(s) enantiomérico(s)
- Determinar as condições necessárias para produzir o(s) composto(s) em maior escala

3.6. Imobilização de enzimas

Algumas enzimas são catalisadores ativos em ambientes hidrofóbicos, com eficiência muito semelhante aquela observada em meio aquoso. Entretanto, estes catalisadores estão sujeitos a inativação em meio orgânico, por fatores químicos, físicos e biológicos. Assim, há necessidade de estabilizar esses biocatalisadores, para que ocorra a manutenção da atividade catalítica e do potencial estereosseletivo.

Para tal, é utilizada a técnica de imobilização em diferentes suportes. O processo consiste em restringir a mobilidade do biocatalisador, através da imobilização dos mesmos (fixação por afinidade de natureza química, física ou por aprisionamento em um retículo) num material polimérico (**Fig. 8, p. 26**).

Estas técnicas de imobilização possibilitam a reutilização das enzimas, facilitam a separação dos produtos e aumentam a estabilidade em solventes orgânicos.

O principal objetivo da imobilização enzimática é obter um biocatalizador estável e com manutenção da atividade catalítica em comparação a sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior, não ocorrendo modificações estruturais, principalmente, em seu sítio ativo (GANDHI, 1997). A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que confirme a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (RAHMAN et al., 2005).

A imobilização pode ocorrer através de diferentes métodos, tais como: adsorção em matérias insolúveis, confinamento em géis poliméricos, encapsulamento em membranas, ligações cruzadas com reagentes bifuncionais ou multifuncionais e ligação a um suporte insolúvel.

A escolha adequada da matriz polimérica é um fator muito importante para o bom funcionamento da enzima imobilizada. As características desejáveis para um bom suporte são: área superficial elevada, boa permeabilidade, hidrofiliicidade, estabilidade química, mecânica e térmica, alta rigidez, formas e tamanhos adequados, resistência ao ataque de microorganismos e poder de reutilização.

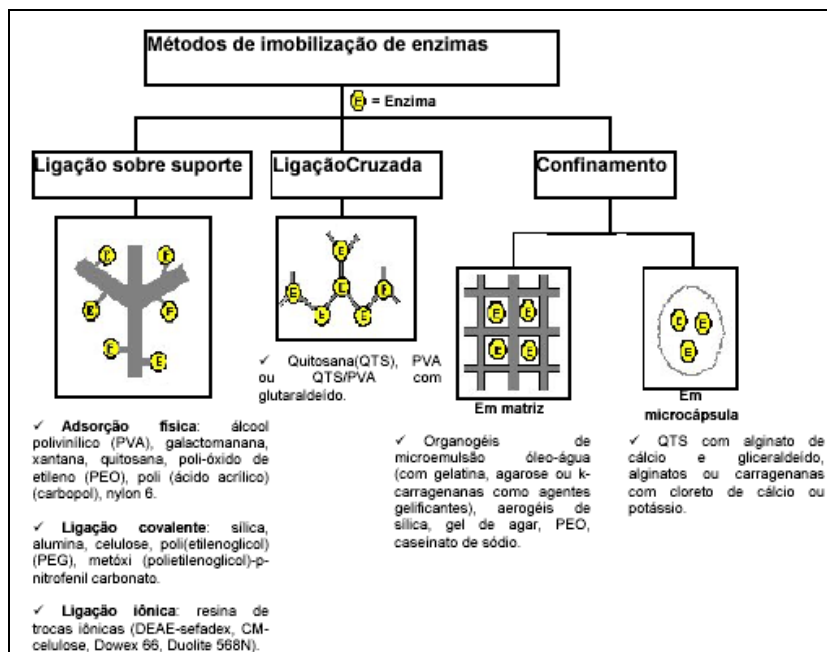


Figura 8: Principais métodos de imobilização enzimática

CAPÍTULO 4

PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

4. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Nos dias atuais, uma grande preocupação da indústria química é adotar uma postura de trabalho no sentido diminuir resíduos nocivos ao meio ambiente. Os solventes usuais, por exemplo, que possuem destacado papel nos processos químicos industriais, apresentam problemas ambientais relacionados à recuperação, descarte, toxicidade e inflamabilidade. Muito recentemente, grupos de pesquisas destacaram o uso de líquidos iônicos em reações enzimáticas com resultados comparáveis à aqueles obtidos em meio orgânico. Entre as várias vantagens dos líquidos iônicos, pode-se citar sua baixa pressão de vapor, tornando-os, relativamente, benignos do ponto de vista ambiental (KIM et al., 2001). Em adição, foi verificada sua capacidade para aumentar a atividade, seletividade e estabilidade de catalisadores. Assim, embora sejam utilizados comumente solventes orgânicos usuais, procura-se expandir o uso de biocatalisadores em condições de praticar-se uma química orgânica de síntese não somente mais eficiente, mas, ainda mais limpa. O crescente uso de biocatalisadores reflete-se no número de trabalhos publicados que vem aumentando surpreendentemente nos últimos anos. Este fato pode ser constatado observando o **Gráfico 1**, obtido por pesquisa no Scinder Finder para os anos de 1997 a 2007 (BIZERRA, 2007), utilizando a palavra chave “Biocatalisys”.

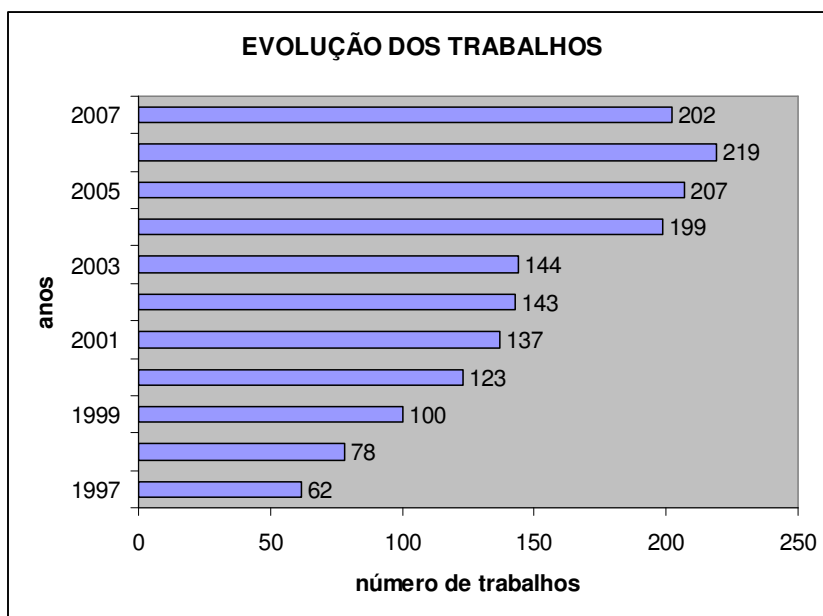


Gráfico 1: Evolução dos trabalhos publicados sobre biocatálise entre 1997 e 2007

Em virtude do grande número de trabalhos sobre o tema, escolhemos, especificamente, o assunto “biorredução”, para realização de uma pesquisa bibliográfica nos últimos dez anos (1998-2008). Este foi escolhido, por envolver reações de biotransformações muito utilizadas na obtenção de um grande número de produtos de interesse industrial, como fármacos (LUNA, 2004), cosméticos (VEIT, 2004), entre outros. As reações de biorredução apresentam um maior destaque na área de síntese de fármacos, uma vez que os produtos obtidos devem apresentar pureza enantiomérica elevada, característica essencial alcançada com o uso dos biocatalisadores. Em muitos casos, a redução de aldeídos e cetonas representa a etapa chave na obtenção de inúmeros intermediários ou produtos finais de interesse econômico. Assim, muitos álcoois obtidos através de biorredução de cetonas pró-quirais, são utilizados como intermediários na síntese de importantes fármacos (**Fig. 9**) (BARBIERI et al., 2001; ARAÚJO, 2006).

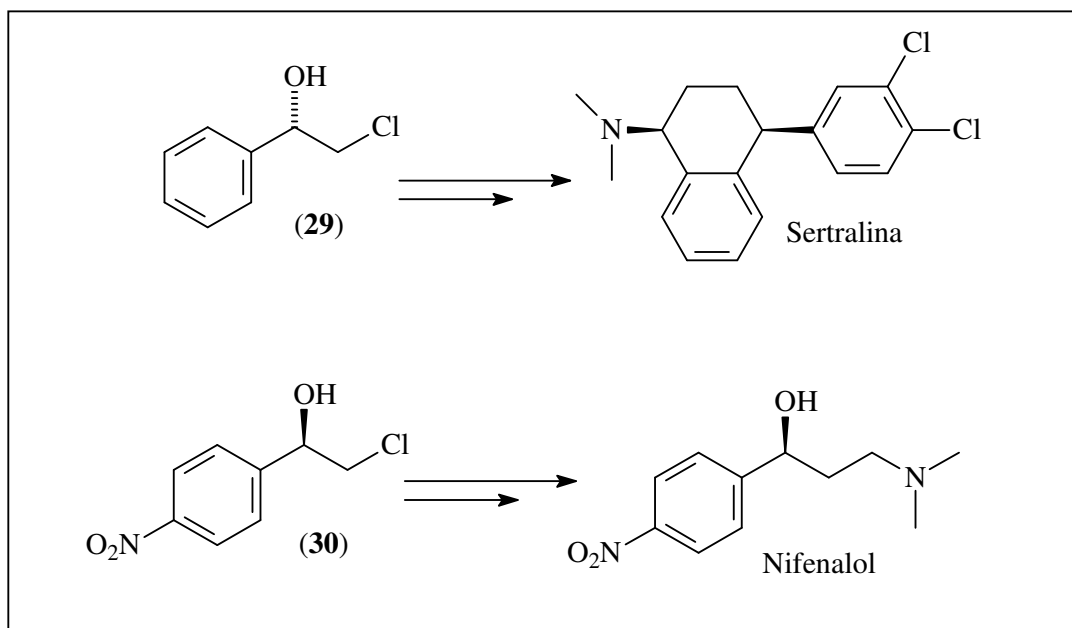


Figura 9: Exemplos de álcoois quirais obtidos por biorredução utilizados na síntese de fármacos

Os álcoois **29** e **30** são obtidos com elevados rendimentos (98 e 99%, respectivamente) e excessos enantioméricos (98 e 99%, respectivamente) através da biorredução de suas respectivas cetonas pró-quirais utilizando microorganismos e são utilizados como intermediários na síntese dos fármacos sertralina e nifenalol (**Fig. 9**).

As enzimas responsáveis pelas reduções de aldeídos e cetonas, e algumas vezes de ligações duplas carbono-carbono, são classificadas em três grupos: desidrogenases, oxigenases, e

oxidases. As desidrogenases podem substituir o boridreto de sódio (NaBH_4) na redução de aldeídos e cetonas, entretanto, requerem cofatores como NADH ou NADPH, que tem alto custo. Como esses cofatores devem ser utilizados em grandes quantidades, sua reciclagem torna-se uma exigência. Um sistema clássico de regeneração de cofator consiste na utilização de formiato desidrogenase (FDH) e formiato como doador de hidrogênio (**Fig. 10**). Nesse processo, há formação do inócuo CO_2 como co-produto, assegurando a irreversibilidade do sistema (ARAÚJO, 2006).

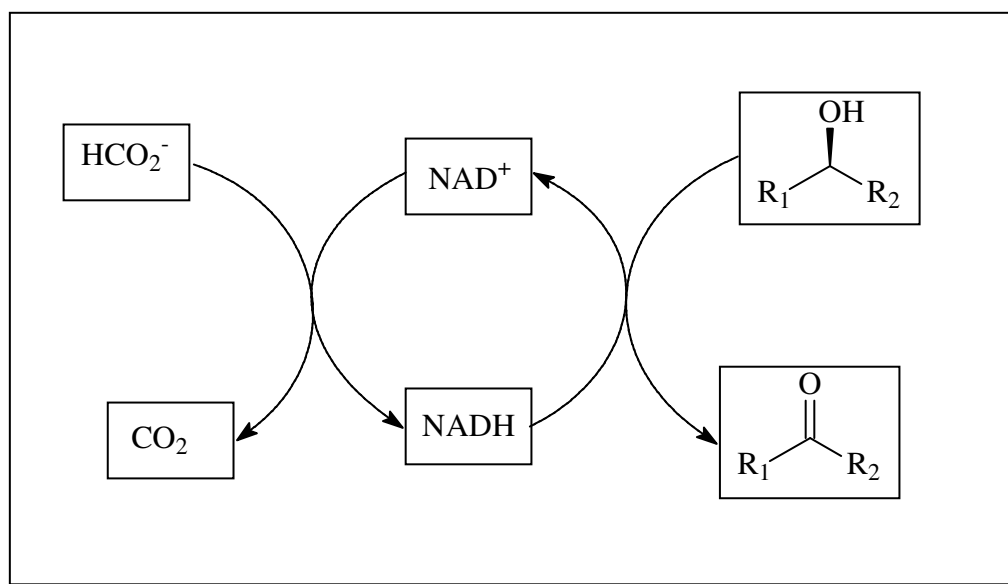


Figura 10: Sistema de reciclagem do cofator NADH

Em 1964, Prelog observou que a estereosseletividade na biorredução de cetonas dependia do tamanho dos grupamentos ligados ao carbono carbonílico (YADAV et al., 2002). Segundo essa regra, a enzima doa hidreto, preferencialmente, pelo lado do grupo menos volumoso (*face re*), gerando, majoritariamente, o álcool de configuração S (**Fig. 11, p. 31**).

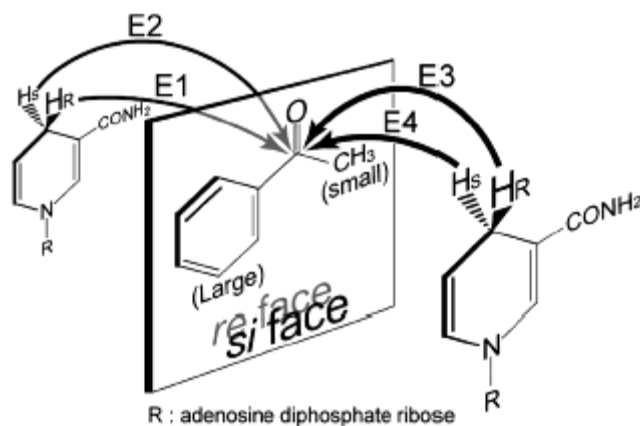


Figura 11: Representação esquemática da regra de Prelog

Embora a regra de Prelog estabeleça que a face *re* da carbonila seja a preferida, algumas enzimas não obedecem a essa regra, atuando pela face *si* e gerando produtos de configuração *R* majoritariamente (anti-Prelog).

Uma pesquisa bibliográfica realizada no Scifinder utilizando “bioreduction” como palavra chave, possibilitou a seleção de mais de setenta publicações entre os anos de 1998 e 2008. Abaixo, estão descritos alguns dos artigos mais relevantes para o nosso trabalho, destacando dados como rendimentos e excessos enantioméricos (ee), entre outras informações importantes.

Em 1998, Takemoto e Achiwa utilizaram células imobilizadas a partir de culturas de células da espécie vegetal *Catharantus roseus* para reduzir a 1-piridin-4-iletanona ao seu álcool 1-piridin-4-iletanol (**Esq. 11**). A reação foi analisada observando-se os parâmetros tempo, rendimentos, excessos enantioméricos e configuração dos álcoois obtidos, estando os resultados destacados na **Tabela 3 (p. 32)**.

Esquema 11

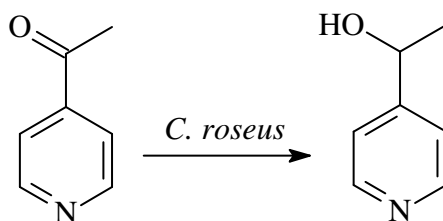


Tabela 3 : Resultados obtidos para biorredução de 1-piridinil-4-etanona com *C. roseus*

t (dias)	Rend. (%)	ee (%)
2	97	87 (<i>S</i>)
5	99	61 (<i>S</i>)
7	99	49 (<i>S</i>)
8	100	46 (<i>S</i>)
12	100	21 (<i>R</i>)
13	98	20 (<i>R</i>)
14	91	78 (<i>R</i>)
15	91	80 (<i>R</i>)

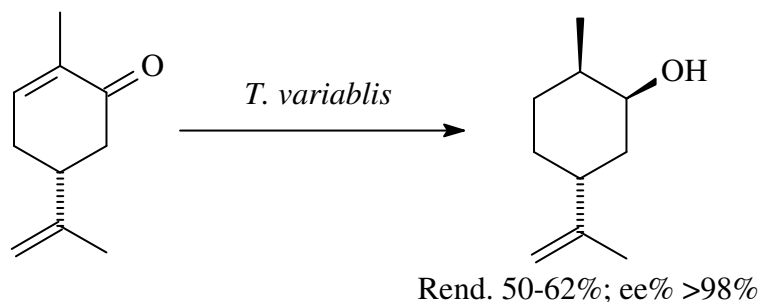
Surpreendentemente, embora os rendimentos permaneçam praticamente os mesmos, foi observado uma redução significativa no excesso enantiomérico do isômero *S* após dois dias de reação. A partir do oitavo dia o excesso do isômero *S* foi invertido para *R*. Essa característica apresentada por *C. roseus* levou os autores a utilizá-la, também, no processo de desracemização da mistura racêmica do 1-piridin-4-iletanol (**Tab. 4**).

Tabela 4: Desracemização de 1-piridinil-4-etanol por *C. roseus*

t (dias)	ee (%)
2	98 (<i>S</i>)
5	87 (<i>S</i>)
7	37 (<i>R</i>)
8	80 (<i>R</i>)

Vari et al. (1998) utilizaram o microorganismo *Trigonopsis variabilis* ATCC 10679 na biorredução de uma cetona α,β -insaturada (carvona), numa das etapas de síntese de uma substância com elevada atividade antitumoral isolada de fungos (**Esq. 12, p. 33**).

Esquema 12



Chartrain *et al.* (1999) estudaram o potencial biorredutor de uma série de microorganismos para obtenção do álcool quiral (*R*)-*N*-(2-hidroxi-2-piridin-3-il-etil)-2-(4-nitrofenil)-acetamida, a partir da cetona 2-(4-nitro-fenil)-*N*-(2-oxo-2-piridin-3-il-etil)-acetamida (**Esq. 13**). Os resultados obtidos (**Tab. 5**), permitiram selecionar o microorganismo *Cândida sorbophila* MY1833 para ser utilizado na produção do álcool em grande escala.

Esquema 13

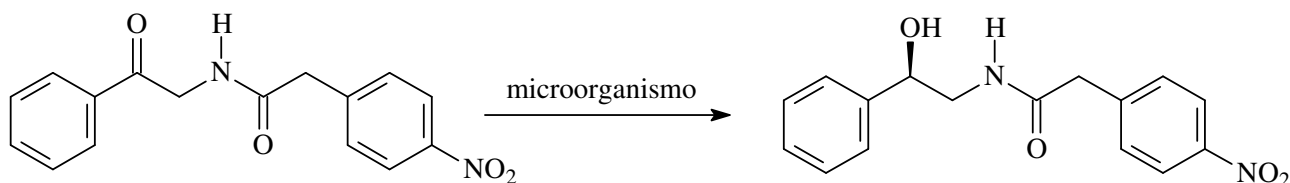


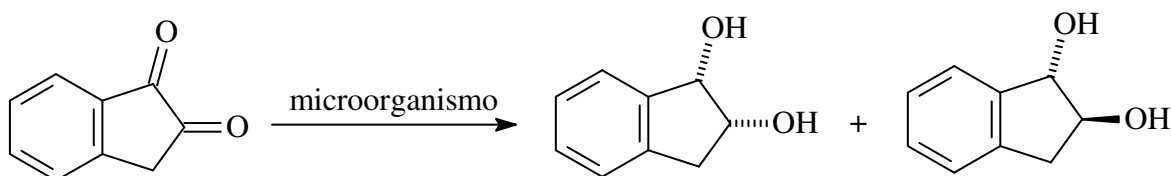
Tabela 5: Resultados das biorreduções da 2-(4-nitro-fenil)-*N*-(2-oxo-2-piridin-3-il-etil)-acetamida com vários microorganismos

Microorganismo	MY	Rend. (%)	ee (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1423	68	80 (<i>R</i>)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1451	51	70 (<i>R</i>)
<i>Khyveromyces delphensis</i>	1476	48	>96 (<i>R</i>)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1488	93	6 (<i>R</i>)
<i>Hansenula fabianl</i>	1496	48	66 (<i>R</i>)
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	1552	32	52 (<i>R</i>)
<i>Hansenula wingei</i>	1565	16	22 (<i>S</i>)
<i>Pichia delftensis</i>	1569	12	24 (<i>R</i>)
<i>Rhodosporium toruloides</i>	1645	13	72 (<i>R</i>)

<i>Cândida sorbophila</i>	1833	85	>96 (R)
<i>Saccharomyces bayanus</i>	1930	68	80 (R)
<i>Saccharomyces daivensis</i>	1937	19	>90 (R)
<i>Khyveromyces marxianus</i>	1515	9	90 (R)
<i>Pichia amethionina</i>	1579	27	72 (R)

Stahl et al. (1999) avaliaram o processo de dirredução da 1,2-indanediona aos correspondentes dialcoois cis-(1*S*, 2*R*) indanediol e trans-(1*S*, 2*S*) indanediol (**Esq. 14**). O objetivo dos autores era a obtenção de cis-(1*S*, 2*R*) indanediol, um precursor em potencial do Crixivan® (indinavir), um potente agente anti-HIV.

Esquema 14



Foram testados 32 microorganismos, onde somente 17 catalisaram a dirredução de 1,2-indanediona aos diálcoois. Na **Tabela 6** encontram-se os resultados dos 7 microorganismos que produziram os dialcoois com os melhores excessos enantioméricos.

Tabela 6: Excessos enantioméricos dos produtos da biorredução de 1,2-indanediona com microorganismos

Microorganismo	MY	Produto	ee (%)
<i>Arxiozyma telluris</i>	1927	<i>cis</i>	89
<i>Hansenula polymorpha</i>	1422	<i>cis</i>	88
<i>Trichosporon cutaneum</i>	1506	<i>cis</i>	88
<i>Candida kefir</i>	1717	<i>cis</i>	93
<i>Debaryomyces vanryi</i>	1908	<i>cis</i>	61
<i>Candida magnoliae</i>	1785	<i>trans</i>	>99
<i>Sporidiobolus johnsonsonli</i>	1673	<i>trans</i>	>99

Baseados nesses excessos enantioméricos, as cepas MY 1927, 1422, 1506 e 1717 foram reavaliadas em escala preparativa, sendo MY 1506 (*Trichosporon cutaneum*) aquela que apresentou melhor resultado (rendimento de 99,1% com ee >99%).

Quirós et al. (1999) utilizaram cepas de fungos (*Mortierella isabellina* NRRL 1757 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159) na biorredução enantiosseletiva de derivados da 2-oxociclopentanocarboxamidas (**Esq. 15**). Excelentes rendimentos de conversão (85-100%) e excessos enantioméricos (98-99%) (**Tab. 7**) foram conseguidos. Além do microorganismo, os autores variaram também o substituinte do nitrogênio amídico e o tempo de reação, sendo os resultados mais satisfatórios obtidos com o fungo *M. isabellina*.

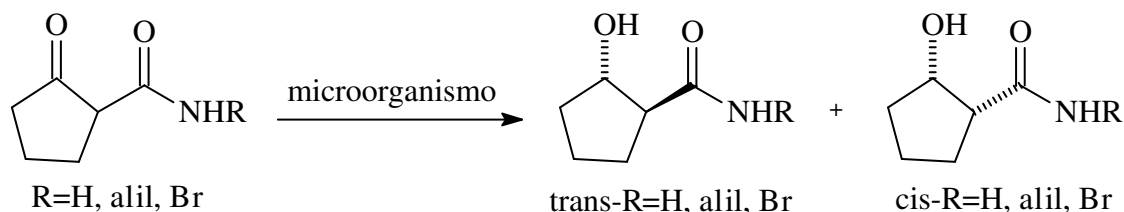
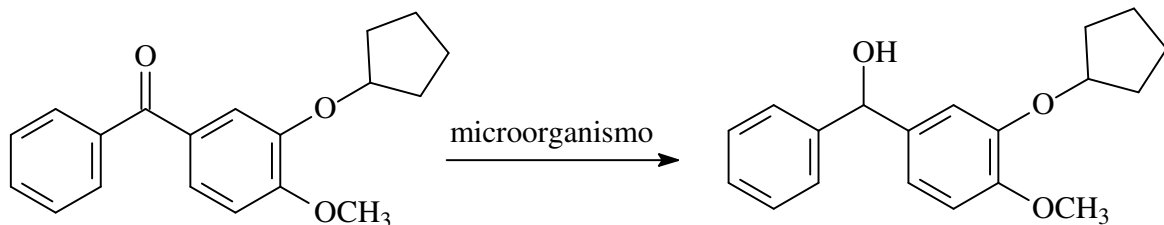
Esquema 15

Tabela 7 : Resultados da biorredução de derivados da 2-oxociclopentanocarboxamidas com fungos

Substrato R	Microorganismo	t (h)	Conv. (%)	Razão <i>trans/cis</i>	ee (%)	
					<i>trans</i>	<i>cis</i>
H	<i>M. isabellina</i>	120	85	70:30	>99	47
H	<i>M. isabellina</i>	96	92	72:28	>99	49
H	<i>B. bassiana</i>	120	97	2:98	-	51
alil	<i>M. isabellina</i>	96	95	14:86	98	>98
Br	<i>M. isabellina</i>	24	100	4:96	>99	>99

Chartrain et al. (2000) testaram 310 cepas microbianas na biorredução de uma diaril cetona ao seu correspondente diaril álcool (**Esq. 16, p. 36**), importante intermediário quiral na síntese de uma droga muito utilizada no tratamento da asma.

Esquema 16



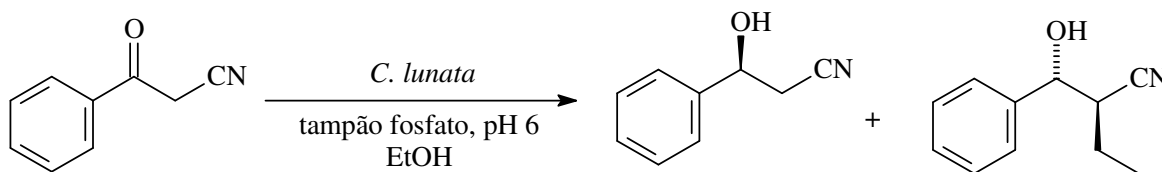
Foram selecionadas oito cepas, considerando rendimentos e excessos enantioméricos (**Tab. 8**). O microorganismo *Rhodotorula pilimanae* ATCC 32762 (rendimento 10% e ee 96%) foi aquele que apresentou melhores resultados, sendo escolhido para produção do diastereomérico álcool em escala preparativa. Provavelmente, os autores estavam interessados no isômero *S* de mais elevado excesso enantiomérico.

Tabela 8 : Biorredução assimétrica da diaril cetona utilizando microorganismos

microorganismo	Conv. (%)	ee (%)
<i>Aspergillus nidulans</i> MF 121	8	96 (<i>S</i>)
<i>Aspergillus nidulans</i> MF 145	30	86 (<i>S</i>)
<i>Bullera tsugae</i> MY 1669	11	93 (<i>S</i>)
<i>Hansenula holstii</i> MY 1538	3	100 (<i>R</i>)
<i>Mucor sulfa</i> MF37	4	95 (<i>S</i>)
<i>Rhodotorula pilimanae</i> ATCC 32762	10	96 (<i>S</i>)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MY 1690	3	13 (<i>R</i>)
Fungos não identificados HB 920750	4	54 (<i>S</i>)

Dehli e Gotor (2000) estudaram a biorredução de β -ceto-nitrilas pelo fungo *Curvularia lunata*, sendo os produtos desta reação importantes blocos em síntese assimétrica e química medicinal. Inicialmente, os autores testaram a 3-oxo-3-fenilpropanonitrila, em solução etanólica, na biorredução com o referido fungo, obtendo (*S*)-3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila com ee 88% e um produto indesejado (2*R*, 1'*R*)-2-(1-hidroxi-1-fenilmetil)-butanonitrila (**Esq. 17, p. 37**).

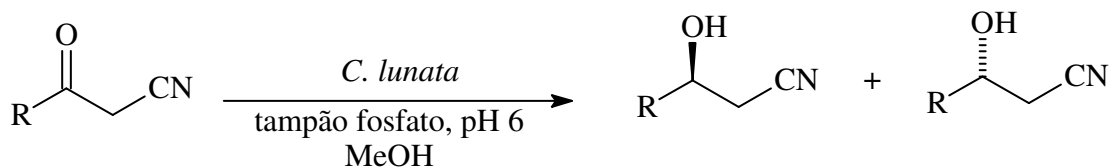
Esquema 17



Tentando eliminar o produto etilado, os autores substituíram o etanol pela N,N-dimetilformamida (DMF) como solvente, uma vez que pensavam que o grupo etila era oriundo do etanol. Mesmo assim, (2*R*, 1'*R*)-2-(1-hidroxi-1-fenilmetil)-butanonitrila (~20%) continuou a ser formado sugerindo que a introdução do grupo etila não se deve apenas ao etanol utilizado como co-solvente, mas também por aquele produzido pelo próprio fungo. Surpreendentemente, quando metanol foi testado (2*R*, 1'*R*)-2-(1-hidroxi-1-fenilmetil)-butanonitrila não foi formado e, (*S*)-3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila obtido com 55% de conversão e 96% de ee.

Encorajados por esses resultados, os autores testaram outros derivados de β-ceto-nitrilas (**Esq. 18**), com os resultados exibidos na **Tabela 9**.

Esquema 18

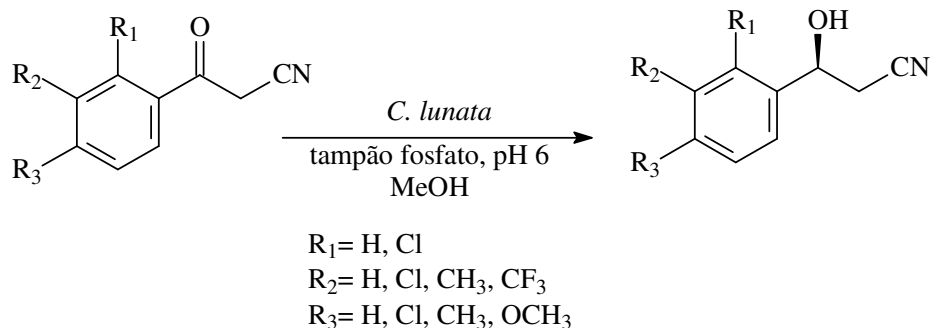


R= fenil, 2-furil, t-butil, ciclohexil, metil

Tabela 9 : Produtos obtidos da biorredução de β-ceto-nitrilas por *Curvularia lunata*

R	Rend. (%)	ee (%)
fenil	55	96 (<i>S</i>)
2-furil	55	92 (<i>S</i>)
t-butil	71	83 (<i>S</i>)
ciclohexil	77	88 (<i>S</i>)
metil	65	40 (<i>S</i>)

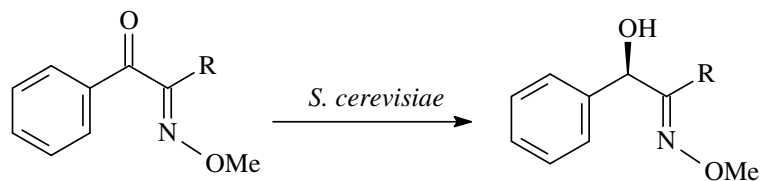
Considerando que os melhores resultados estereoquímicos (**Tab. 10**) foram obtidos com a β -ceto-nitrila aromática (3-oxo-3-fenilpropanonitrila), os autores testaram outros derivados aromáticos com diferentes padrões de substituição (**Esq. 19**).

Esquema 19**Tabela 10:** Produtos obtidos da biorredução de β -ceto-nitrilas aromáticas com *Curvularia lunata*

R_1	R_2	R_3	Conv. (%)	ee (%)
Cl	H	H	42	98 (S)
H	Cl	H	57	97 (S)
H	H	Cl	47	50 (S)
H	Cl	Cl	43	92 (S)
H	CH ₃	H	59	94 (S)
H	H	CH ₃	54	82 (S)
H	CF ₃	H	41	98 (S)
H	H	OCH ₃	42	83 (S)

Kreutz et al. (2000) utilizaram fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) na biorredução enantiosseletiva da carbonila cetônica do fenilglioxal e de alguns de seus derivados alquilados (**Esq. 20, p. 39**), importantes intermediários na síntese de análogos da norefedrina (droga que age no sistema nervoso central). A reação de redução enantiosseletiva da carbonila cetônica representa a etapa chave na síntese desta droga.

Esquema 20



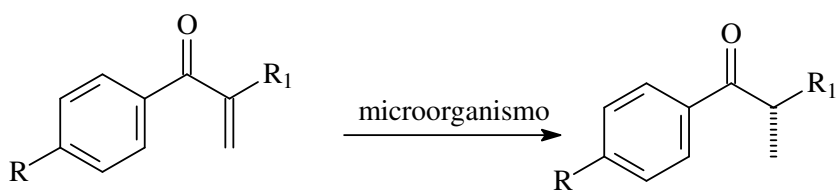
R= H, metil, etil, n-propil, n-butil

Tabela 11: Biorredução do fenilgloxal e de alguns de seus derivados alquilados por *Saccharomyces cerevisiae*

R	t (h)	Rend. (%)	ee (%)
H	6	14	65 (<i>R</i>)
metil	24	75	88-97 (<i>R</i>)
etil	48	73	92 (<i>R</i>)
n-propil	72	52	98 (<i>R</i>)
n-butil	72	48	>99 (<i>R</i>)

Mancilha et al. (2001) promoveram a biorredução quimio e enantiosseletiva de α -metilenocetonas (**Esq. 21**) utilizando diferentes microorganismos [(*Rhizopus arrizus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado (IMBY)] (**Tab. 12, p. 40**).

Esquema 21



R= H, OCH₃

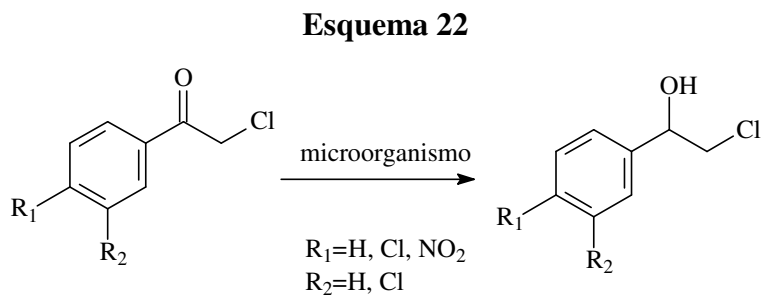
R₁= CH₃, CH₂CH₃, CH₂CO₂CH₃, CH₃CO₂H

Tabela 12: Redução de α -metilenocetonas com microorganismos

R	R ₁	Microorganismo	t (h)	Rend. (%)	ee (%)
		IMBY	12	76	-
H	CH ₃	<i>R. arrizus</i>	24	65	-
		<i>P. fluorescens</i>	24	90	-
H	CH ₂ CH ₃	IMBY	12	67	93
		<i>R. arrizus</i>	24	76	43
		<i>P. fluorescens</i>	24	79	99
H	CH ₂ CO ₂ CH ₃	IMBY	12	59	12
		<i>R. arrizus</i>	24	69	25
H	CH ₂ CO ₂ H	<i>P. fluorescens</i>	24	73	99
		IMBY	17	-	-
OCH ₃	CH ₂ CO ₂ CH ₃	IMBY	17	65	85
		<i>R. arrizus</i>	24	56	35
		<i>P. fluorescens</i>	24	69	99

O microorganismo que apresentou os melhores resultados (rendimentos 69-90% e ee 99%) foi *Pseudomonas fluorescens*.

Barbieri et al. (2001) utilizaram 22 microorganismos (células inteiras) na biorredução enantiosseletiva de acetofenonas (**Esq. 22**). Estas cetonas foram reduzidas aos seus respectivos álcoois cloro-benzila, em ambas as configurações (**Tab. 13, p. 41**). Os álcoois 2-cloro-1(*S*)-(3,4-dicloro-fenil)-etanol e 2-cloro-1(*R*)-(4-nitro-fenil)-etanol são importantes intermediários na síntese das drogas sertralina e nefenadol.



Em paralelo, os autores também testaram o potencial redutor dos mesmos microorganismos frente uma cetona bifênica (**Esq. 23, p. 41**), que pode ser obtida a partir de 2-cloro-1(*S*)-(3,4-dicloro-fenil)-etanol.

Esquema 23

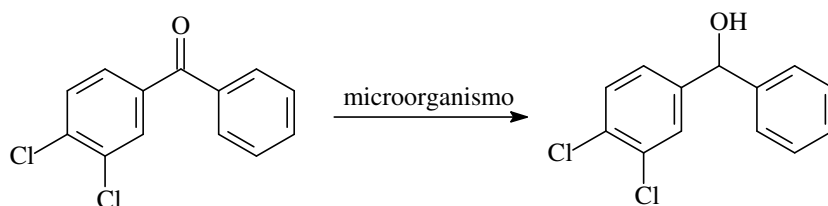


Tabela 13: Biorredução de acetofenonas cloradas e de uma bifênica por microorganismos com concentração inicial de 1g/L

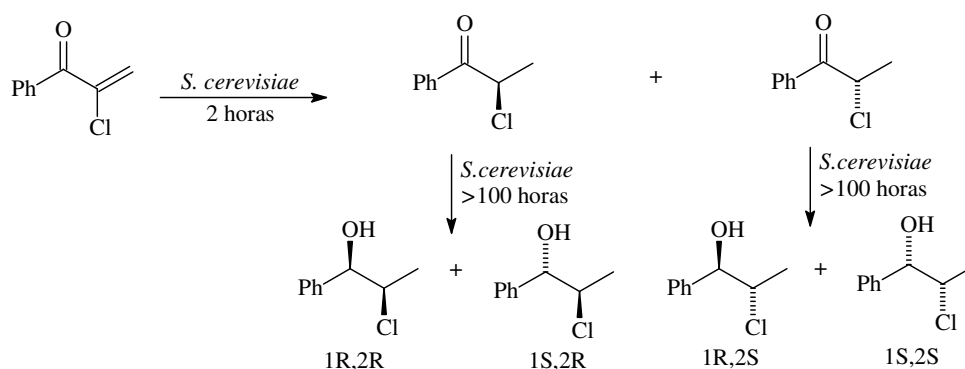
Microorganismo	Substratos											
	R ₁ =R ₂ =H			R ₁ =R ₂ =Cl			R ₁ =NO ₂ ; R ₂ =H			bifênica		
	(i)	(ii)	(iii)	(i)	(ii)	(iii)	(i)	(ii)	(iii)	(i)	(ii)	(iii)
<i>P. membranaef.</i> CBS107	0	-	-	0	-	nd	0	-	-	0	-	-
<i>D. hansenii.</i> CBS116	0	-	-	11	nd	nd	0	-	-	0	-	-
<i>Z. rouxii</i> ATCC2623	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
<i>B. bassiana</i> ATCC7159	58	82	S	41	87	S	70	92	S	0	-	-
<i>M. subtilissimus</i>	99	96	R	78	82	R	99	91	R	0	-	-
<i>P. chrysosporium</i>	41	nd	nd	0	-	-	0	-	-	0	-	-
<i>A. niger</i> IPV283	90	78	S	50	89	S	29	nd	nd	0	-	-
<i>C. lunata</i> CBS215.54	25	nd	nd	0	-	-	0	-	-	0	-	-
<i>G. candidum</i> CBS233.76	99	85	S	95	93	S	99	97	S	0	-	-
<i>S. cerevisiae</i> (não identif.)	95	41	R	99	41	R	12	nd	nd	0	-	-
<i>R. glutinis</i> CBS20	15	nd	nd	11	nd	nd	13	nd	nd	0	-	-
<i>Y. lipolytica</i> CBS6317	87	71	S	85	92	S	99	95	S	3	nd	nd
<i>R. mucillagin.</i> CBS2378	60	98	R	88	99	R	49	92	R	28	53	nd
<i>P. subpellicul.</i> CBS5767	32	nd	nd	26	nd	nd	6	nd	nd	0	-	-
<i>F. caucasic.</i> CBS580.78	70	53	S	61	nd	nd	99	97	S	0	-	-
<i>A. niveus</i> CBS114.33	40	nd	nd	66	nd	nd	47	nd	nd	1	nd	nd
<i>C. lyopolytica</i> CBS2074	24	nd	nd	13	nd	nd	12	nd	nd	0	-	-
<i>P. ohmeri</i> CBS5367	19	nd	nd	14	nd	nd	8	nd	nd	0	-	-
<i>K. saturnus</i> CBS5761	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
<i>H. anomala</i> CBS110	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
<i>P. stipitis</i> CBS5773	15	nd	nd	-	-	-	14	nd	nd	0	-	-
<i>P. pastoris</i> CBS704	31	nd	nd	10	nd	nd	17	nd	nd	0	-	-

(i) conversão; (ii) excesso enantiomérico; (iii) configuração absoluta; (nd) não determinado

Todos os microorganismos, exceto *R. mucillaginosa* (168 horas de reação), foram submetidos a um tempo de reação de 48 horas e temperatura de 28°C.

Filho, Rodrigues e Moran (2001) analisaram o potencial biorredutor de *Saccharomyces cerevisiae* frente a 2-cloro-1-fenil-2-propen-1-ona (**Esq. 24**), objetivando a obtenção de halohidrinas quirais. Estas últimas podem ser facilmente convertidas a epóxidos quirais, importantes blocos na síntese de moléculas biologicamente ativas.

Esquema 24



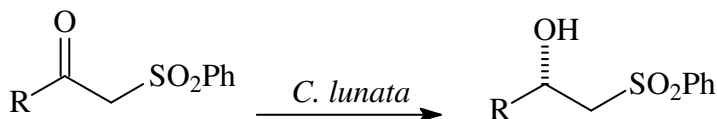
Vários parâmetros foram testados, tais como quantidade do microorganismo e do substrato, meio de cultura e adição de álcool alílico como aditivo (**Tab. 14**).

Tabela 14: Rendimentos de conversão na redução da 2-cloro-1-fenil-2-propen-1-ona com *S. cerevisiae* e composição dos estereoisômeros obtidos

<i>S. cerevisiae</i> seca (g) ^a	Substrato (mmol)	Sacarose (g)	Álcool alílico (mL)	1R,2R (%)	1S,2R (%)	1R,2S (%)	1S,2S (%)	Conv. (%)
100	4,62	50	-	44	13	38	5	51
100	4,62	-	-	41	16	40	3	78
100	6,00	50	1,00	50	12	35	3	56
100	6,00	-	1,00	53	8	36	3	34
40 ^b	1,80	-	0,40	-	-	-	-	-
20 ^c	1,20	20	-	29	25	44	2	60

^a 250 mL de água; ^b *S. Cerevisiae* pré-tratada por 30 min a 50 °C, ^c tampão citrato pH 4,0

Gotor, Rebolledo e Liz (2001) utilizaram o fungo *Curcularia lunata* CECT 2130 na biorredução enantiosseletiva de β -ceto sulfonas (**Esq. 25**). Elevados rendimentos e excessos enantioméricos foram obtidos (**Tab. 15**).

Esquema 25

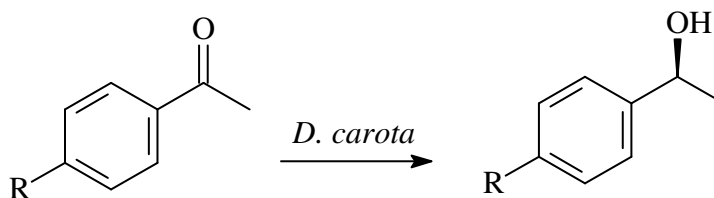
R=2-furil, fenil, n-C₅H₁₁

Tabela 15: Redução enantiosseletiva de β -ceto sulfonas

R	t (h)	Rend. (%)	ee (%)
2-furil	7	91	97 (S)
fenil	10	90	87 (S)
n-C ₅ H ₁₁	7	92	92 (S)
2-furil ^a	8	91	97 (S)
2-furil	24	89	97 (S)

^a células recicladas de uma reação

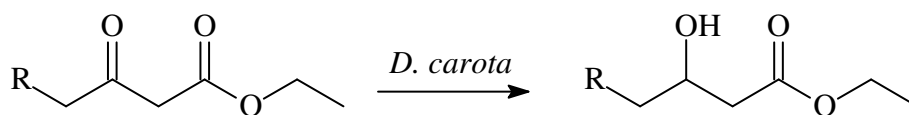
Yadav et al. (2002) realizaram um extenso estudo sobre a biorredução de uma série de cetonas (acetofenonas, α -azido-aryl-cetonas, β -ceto ésteres, cetonas cíclicas e cetonas de cadeia aberta) utilizando a espécie vegetal *Daucus carota* (cenoura) como biocatalisador (**Esq. 26-29**). Foram obtidos altos rendimentos de conversão e excelentes excessos enantioméricos (**Tab. 16-19, p. 44-45**) sendo alguns desses resultados relacionados abaixo.

Esquema 26

R=H, Cl, Br, F, NO₂, CH₃, OCH₃, OH

Tabela 16: Redução de acetofenonas com *D. carota*

R	t (h)	Rend. (%)	ee (%)
H	40	73	92 (S)
Cl	42	76	95 (S)
Br	48	61	95 (S)
F	41	80	90 (S)
NO ₂	40	82	96 (S)
CH ₃	50	75	92 (S)
OCH ₃	45	72	94 (S)
OH	47	73	91 (S)

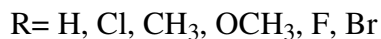
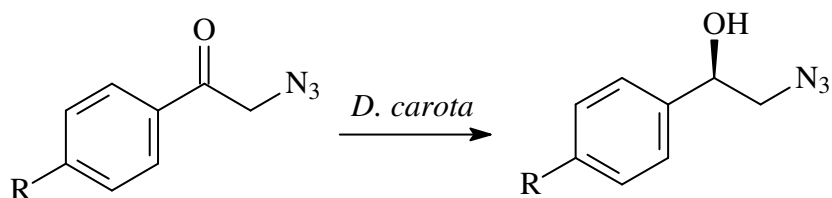
Esquema 27

R=H, Cl, Br, N₃, PhSO₂

Tabela 17: Redução de β-ceto ésteres com *D. carota*

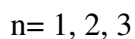
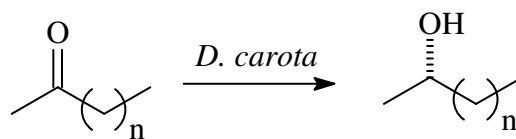
R	t (h)	Rend. (%)	ee (%)
H	58	58	95 (S)
Cl	60	50	90 (S)
Br	62	53	95 (S)
N ₃	65	68	90 (R)
PhSO ₂	66	70	98 (R)

Esquema 28

Tabela 18: Redução de α -azido-aryl-cetonas com *D. carota*

R	t (h)	Rend. (%)	ee (%)
H	42	70	100 (<i>R</i>)
Cl	40	72	98 (<i>R</i>)
CH ₃	58	71	98 (<i>R</i>)
OCH ₃	78	58	99 (<i>R</i>)
F	60	65	95 (<i>R</i>)
Br	66	77	97 (<i>R</i>)

Esquema 29

Tabela 19: Redução de cetonas de cadeia aberta com *D. carota*

n	t (h)	Rend. (%)	ee (%)
1	80	58	87 (<i>S</i>)
2	88	49	82 (<i>S</i>)
3	85	50	90 (<i>S</i>)

Os autores também realizaram reduções em escala preparativa (1g de substrato), onde obtiveram excelentes resultados (Tab. 20, p. 46) demonstrando o elevado potencial redutor deste vegetal.

Tabela 20: Redução de cetonas com *D. carota* em escala preparativa

Produto	Rendimento isolado (%)	Substrato/ <i>D. carota</i> (m/m)	ee (%)
acetofenona	75	1/100	90 (<i>S</i>)
acetoacetato de etila	65	1/100	92 (<i>S</i>)
2-azido-1-feniletanona	40	1/100	94 (<i>R</i>)
2-hexanona	25	1/100	90 (<i>R</i>)

Dehli e Gotor (2002a e 2002b) publicaram dois trabalhos sobre a biorredução de 1-metil-2-oxocicloalcanocarbonitrilas e 2-oxocicloalcanocarbonitrilas visando a obtenção de γ -amino álcoois opticamente ativos (**Esq. 30, p. 47**). No primeiro (2002a), em escala preparativa, os autores utilizaram o fungo *Mortierella isabellina* NRRL 1757 na redução das misturas racêmicas de 1-metil-2-oxociclopentanocarbonitrila e 1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila, obtendo os diastereoisômeros (1*R*,2*R*)-2-hidroxi-1-metil-2-oxociclopentanocarbonitrila, (1*R*,2*S*)-2-hidroxi-1-metil-2-oxociclopentanocarbonitrila e (1*R*,2*R*)-2-hidroxi-1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila, (1*R*,2*S*)-2-hidroxi-1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila, respectivamente, em rendimentos moderados (34-58%) e excessos enantioméricos de moderados a elevados (61-99%), em ambos os casos (**Tab. 21, p. 47**). No mesmo trabalho, os autores estudaram ainda a biorredução das cetonas enantiomericamente puras (*R*)-1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila e (*S*)-1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila catalisada pelo mesmo fungo. Para (*R*)-1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila foram obtidas a mistura de (1*R*,2*S*)-2-hidroxi-1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila com (1*R*,2*S*)-2-hidroxi-1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila (**Esq. 30, p. 47**) numa proporção 85/15 e, para (*S*)-1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila uma total diastereosseletividade foi observada, com formação apenas de (1*S*,2*S*)-2-hidroxi-1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila.

Esquema 30

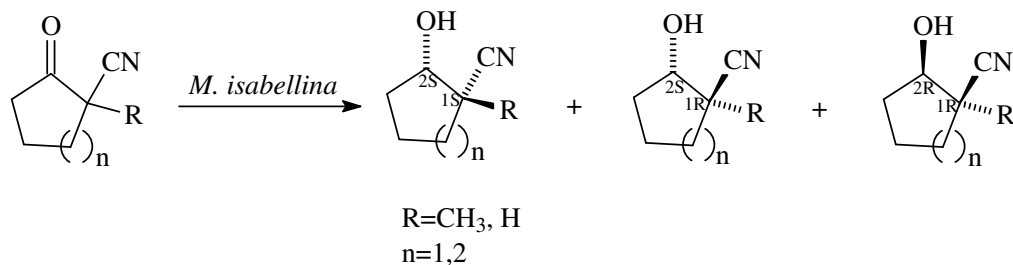


Tabela 21: Redução de (±)1-metil-2-oxociclopentanocarbonitrila (n=1) e (±)1-metil-2-oxociclohexantanocarbonitrila (n=2) por *M. isabellina* em escala preparativa (1g de substrato)

R	n	Rend. (%)	ee (%)	Conf. absoluta
CH ₃	1	58	61	1i, 2S
CH ₃	1	34	>99	1S,2R
CH ₃	2	54	73	1S,2S
CH ₃	2	38	>99	1S,2R

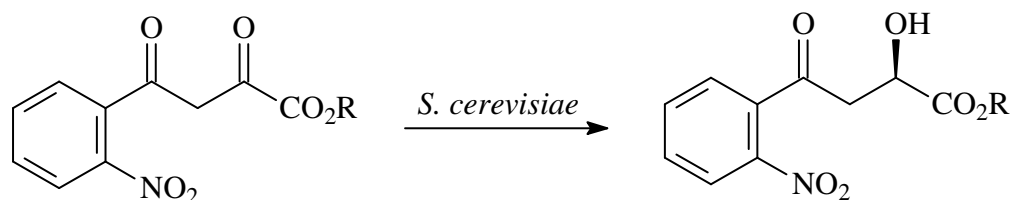
No segundo trabalho (2002b), Dehli e Gotor promoveram a biorredução, em escala analítica, de 2-oxociclopentanocarbonitrila e 2-oxociclohexantanocarbonitrila (compostos que apresentam um hidrogênio α -carbonílico bastante ácido, levando a uma racemização natural) (**Esq. 30**) por uma série de microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces montanus* NRRL 6772, *Curlvularia lunata* CECT 2130, *Mortierella isabellina* NRRL 1757 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159), obtendo os produtos enantiômeros em suas formas puras (1*S*,2*S*)-2-hidroxi-ciclopentanocarbonitrila, (1*R*,2*S*)-2-hidroxi-ciclopentanocarbonitrila, (1*S*,2*S*)-2-hidroxi-ciclohexanocarbonitrila e (1*R*,2*S*)-2-hidroxi-ciclohexanocarbonitrila (**Tab. 22, p. 48**).

Tabela 22: Biorredução de (\pm)2-oxociclopentanocarbonitrila (n=1) e (\pm)2-oxociclohexantanocarbonitrila (n=2) por microorganismos em escala analítica

R	n	Microorganismo	Razão a/b	ee (%) ^a	Conf. absoluta
		<i>S. cerevisiae</i>	95/5	90	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>
		<i>S. montanus</i> NRRL 6772	96/4	93	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>
H	1	<i>C. lunata</i> CECT 2130	53/47	41	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>
		<i>M. isabellina</i> NRRL 1757	65/35	48	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>
		<i>B. bassiana</i> ATCC 7159	50/50	21	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>
		<i>S. cerevisiae</i>	87/13	65	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>
		<i>S. montanus</i> NRRL 6772	95/5	87	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>
H	2	<i>C. lunata</i> CECT 2130	70/30	17	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>
		<i>M. isabellina</i> NRRL 1757	71/29	71	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>
		<i>B. bassiana</i> ATCC 7159	30/70	72	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>

^a excesso enantiomérico do (1*S*,2*S*)-2-hidroxi-ciclopentanocarbonitrila ou (1*S*,2*S*)-2-hidroxi-ciclohexanocarbonitrila.

Em 2003, Chang e Yang utilizaram fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) na biorredução regio- e enantiosseletiva do grupo carbonila C-2 de ésteres do ácido 4-(2-nitrofenil)-2,4-dioxobutírico (**Esq. 31**), na presença do aditivo cloreto de fenacila. Os produtos obtidos (**Tab. 23, p. 49**) são importantes intermediários na síntese de um potente hipertensivo (Benazepril-HCl).

Esquema 31

R= C₂H₅, CH₃, n-C₄H₉

Tabela 23: Biorredução de ésteres α,γ -dioxo-ésteres por *S. cerevisiae*

R	Tempo de pré-incubação (h)	Cloreto de fenacila (mmol)	Conv. (%)	Rend. (%)	ee (%)
C ₂ H ₅	-	6,4	95	75	72 (R)
C ₂ H ₅	2	6,4	100	85	80 (R)
C ₂ H ₅	4	6,4	100	82	78 (R)
C ₂ H ₅	6	6,4	93	74	74 (R)
C ₂ H ₅	2	3,2	95	80	73 (R)
C ₂ H ₅	2	1,6	91	77	71 (R)
C ₂ H ₅	2	-	70	57	70 (R)
CH ₃	2	6,4	100	75	53 (R)
n- C ₄ H ₉	2	6,4	70	48	70 (R)

Fardelone, Rodrigues e Moran (2003) utilizaram os microorganismos *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 e *Geotrichum candidum* CCT 1205 na biorredução de α -haloacetofenonas (**Esq. 32**) para geração das correspondentes halohidrina (halo=Cl, Br e I) oticamente ativas, em elevados rendimentos químicos (89-99%) e excessos enantioméricos (92-99%) (**Tab. 24, p. 50**). Essas halohidrininas são potenciais blocos quirais na síntese estereosseletiva de importantes compostos. As biorreduções mediadas por *R. glutinis* e *G. candidum* forneceram as halohidrininas com configuração *R* e *S*, respectivamente.

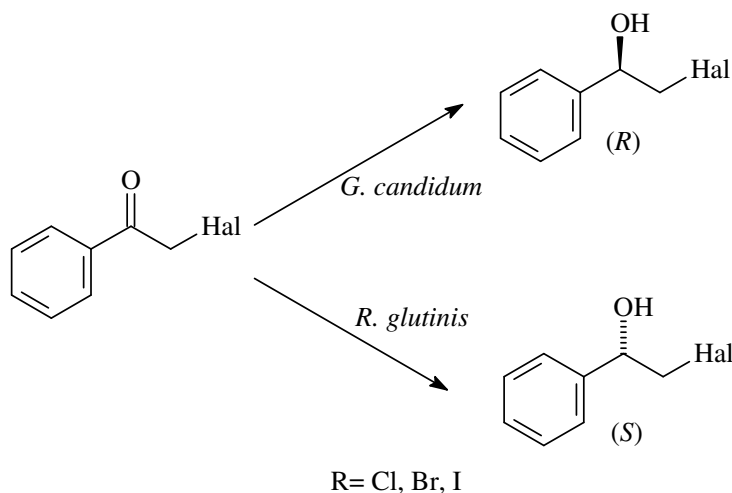
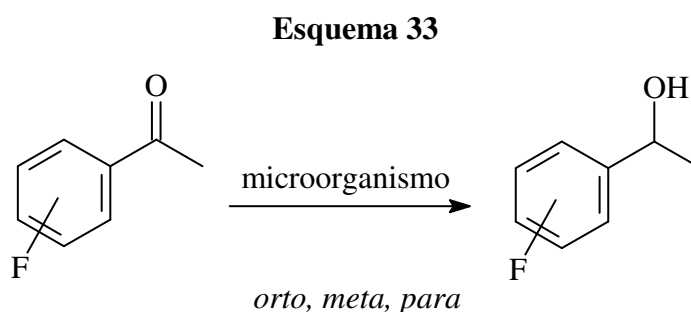
Esquema 32

Tabela 24: Biorredução de α -haloacetofenonas por *R. glutinis* CCT 2182 e *G. candidum* CCT 1205

Microorganismo	Hal	T (°C)	t (h)	Rend. (%)	ee (%)
<i>R. glutinis</i>	Cl	30	98	18	92 (<i>R</i>)
<i>G. candidum</i>	Cl	28	89	18	>99 (<i>S</i>)
<i>R. glutinis</i>	Br	30	97	18	>99 (<i>R</i>)
<i>G. candidum</i>	Br	28	99	18	90(<i>S</i>)
<i>R. glutinis</i>	I	30	98	18	94 (<i>R</i>)
<i>G. candidum</i>	I	28	96	18	>99 (<i>S</i>)

Comasseto et al. (2003) promoveram a redução enantioseletiva de fluoracetofenonas (**Esq. 33**) com os fungos *Aspergillus terreus* (CCT 3320 e CCT 4083) e *Rhizopus oryza* CCT 4964. Os autores acompanharam os rendimentos e os excessos enantioméricos por vários dias, observando variações interessantes, conforme resultados da **Tabela 25**.

**Tabela 25:** Redução microbiana de *orto*, *meta* e *para* fluoracetofenonas com células inteiras de fungos

Produto	<i>A. terreus</i> CCT 3320			<i>A. terreus</i> CCT 4083			<i>R. oryza</i> CCT 4964		
	t (dias)	Rend. (%)	ee (%)	t (dias)	Rend. (%)	ee (%)	t (dias)	Rend. (%)	ee (%)
<i>orto</i>	17	98	72 (<i>R</i>)	17	94	66 (<i>R</i>)	2	>98	99 (<i>S</i>)
<i>meta</i>	6	91	>99 (<i>R</i>)	8	75	83 (<i>S</i>)	3	92	62 (<i>S</i>)
<i>para</i>	2	42	95 (<i>S</i>)	2	58	78 (<i>S</i>)	8	84	69 (<i>R</i>)

Os autores testaram, ainda, o poder de desracemização de *Aspergillus terreus* CCT 3320 e CCT 4083 frente à mistura racêmica (\pm) *meta*-fluoracetofenona, sendo obtidos excelentes resultados ($>99\%$ (*R*) e 97% (*S*) de ee).

Baskar et al. (2004) utilizaram a espécie vegetal *Daucus carota* na biorredução de β -cetoesteres aromáticos (**Esq. 34**), obtendo excelentes rendimentos (100%) e excessos enantioméricos (92-99%) (**Tab. 26**). A metade dos produtos quirais apresentaram configurações anti-prelog (*R*) e o restante não tiveram suas configurações determinadas.

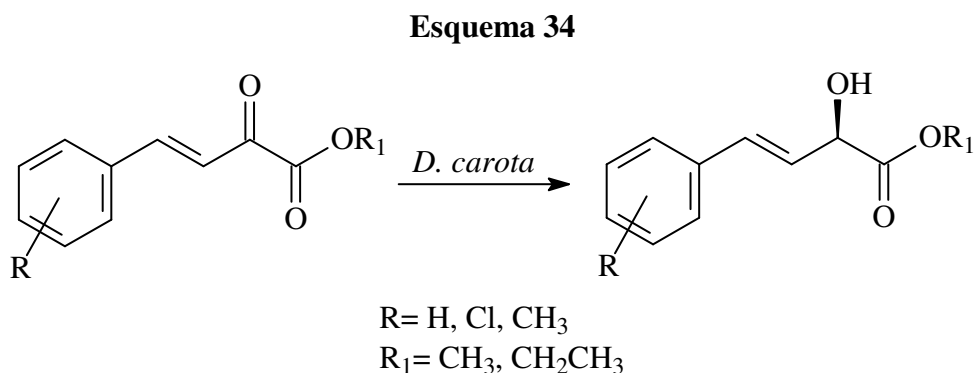
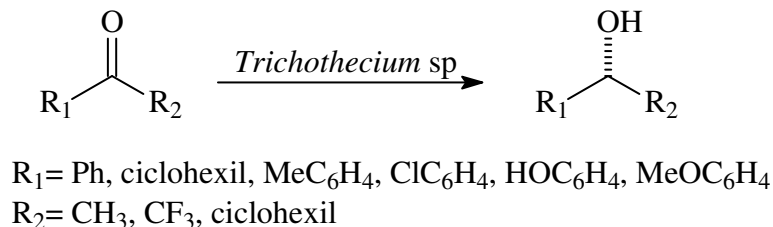


Tabela 26: Redução de β -cetoesteres aromáticos por *D. carota*

R	R ₁	t (dias)	Conv. (%)	Rend. (%)	ee (%)
H	CH ₃	10	100	62	98 (<i>R</i>)
H	CH ₂ CH ₃	10	100	73	98 (<i>R</i>)
p-Cl	CH ₃	10	100	63	>99 (<i>R</i>)
p-Cl	CH ₂ CH ₃	10	100	67	97 (<i>R</i>)
o-Cl	CH ₃	10	100	52	96 (nd)
o-Cl	CH ₂ CH ₃	10	100	55	98 (nd)
p-CH ₃	CH ₃	10	100	62	93 (nd)
p-CH ₃	CH ₂ CH ₃	10	100	68	92 (nd)

Mandal et al. (2004) utilizaram células inteiras de fungo *Trichothecium* sp como biocatalisador na redução enantiosseletiva de acetofenona e alguns compostos análogos, aos seus

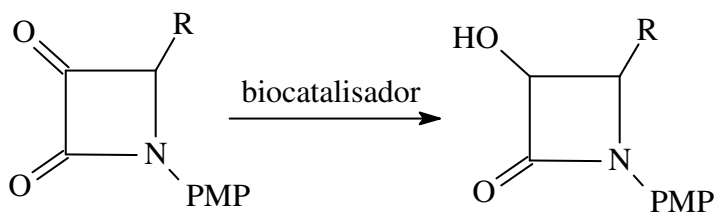
correspondentes álcoois (**Esq. 35**). Os álcoois obtidos foram de configuração *R*, com excessos enantioméricos entre 90 e 98% (**Tab. 27**).

Esquema 35**Tabela 27:** Biorredução de cetonas por *Trichothecium sp*

R ₁	R ₂	t (h)	Rend. (%)	ee (%)
Ph	CH ₃	72	85	93 (<i>R</i>)
Ph	CF ₃	-	não reagiu	-
Ph	ciclohexil	-	não reagiu	-
ciclohexil	CH ₃	96	85	97 (<i>R</i>)
p-MeC ₆ H ₄	CH ₃	24	45	90 (<i>R</i>)
p-ClC ₆ H ₄	CH ₃	24	72	98 (<i>R</i>)
p-HOC ₆ H ₄	CH ₃	-	não reagiu	-
p-MeOC ₆ H ₄	CH ₃	-	não reagiu	-

Yang et al. (2005) testaram várias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* [InvSc1, 15C, 26403 (FAS), 2B (Δ FAS), InvSc1 (Ypr1p), 15C (Ypr1p) e 2B (Gre2p)] e *Escherichia coli* [BL21 (DE3)(Ypr1p), BL21 (DE3)(Ara1p), JM105 (Gre3p) e JM105 (Gey1p)] na biorredução quimio- e estereosseletiva de α -ceto- β -lactamas (**Esq. 36, p. 53**). Nenhum dos microorganismos demonstrou diastereo e enantiosseletividade, porém, são reconhecidamente muito úteis em reduções deste tipo de composto. Os dados de estereosseletividade (ee%) foram mostrados pelos autores na forma de gráficos, impossibilitando expressá-los na **Tabela 28 (p. 53)**.

Esquema 36



R=Ph, t-Bu, C(CH₃)₂CO₂Et, 2-Tienil, 2-Furil

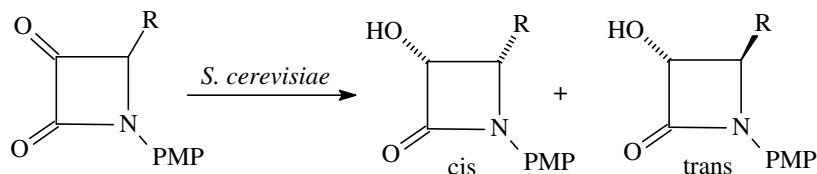
PMP= p-metoxifenil

Tabela 28: Resultados da redução de α -ceto- β -lactamas com microorganismos

Microorganismo	Rendimentos (%)/tempo (h)				
	R				
	Ph	t-Bu	C(CH ₃) ₂ CO ₂ Et	2-tienil	2-furil
Fermento de pão comercial	>98/72	>98/32	>98/24	>98/24	>98/24
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> InvSc1	>98/72	>98/72	>98/24	>99/48	>99/24
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 15C	72/72	>99/96	73/24	99/72	99/48
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 26403 (FAS)	>98/52	96/96	>98/24	>99/48	>99/48
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2B (Δ FAS)	98/72	99/72	98/72	98/72	98/72
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> InvSc1 (Ypr1p)	72/72	97/96	100/72	99/72	>99/48
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 15C (Ypr1p)	88/48	96/72	98/39	98/48	>99/48
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2B (Gre2p)	93/96	>99/96	97/24	90/96	>99/48
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)(Ypr1p)	55/72	0/72	9/72	94/72	90/72
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)(Ara1p)	81/72	20/48	12/48	93/72	98/72
<i>Escherichia coli</i> JM105 (Gre3p)	0/72	0/72	0/72	92/72	44/96
<i>Escherichia coli</i> JM105 (Gey1p)	0/72	0/72	0/72	20/72	57/72

Ainda em 2005, os pesquisadores Mihovilovic, Spina e Stanetty estudaram também a biorredução de α -ceto- β -lactamas por fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) (Esq. 37, p. 54). Os autores utilizaram compostos análogos aos estudados por Yang e colaboradores (2005), com rendimentos inferiores, porém, com excessos enantioméricos bem determinados (Tab. 29, p. 54).

Esquema 37



R= 1-metoxi-1-ciclohexil, 1-metoxi-1-ciclohepil,
4-metoxi-tetrahidropiran-4-il, fenil, t-butil

PMP= p-metoxifenil

Tabela 29: Reduções de α -ceto- β -lactamas por *Saccharomyces cerevisiae*

R	<i>cis</i>		<i>trans</i>	
	Rend. (%)	ee (%)	Rend. (%)	ee (%)
1-metoxi-1-ciclohexil	62	~5	0	-
1-metoxi-1-ciclohepil	62	8	0	-
4-metoxi-tetrahidropiran-4-il	74	~5	0	-
fenil	62	55	38	>97
t-butil	48	>95	44	>98

Inoue, Makino e Itoh (2005) utilizaram a enzima álcool desidrogenase (LSADH) isolada de *Leifsonia* sp S749 na biorredução quimio e enantiosseletiva de 27 cetonas pró-quirais (Esq. 38-43, p. 54-57). Elevados rendimentos e excessos enantioméricos foram obtidos (Tab. 30-34, p. 54-56). Além disso, a função de NADH foi bem reproduzida no sistema reacional de LSADH quando 2-propanol agiu como doador de hidrogênio.

Esquema 38

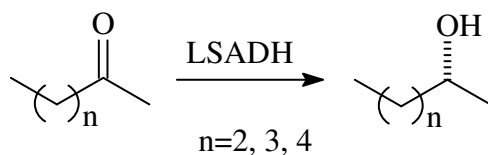
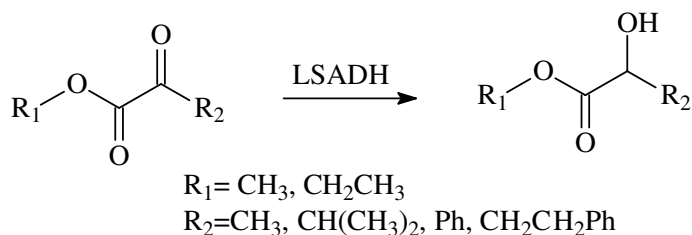


Tabela 30: Resultados da redução enantiosseletiva de cetonas alicíclicas por LSADH

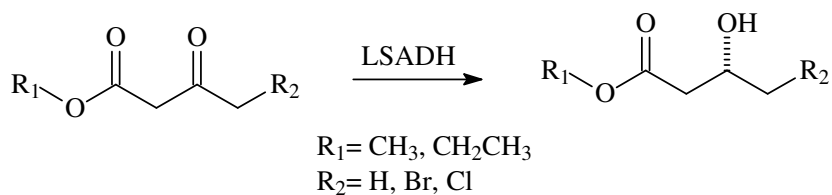
n	Conv. (%)	Rend. (%)	ee (%)
2	79	17	>99 (R)
3	83	31	>99 (R)
4	87	38	>99 (R)

Esquema 39

Tabela 31: Resultados da redução enantiosseletiva de α -cetoesteres por LSADH

R ₁	R ₂	Conv. (%)	Rend. (%)	ee (%)
CH ₂ CH ₃	CH ₃	100	19	>99 (<i>R</i>)
CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	100	40	>99 (<i>R</i>)
CH ₃	Ph	71	31	47 (<i>R</i>)
CH ₂ CH ₃	Ph	29	20	23 (<i>R</i>)
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ Ph	95	58	85 (<i>S</i>)

Esquema 40

Tabela 32: Resultados da redução enantiosseletiva de β -cetoesteres por LSADH

R ₁	R ₂	Conv. (%)	Rend. (%)	ee (%)
CH ₂ CH ₃	H	100	47	>99 (<i>R</i>)
CH ₃	Br	100	35	>99 (<i>S</i>)
CH ₂ CH ₃	Cl	100	54	>99 (<i>S</i>)

Esquema 41

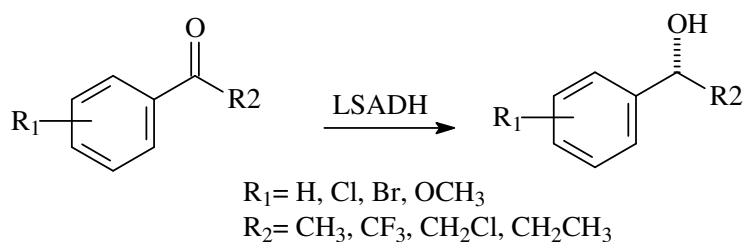
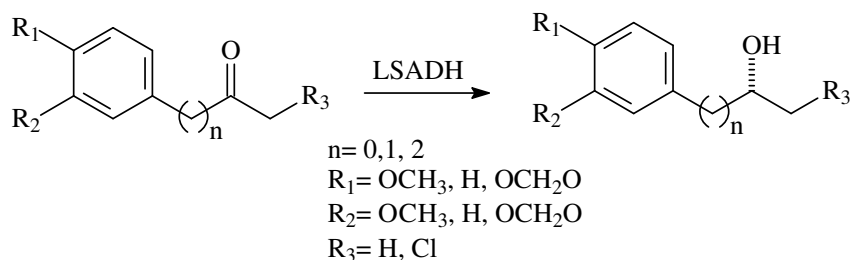


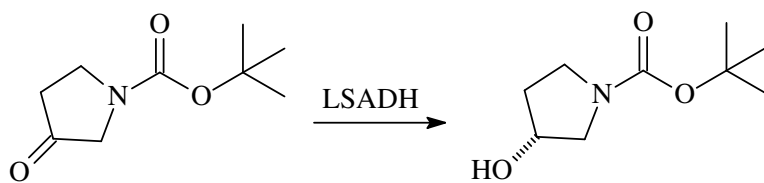
Tabela 33: Resultados da redução enantiosseletiva de acetofenonas por LSADH

R ₁	R ₂	Conv. (%)	Rend. (%)	ee (%)
H	CH ₃	82	40	99 (<i>R</i>)
H	CF ₃	100	81	>99 (<i>S</i>)
<i>m</i> -Cl	CH ₃	90	61	>99 (<i>R</i>)
<i>p</i> -Cl	CH ₃	81	58	>99 (<i>R</i>)
<i>m</i> -Br	CH ₃	95	60	>99 (<i>R</i>)
<i>p</i> -Br	CH ₃	82	62	>99 (<i>R</i>)
H	CH ₂ Cl	100	79	>99 (<i>S</i>)
<i>m</i> -Cl	CH ₂ Cl	100	91	>99 (<i>S</i>)
<i>o</i> -Cl e <i>p</i> -Cl	CH ₃	12	8	79 (<i>R</i>)
<i>m</i> -OCH ₃	CH ₃	72	64	99 (<i>R</i>)
H	CH ₂ CH ₃	8	6	99 (<i>R</i>)

Esquema 42**Tabela 34:** Resultados da redução enantiosseletiva de fenil alcanonas por LSADH

n	R ₁	R ₂	R ₃	Conv. (%)	Rend. (%)	ee (%)
1	OCH ₃	OCH ₃	H	88	48	>99 (<i>R</i>)
2	H	H	H	92	47	98 (<i>R</i>)
1	OCH ₂ O		H	95	62	>99 (<i>R</i>)
0	OCH ₂ O		Cl	40	29	>99 (<i>S</i>)

Esquema 43



Conv. 35%; Rend.24%; ee >99% (R)

Brzezinska-Rodak et al. (2006) obtiveram os álcoois de ambas as configurações (*R/S*), em elevada pureza enantiomérica (98%) e com satisfatório rendimento (40-80%) a partir da biorredução da acetofenona, na reação catalisada por células inteiras de fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*). Os autores variaram os tipos de aditivos visando maximizar os resultados (**Tab. 35**).

Tabela 35: Biorredução enantiosseletiva da acetofenona com *S. cerevisiae*

Aditivo	Rend. (%)	ee (%)
Brometo de alila	35	98 (<i>R</i>)
Álcool alílico	24	98 (<i>R</i>)
Álcool etílico	66	98 (<i>R</i>)
Álcool isopropílico	73	98 (<i>R</i>)
Metil vinil cetona	73	98 (<i>R</i>)
Cloroacetato de etila	76	98 (<i>R</i>)
Iso-propilmetil cetona	72	98 (<i>R</i>)
nenhum	83	98 (<i>R</i>)

Os melhores resultados foram obtidos quando a reação foi realizada em água (30 mL), 25 µL do substrato, 30 g de fermento de pão, 23°C de temperatura e tempo de 72 horas. Outros protocolos foram testados, porém, com resultados inferiores.

Milagre et al. (2006) investigaram o potencial biorredutor de vários microorganismos, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, frente a 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutanoato de etila (**Esq.**

44). Elevados rendimentos químicos, diastereo e enantioméricos foram obtidos com o referido microorganismo imobilizado em alginato de cálcio (**Tab. 36**).

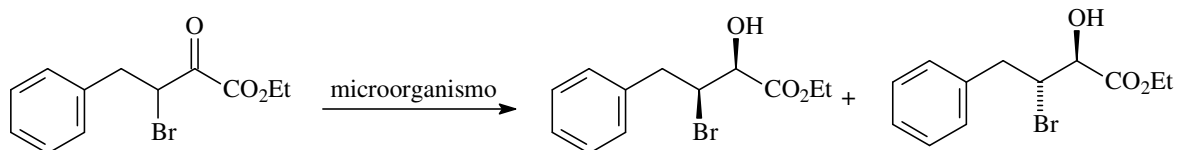
Esquema 44

Tabela 36: Redução da 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutanoato de etila com microorganismos em diferente pH

microorganismo	pH	Rend. (%)	de (%)		ee (%)	
			<i>sin/anti</i>	<i>sin</i>	<i>anti</i>	
<i>Rhodotorula minuta</i>	4,0	59	32/68	93	>99	
<i>Rhodotorula minuta</i>	7,0	75	44/56	89	94	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	4,0	39	34/66	90	>99	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	7,0	50	45/55	96	>99	
<i>Candida utilis</i>	4,0	65	64/36	85	89	
<i>Candida utilis</i>	7,0	62	65/35	84	84	
<i>Pichia canadensis</i>	4,0	48	75/25	90	97	
<i>Pichia canadensis</i>	7,0	65	65/35	90	74	
<i>L. mesenteroides</i>	4,0	55	68/32	90	80	
<i>L. mesenteroides</i>	7,0	48	66/34	91	74	
<i>Serratia rubidea</i>	4,0	4	3/97	>99	>99	
<i>Serratia rubidea</i>	7,0	10	0/100	-	>99	
<i>Serratia marcescens</i>	4,0	7	0/100	-	>99	
<i>Serratia marcescens</i>	7,0	15	0/100	-	>99	
<i>S. cerevisiae</i>	4,0	87	69/31	83	95	
<i>S. cerevisiae</i>	7,0	80	64/36	78	94	

de: excesso diastereomérico

Os melhores resultados foram obtidos com *Saccharomyces cerevisiae*, sendo as condições reacionais otimizadas através da variação do tamanho das partículas e da matriz de imobilização do microorganismo selecionado (*Saccharomyces cerevisiae*) (**Tab. 37 e 38**).

Tabela 37: Influencia do tamanho das partículas na biorredução da 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutanoato de etila usando *S. cerevisiae* imobilizada

Diâmetro (mm)	Rend. (%)	sin/anti	ee (%)	
			sin	anti
Células livres	87	69/31	83	95
1,1	83	67/33	85	95
2,1	85	73/27	92	>99
2,3	88	75/25	92	>99
3,0	92	75/25	96	>99

Tabela 38: Biorredução da 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutanoato de etila mediada por *S. cerevisiae* imobilizada em diferentes matrizes porosas

Matriz	Rend. (%)	sin/anti	ee (%)	
			sin	anti
Alginato-Ca	92	75/25	96	>99
K-carrageenan	87	75/25	90	>99
Lenticatos	79	75/25	90	>99

Fardelone, Rodrigues e Moran (2006) avaliaram o potencial biorredutor de *Geotrichum candidum* CCT 2182 e *Rhodotorula glutinis* CCT 1205 frente a vários derivados da α -azidoacetofenona (**Esq. 45, p. 60**). Os álcoois obtidos, importantes materiais de partida na preparação de compostos farmacêuticos, foram em elevados rendimentos (98-99%) e excessos enantioméricos (40-99%) (**Tab. 39, p. 60**).

Esquema 45

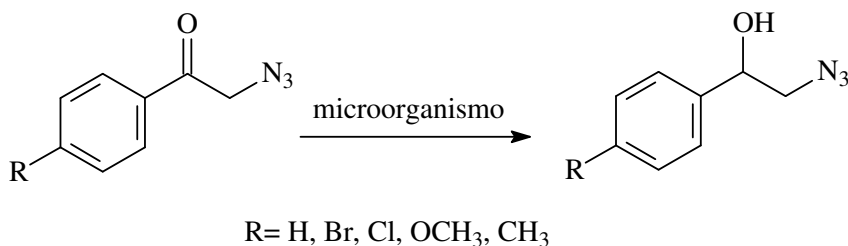
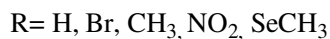
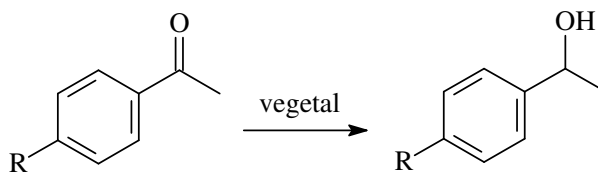


Tabela 39: Biorredução de α -azidoacetofenona mediada por *Geotrichum candidum* CCT 2182 e *Rhodotorula glutinis* CCT 1205

R	Microorganismo	T (°C)	Rend. (%)	ee (%)
H	<i>G. candidum</i>	28	93	40 (S)
Br	<i>G. candidum</i>	28	95	>99 (S)
Cl	<i>G. candidum</i>	28	99	>99 (S)
OCH ₃	<i>G. candidum</i>	28	94	>99 (S)
CH ₃	<i>G. candidum</i>	28	96	>99 (S)
H	<i>R. glutinis</i>	30	88	>99 (R)
Br	<i>R. glutinis</i>	30	97	>99 (R)
Cl	<i>R. glutinis</i>	30	98	>99 (R)
OCH ₃	<i>R. glutinis</i>	30	96	>99 (R)
CH ₃	<i>R. glutinis</i>	30	98	>99 (R)

Andrade et al. (2006) utilizaram uma série de vegetais (*Allium schoenoprasum*, *Arctium lappa*, *Arracacia xanthorrhiza*, *Beta vulgaris*, *Brassica rapa*, *Colocasia esculenta*, *Coriandrum sativum*, *Dioscorea alata*, *Manihot esculenta* e *Raphanus sativus*) na redução enantiosseletiva de acetofenonas *para*-substituídas (**Esq. 46, p. 61**). Os resultados variaram significativamente de vegetal para vegetal, onde rendimentos muito bons (>90%) e excelentes excessos enantioméricos (>99%) foram observados para alguns desses vegetais (**Tab. 40, p. 61**).

Esquema 46

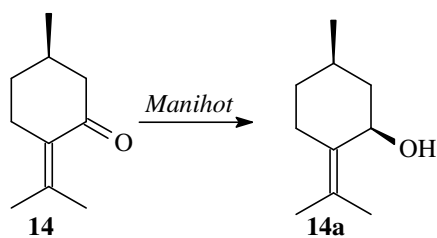
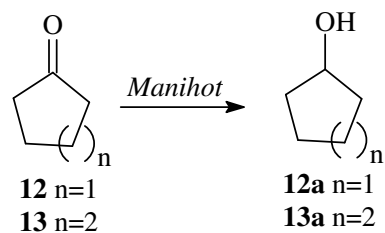
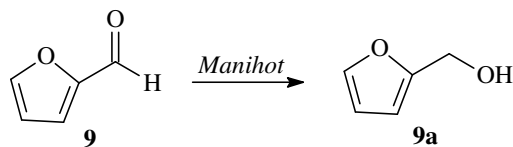
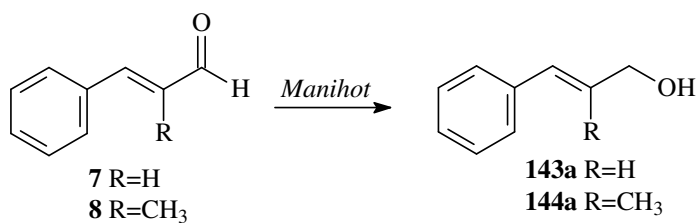
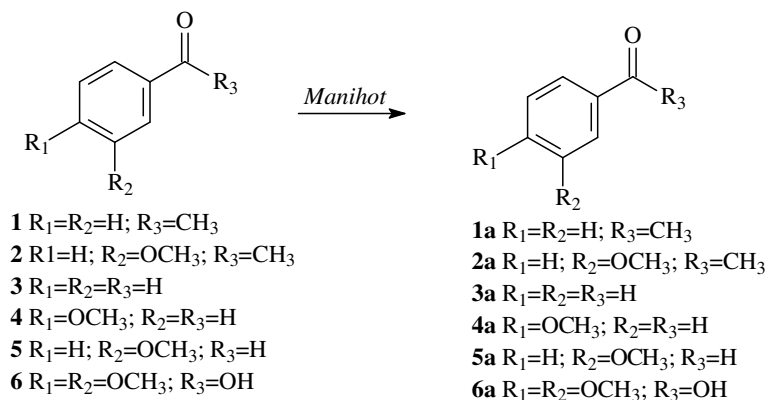
**Tabela 40:** Biorredução de acetofenonas *para*-substituídas com vegetais

Biocatalisador	t (dias)	R									
		H		Br		CH ₃		NO ₂		SeCH ₃	
		C (%)	ee (%)	C (%)	ee (%)	C (%)	ee (%)	C (%)	ee (%)	C (%)	ee (%)
A.	3	5	>98 (S)	3	>98 (S)	1	>98 (S)	3	10 (R)	1	>98 (S)
<i>schoenoprasum</i>	6	5	>98 (S)	5	>98 (S)	-	-	21 (31 ^a)	48 (S)	4	>98 (S)
<i>A. lappa</i>	3	8	8 (S)	-	-	1	>98 (S)	-	-	-	-
	6	21	58 (S)	-	-	1	>98 (S)	9	25	4	44 (S)
<i>A. xanthorrhiza</i>	3	44	91 (S)	14	>98 (S)	32	78 (R)	68 (6 ^a)	96 (S)	21	>98 (S)
	6	91	66 (S)	17	>98 (S)	-	-	79 (9 ^a)	95 (S)	10	>98 (S)
<i>B. vulgaris</i>	3	65	61 (R)	10	>99 (S)	22	86 (R)	-	-	-	-
	6	83	87 (R)	12	>99 (S)	27	87 (R)	-	-	4	44 (S)
<i>B. rapa</i>	3	4	99 (S)	-	-	3	>98 (S)	-	-	-	-
	6	10	99 (S)	-	-	3	>98 (S)	-	-	-	-
<i>C. esculenta</i>	3	24	50 (S)	6	>98 (S)	13	38 (S)	73 (24 ^a)	-	18	71 (S)
	6	27	6 (S)	11	>98 (S)	18	35 (S)	(100 ^a)	-	19	71 (S)
<i>C. sativum</i>	3	56	99 (S)	-	-	-	-	16	>98 (S)	2	>98 (S)
	6	-	-	13	66 (S)	-	-	16	96 (S)	-	-
<i>D. alata</i>	3	30	94 (S)	3	>98 (S)	7	29 (S)	21	87 (S)	1	27 (R)
	6	47	94 (S)	3	>98 (S)	11	25 (S)	24	86 (S)	3	10 (S)
<i>M. esculenta</i>	3	13	29 (R)	50	>90 (R)	2	>98 (S)	51 (19 ^a)	91 (S)	-	-
	6	14	31 (R)	55	80 (R)	3	>98 (S)	56 (20 ^a)	91 (S)	9	>98 (S)
<i>R. sativus</i>	3	10	15 (S)	4	>98 (S)	1	>98 (S)	2	>98 (S)	-	-
	6	4	79 (R)	6	>98 (i)	1	>98 (S)	2	64 (S)	2	66 (S)

C (%): conversão; ^a p-nitroacetofenona foi também formada

Machado et al. (2006) realizaram a biorredução de uma série de compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) (Esq. 37, p. 62) utilizando duas espécies vegetais (*Manihot esculenta* e *Manihot dulcis*). Excelentes rendimentos e excessos enantioméricos foram obtidos para os alcoois quirais (Tab. 41, p. 63).

Esquema 47



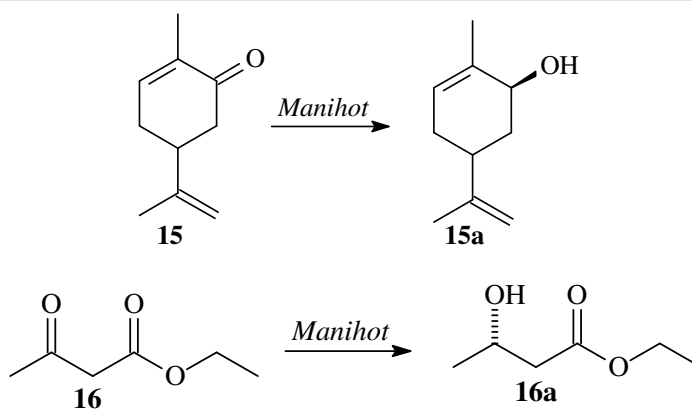


Tabela 41: Resultados da biorredução de aldeídos e cetonas com *Manihot esculenta* e *Manihot dulcis*

Produto	Rend. (%)		ee (%)	
	<i>M. esculenta</i>	<i>M. dulcis</i>	<i>M. esculenta</i>	<i>M. dulcis</i>
1a	80	83	>95 (<i>S</i>)	>97 (<i>S</i>)
2a	85	87	>94 (<i>S</i>)	>96 (<i>S</i>)
3a	91	83		
4a	86	94		
5a	88	94		
6a	-	-	-	-
7a	94	85		
8a	80	90		
9a	90	90		
11a	97	97	>93 (<i>S</i>)	>96 (<i>S</i>)
12a	92	93		
13a	97	92		
14a	11	12	>96	>97
15a	13	15	>96	>98
16a	79	95	>97 (<i>S</i>)	>98 (<i>S</i>)

Soni e Banerjee (2006) utilizaram uma nova cepa de *Candida tropicalis* (PBR-2 MTCC 5158) na biorredução enantiosseletiva da acetofenona e de alguns de seus análogos. Primeiramente, vários parâmetros (tempo, temperatura, pH, e concentração do substrato) foram testados visando a otimização da reação, sempre utilizando acetofenona como substrato. Esses estudos mostraram que o referido microorganismo é capaz de realizar a biorredução em intervalos de pH de 3-10 e temperatura de 25-40°C. A biorredução da acetofenona em escala preparativa, utilizando células de *Candida tropicalis*, produziu o álcool *S*(-)-1-feniletanol com 45% de rendimento e excesso enantiomérico >99%. Finalmente, os autores testaram o potencial redutor deste microorganismo frente a outros compostos análogos a acetofenona, para verificação do efeito dos substituintes (**Tab. 42**).

Tabela 42: Efeito dos substituintes na biorredução com *C. tropicalis* PBR-2 MTCC 5158

Substrato	Conversão (%)	ee (%)
acetofenona	73	>99
2-fluor- acetofenona	83	>97
3-fluor- acetofenona	89	>97
4-fluor- acetofenona	99	>99
4-cloro- acetofenona	72	>97
4-bromo- acetofenona	70	>98
4-iodo- acetofenona	67	>97
4-acetoxi- acetofenona	29	Nd
4-hidroxi- acetofenona	14	Nd
4-amino- acetofenona	-	Nd
Acetonaftona	49	>99
acetiltiofeno	9	Nd

Nd: não determinado

Stuermer et al. (2007) utilizaram enoato redutases provenientes de diferentes microorganismos na biorredução assimétrica de duplas ligações. Vários enóis foram testados, inclusive, a ciclohexen-1-onas (**Esq. 48, p. 65**) usando *Saccharomyces carisbergensis* como fonte de enoatos redutases (**Tab. 43, p. 65**).

Esquema 48

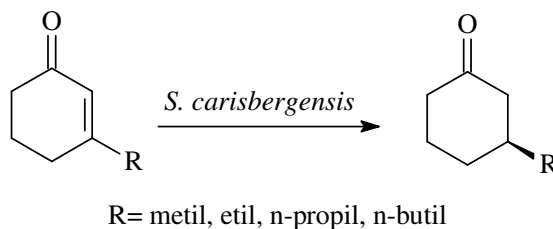


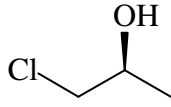
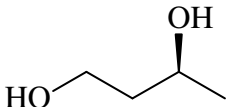
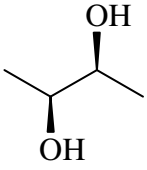
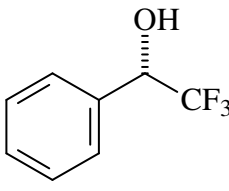
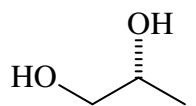
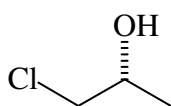
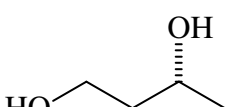
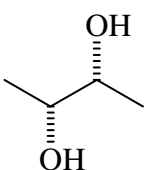
Tabela 43: Biorredução assimétrica de ciclohexen-1-onas com *S. carisbergensis* como fonte de enoatos redutases

R	Conv. (%)	ee (%)
Metil	100	94
Etil	76	94
n-propil	25	89
n-butil	-	-

Itoh et al. (2007) realizaram a biorredução enantiosseletiva de cetonas pró-quirais com células inteiras de *Escherichia coli* (Sar268 e LSADH), obtendo bons resultados (**Tab. 44**). Quando a reação foi catalisada por Sar268, os álcoois obtidos seguiram a regra de Prelog, já com LSADH os produtos foram anti-Prelog.

Tabela 44: Redução enantiosseletiva de cetonas por *Escherichia coli* Sar268 e LSADH

Substrato	Sar268		
	Atividade relativa (%)	Produto	ee (%)
Acetofenona	100		99 (S)
Hidroxiacetona	143		49 (S)

Cloroacetona	207		77 (<i>R</i>)
4-hidroxi-2-butanona	80		87 (<i>S</i>)
Diacetil	247		56 (<i>2S,3S</i>)
LSADH			
Tricloroacetofenona	100		>99 (<i>S</i>)
Hidroxiacetona	13		83 (<i>R</i>)
Cloroacetona	238		82 (<i>S</i>)
4-hidroxi-2-butanona	12		99 (<i>R</i>)
Diacetil	110		92 (<i>2R,3R</i>)

Stueckler et al. (2007) estudaram a redução enantiosseletiva de ácidos dicarboxílicos e dimetil ésteres α,β -insaturados mediada por três enoatos redutases identificados através das siglas POR1, OPR3 e YqjM (Esq. 49, p. 67). A maioria dos produtos apresentaram excessos enantioméricos >99% e, em alguns casos, altos rendimentos (>99%) também foram obtidos. Foram testados, para cada enoato redutase, diferentes cofatores, sendo utilizados na reciclagem

dos mesmos os sistemas NADH/FDH/formato, NADH/GDH/glicose ou NADPH/G6PDH/glicose-6-fosfato (Tab. 45).

Esquema 49

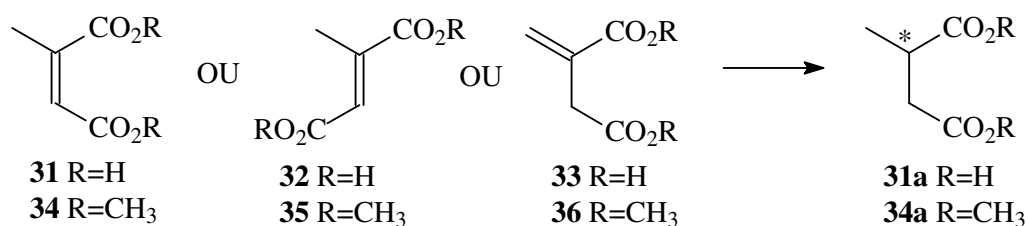
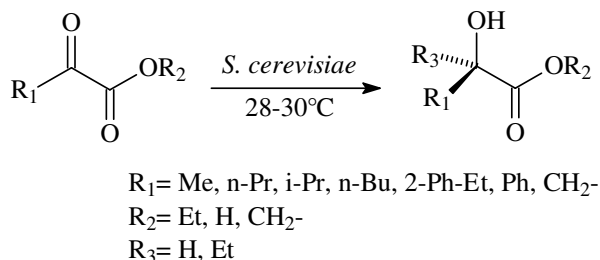


Tabela 45: Biorredução assimétrica de ácidos dicarboxílicos (**31-33**) e dimetil ésteres (**34-36**) com enoatos redutases OPR1, OPR3 e YqjM

Substrato	Produto	Cofator	OPR1		OPR3		YqjM	
			C (%)	ee (%)	C (%)	ee (%)	C (%)	ee (%)
31	31a	NADH	>99	>99 (R)	NC	-	>99	>99 (R)
		NADPH	>99	>99 (R)	NC	-	>99	>99 (R)
		NAD ⁺ -FDH-M ⁺²	>99	>99 (R)	ND	-	>99	>99 (R)
		NAD ⁺ -GDH-M ⁺²	>99	>99 (R)	ND	-	>99	>99 (R)
		NADP ⁺ -G6PDH-M ⁺²	>99	>99 (R)	ND	-	>99	>99 (R)
32	31a	NADH ou NADPH	NC	-	NC	-	NC	-
		NADH	NC	-	NC	-	NC	-
33	31a	NADPH	NC	-	NC	-	3	>99 (R)
		NADP ⁺ -G6PDH	ND	-	ND	-	14	>99 (R)
34	34a	NADH	59	>99 (R)	96	>99 (R)	83	>99 (R)
		NADPH	48	>99 (R)	87	>99 (R)	88	>99 (R)
		NAD ⁺ -FDH	91	>99 (R)	99	>99 (R)	93	>99 (R)
		NADP ⁺ -G6PDH	28	>99 (R)	75	>99 (R)	78	>99 (R)
		NADH	28	>99 (R)	3	>99 (R)	91	>99 (R)
35	34a	NADPH	29	>99 (R)	NC	-	77	>99 (R)
		NAD ⁺ -FDH	66	>99 (R)	ND	-	88	>99 (R)
		NADP ⁺ -G6PDH	14	>99 (R)	ND	-	64	>99 (R)
		NADH	65	79 (R)	NC	-	57	>99 (S)
36	34a	NADPH	58	80 (R)	NC	-	70	>99 (S)
		NAD ⁺ -FDH	99	77 (R)	ND	-	69	>99 (S)
		NADP ⁺ -G6PDH	33	80 (R)	ND	-	36	>99 (S)

M⁺²: Ca⁺², Mg⁺² ou Zn⁺²; NC; nenhuma conversão; ND: não determinado; C: conversão

Salinas et al. (2007) realizaram a biorredução enantiosseletiva de α -oxo-ésteres (**Esq. 50**) para obtenção de α -hidroxi-ésteres, utilizando células inteiras de *Saccharomyces cerevisiae*, na ausência de solvente. Foram obtidos elevados graus de conversão (93% para um dos substratos e 100% para o restante) e excessos enantioméricos excelentes (82% para um dos substratos e $\geq 99\%$ para o restante) (**Tab. 46**).

Esquema 50**Tabela 46:** Biorredução de α -oxo-ésteres mediada por *S. cerevisiae* em sistema sem solvente

R ₁	R ₂	R ₃	t (h)	Conv. (%)	ee (%)
Me	Et	H	6	100	$\geq 99\%$ (R)
n-Pr	Et	H	7	100	$\geq 99\%$ (R)
i-Pr	Et	H	6	100	$\geq 99\%$ (R)
n-Bu	Et	H	7	100	$\geq 99\%$ (R)
2-Ph-Et	H	Et, H	6	93	$\geq 99\%$ (S)
Ph	Et	H	24	100	$\geq 99\%$ (R)
CH ₂ -	CH ₂ -	H	4	100	82% (R)

Orden et al. (2008) realizaram um estudo comparativo sobre o potencial biorredutor de culturas de células e tecidos de várias espécies vegetais (*Baccharis crispa*, *Baccharis flabellata*, *Buddleja cordobensis*, *Daucus carota*, *Gardenia augusta*, *Grindelia pulchella* e *Tessaria absinthioides*). Nesse estudo, os autores utilizaram cetonas aromáticas pró-quirais, acetofenona (**Esq. 51, p. 69**), croman-4-ona (**Esq. 52, p. 70**) e 6-acetil-2,2-dimetil-2,3-dihidro-4H-crome-4-ona (**Esq. 53, p. 71**), na comparação do potencial biorredutor de culturas de células e tecidos de plantas, da mesma espécie vegetal. Diferenças significativas foram observadas para capacidade

reduzida dos dois tipos de materiais (cultura de células e tecidos vegetais). As Tabelas 47 (p. 69), 48 (p. 70), 49 (p. 71) e 50 (p. 72) resumem os resultados obtidos nesse estudo.

Esquema 51

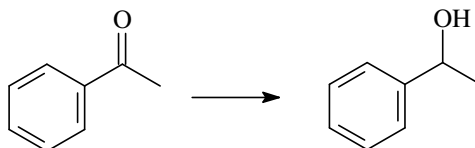
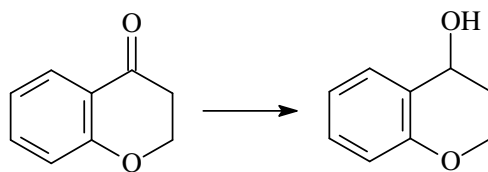


Tabela 47: Biorredução da acetofenona com culturas de células e tecidos de plantas

Plantas	t (dias)	Culturas de células		Tecidos vegetais	
		Conv. (%)	ee (%)	Conv. (%)	ee (%)
<i>B. crispa</i>	3	21	45 (S)	14	67 (S)
	6	25	42 (S)	30	82 (S)
<i>B. flabellata</i>	3	40	70 (S)	34	42 (S)
	6	Nd	-	19	72 (S)
<i>B. cordobensis</i>	3	Nd	-	95	98 (S)
	6	Nd	-	98	93 (S)
<i>D. carota</i>	3	45	>98 (S)	95	>98 (S)
	6	54	>98 (S)	>98	>98 (S)
<i>G. augusta</i>	3	41	82 (R)	77	22 (S)
	6	52	87 (R)	92	16 (S)
<i>G. pulchella</i>	3	37	20 (R)	33	77 (S)
	6	31	22 (R)	21	70 (S)
<i>T. absinthioides</i>	3	18	80 (S)	8	52 (S)
	6	96	89 (S)	26	31 (S)

Nd: não determinado

Esquema 52

**Tabela 48:** Biorredução da croman-4-ona com culturas de células e tecidos de plantas

Plantas	t (dias)	Culturas de células		Tecidos vegetais	
		Conv. (%)	ee (%)	Conv. (%)	ee (%)
<i>B. crispa</i>	3	34	30 (<i>R</i>)	28	79 (<i>S</i>)
	6	9	24 (<i>R</i>)	42	80 (<i>S</i>)
<i>B. flabellata</i>	3	29	61 (<i>S</i>)	53	88 (<i>S</i>)
	6	24	45 (<i>S</i>)	13	72 (<i>S</i>)
<i>B. cordobensis</i>	3	Nd	-	98	98 (<i>S</i>)
	6	Nd	-	98	80 (<i>S</i>)
<i>D. carota</i>	3	98	>98 (<i>S</i>)	98	>98 (<i>S</i>)
	6	97	>98 (<i>S</i>)	98	>98 (<i>S</i>)
<i>G. augusta</i>	3	11	9 (<i>S</i>)	95	83 (<i>S</i>)
	6	7	47 (<i>S</i>)	94	90 (<i>S</i>)
<i>G. pulchella</i>	3	55	79 (<i>S</i>)	41	83 (<i>S</i>)
	6	47	72 (<i>S</i>)	41	36 (<i>S</i>)
<i>T. absinthioides</i>	3	41	96 (<i>S</i>)	42	89 (<i>S</i>)
	6	87	95 (<i>S</i>)	51	82 (<i>S</i>)

Esquema 53

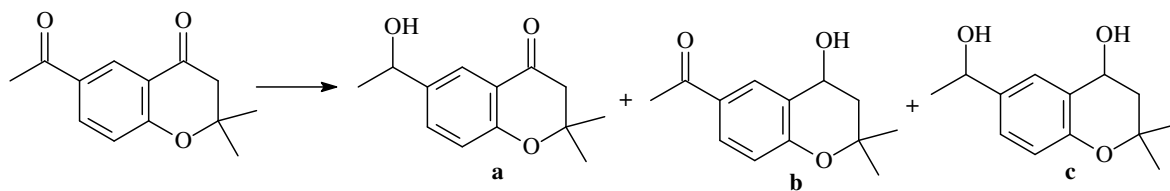


Tabela 49: Biorredução da 6-acetil-2,2-dimetil-2,3-dihidro-4H-crome-4-ona com culturas de células

Plantas	t (dias)	substrato (%)	a		b		c	
			Conv. (%)	ee (%)	Conv. (%)	Conv. (%)		
						x	y	
<i>B. crispa</i>	3	59	34	>98 (R)	6	<1		
	6	26	66	>98 (R)	6	1	1	
<i>B. flabellata</i>	3	81	9	Nd	10	<1		
	6	70	15	90 (S)	15	<1		
<i>B. cordobensis</i>	3	84	14	95	2	<1		
	6	82	16	95	2	<1		
<i>D. carota</i>	3	8	81	>98 (S)	10	<1	<1	
	6	4	74	>98 (S)	14	1	6	
<i>G. augusta</i>	3	2	79	69 (S)	4	9	6	
	6	<1	18	13 (R)	6	46	29	
<i>G. pulchella</i>	3	59	39	63 (R)	2	<1		
	6	65	28	-	6	<1	<1	
<i>T. absinthioides</i>	3	66	42	>98 (S)	2	<1		
	6	25	68	>98 (S)	5	2		

Nd: não determinado; x e y: diastereoisômeros

Tabela 50: Biorredução da 6-acetil-2,2-dimetil-2,3-dihidro-4H-crome-4-ona com tecidos vegetais

Plantas	t (dias)	Substrato (%)	a				b		c	
			Conv. (%)	ee (%)	Conv. (%)	Conv. (%)	Conv. (%)	Conv. (%)		
<i>B. crispa</i>	3	87	9	-	4	-				
	6	73	16	37 (S)	11	-				
<i>B. flabellata</i>	3	79	15	12 (S)	6	-				
	6	59	27	15 (S)	14	-				
<i>B. cordobensis</i>	3	100	Nd	-	-	-				
	6	100	Nd	-	-	-				
<i>D. carota</i>	3	6	91	>98 (S)	2	1				
	6	-	95	>98 (S)	4	1				
<i>G. augusta</i>	3	76	20	48 (S)	4	-				
	6	62	29	57 (S)	9	-				
<i>G. pulchella</i>	3	98	1	-	1	-				
	6	95	2	-	3	-				
<i>T. absinthioides</i>	3	77	22	41 (S)	1	-				
	6	60	36	43 (S)	4	-				

Nd: não determinado; a e b: diastereoisômeros

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme já evidenciado, diversos e importantes fatores justificam a utilização dos biocatalisadores nas reações de redução e acetilação. Os reagentes convencionais (NaBH_4 e LiAlH_4 em reduções e $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ na acetilação), além de caros e explosivos, apresentam elevada toxicidade, enquanto, os biocatalisadores, além de mais seletivos, são menos tóxicos e biodegradáveis, características bastante interessantes no que diz respeito ao meio ambiente.

Muitos estudos relatam a utilização de microorganismos como fontes enzimáticas, contudo, trabalhos utilizando vegetais são mais raros (MIRONOWICZ, 1998; EDEGGER et al., 2006). Recentes publicações vêm demonstrando o elevado potencial biorredutor de espécies vegetais, principalmente na redução de compostos carbonílicos (YADAV et al., 2002; MACHADO et al., 2006; ANDRADE et al., 2006).

Objetivando avaliar o potencial biocatalítico do vegetal *Saccharum officinarum* Linn. (cana de açúcar), foram investigadas a biorredução de uma série de compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) e a bioacetilação de álcoois (primários, secundários e terciários), utilizando o líquido (CC) originário da moagem da cana de açúcar em sua forma bruta, assim como, suas enzimas imobilizadas (EICC).

A análise e a quantificação dos produtos foram realizadas utilizando Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H).

5.1. Métodos para Determinação de Proteínas

O desenvolvimento de metodologias para determinação de proteínas vem experimentando surpreendente crescimento em virtude de sua fundamental importância em diversas áreas da ciência, podendo-se destacar a nutrição humana (GANONG, 1995) e animal (McDONALD, EDWARDS e GREENHALGH, 1987), análises clínicas (GANONG, 1995), entre outras.

As proteínas desempenham papéis extremamente relevantes na maioria dos processos biológicos, atuando inclusive como catalisadores. Assim, a determinação de proteínas pode servir como uma estimativa do potencial enzimático de um material biológico (ZAIA, ZAIA e LICHTIG, 1998).

As metodologias mais conhecidas utilizam a espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (UV-Vis) como ferramenta para determinação de proteínas totais. Essas metodologias podem ser divididas em dois grupos:

- ❖ *Reação química com as proteínas*: Métodos de Lowry, Método do ácido bicinônico (BCA), Método do Ftalaldeído-mercaptoetanol, Método de Biureto e Método da p-Benzoquinona.
- ❖ *Fixação de corantes às proteínas*: Método de Bradford, Método de Fixação da prata, Método do ouro coloidal e Marcação radioativa.

Todos esses métodos devem apresentar alguns aspectos imprescindíveis para que possam ser utilizados com eficiência e confiabilidade, tais como: alta sensibilidade, especificidade, baixo custo, rapidez e fácil manuseio.

Os métodos mais comumente utilizados em rotinas de laboratórios foram aplicados na determinação do conteúdo de proteínas do caldo de cana de açúcar (CC), ou seja, o Método de Lowry, modificado por Hartree (HARTREE, 1972) e o Método de Bradford (BRADFORD, 1976). O primeiro método se baseia em uma reação química com as enzimas e o segundo na fixação de corantes na superfície das enzimas.

5.1.1. Determinação de Proteínas no CC pelo Método de Lowry

É o método mais utilizado e baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) quando posto em contato com a proteína, na presença de cobre (II), produzindo um composto com absorção máxima em 650 nm (ZAIA, ZAIA e LICHTIG, 1998).

Segundo Chou e Goldstein (1960), que estudaram extensivamente o mecanismo de redução do reagente de Folin-Ciocalteu por enzimas, peptídeos ou aminoácidos, esta reação deveria ocorrer através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade dos peptídeos e proteínas, sendo facilitada pelo quelato cobre (II)-peptídeo/proteína.

A principal vantagem do método de Lowry é sua alta sensibilidade, embora diversos interferentes possam diminuir essa característica. Compostos fenólicos, lipídeos, detergentes, ácido úrico, guanina e xantina, sulfato de amônio, melanina, açúcares, entre outros, interferem na determinação de proteínas por este método (LUCARINI e KILIKIAN, 1999).

Este método foi utilizado na determinação do conteúdo de proteínas do CC, sendo encontrado um teor de 1,4% de proteínas totais, superior aos registrados na literatura (1%) para outras espécies vegetais (NASSAR, 1986) e 0,7% (MACHADO, 2004). O resultado obtido sugeriu que o CC poderia apresentar uma boa atividade biocatalítica, visto que, em geral, o teor de enzimas pode ser refletido pelo de proteínas.

5.1.2. Determinação de Proteínas no CC pelo Método de Bradford

É um método para determinação de proteínas totais que utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue BG-250 que interage com macroproteínas que contém aminoácidos de cadeia laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para forma aniônica, absorvendo fortemente em 595 nm (COMPTON e JONES, 1985).

O método de Bradford é mais rápido, sensível e está sujeito a um número bem menor de interferentes que o de Lowry. Entretanto, apresenta algumas desvantagens, como a variação da absorvitividade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade (MARSHALL e WILLIAMS, 1992) ou baixo peso molecular das mesmas (GOREN e LI, 1986) e fornecendo resultados nem sempre reproduzíveis devido ao grau de pureza do corante BG-250 que varia conforme a procedência.

Os principais interferentes neste método são: uréia (GOTHAM, FRYER e PATERSON, 1988), detergentes (ROSENTHAL e KOUSSALE, 1983), lipídeos (PANDY e MURTHY, 1994), cloreto de sódio e potássio (GOGSTAD e KRUTNES, 1982), ciclodestrinas (XU, TROUPE e SHARMA, 1994), entre outros.

O método de Bradford (BRADFORD, 1976) também foi utilizado para determinação do teor de proteínas totais do CC, visando comparação com o resultado obtido para o método de Lowry. O valor obtido (0,5%) mostrou-se muito inferior àquele encontrado pelo método de Lowry (1,4%), sugerindo que o CC apresenta uma quantidade muito reduzida de proteínas de alto peso molecular (neste método a interação com o corante depende sensivelmente do tamanho da proteína).

5.2. Biorreduções Utilizando Caldo de Cana (CC)

Previamente, foram registrados espectros de RMN ^1H (**Fig. 12, p. 78**) e CG-EM (**Fig. 13, p. 78**) do caldo de cana (CC) na ausência de substratos de modo a obter-se referências para comparação nas reações, assim como, para verificar a presença de possíveis contaminantes provenientes do material vegetal. A amostra da referência foi preparada pelo mesmo procedimento utilizado nas reações de biorredução dos compostos carbonílicos com CC (**Cap. 6, subitem 6.7.3., p. 213**).

Os três primeiros picos do cromatograma da **Figura 13 (p. 78)** foram identificados através de seus espectros de massa, como sendo o lactato de etila (pico 1, tr: 4,36), 2-pentanona (pico 2, tr: 4,73) e 2-feniletanol (pico 3, tr: 9,23), onde tr representa o tempo de retenção em minuto. Esses picos foram selecionados considerando que, os compostos trabalhados são de baixos pesos moleculares (em torno de 150), aparecendo no cromatograma, normalmente, em baixos tempos de retenção.

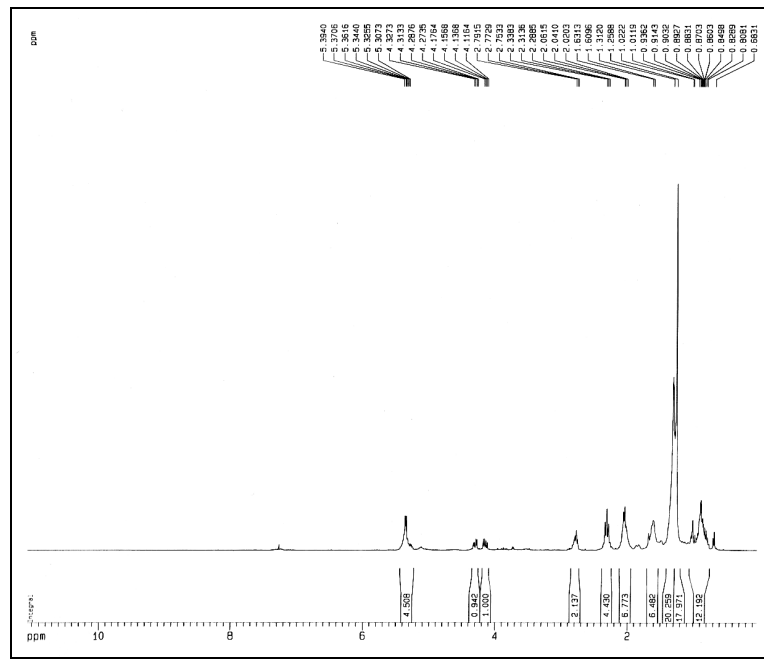


Figura 12: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do caldo de cana (CC) bruto

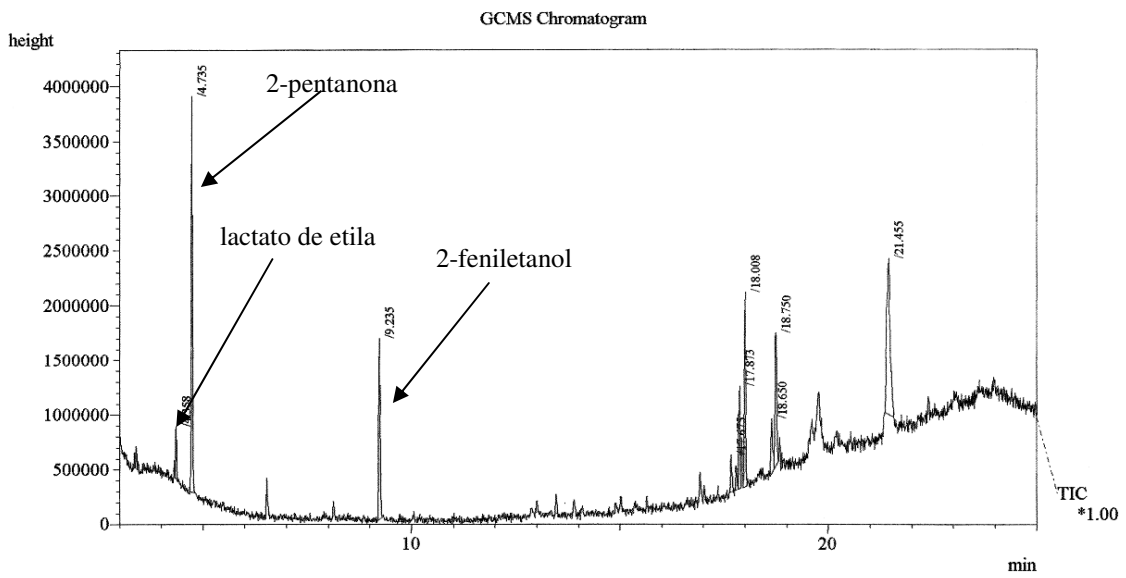


Figura 13: Cromatograma CG-EM do caldo de cana (CC) bruto

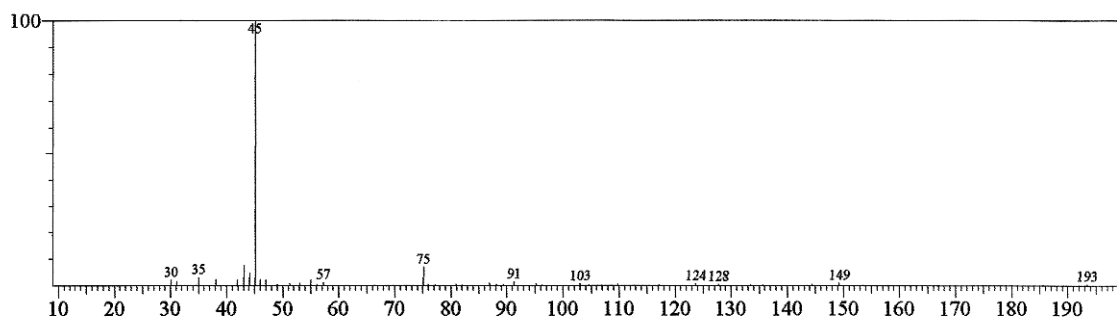


Figura 14: Espectro de massa do pico 1, tr: 4,36 min (lactato de etila)

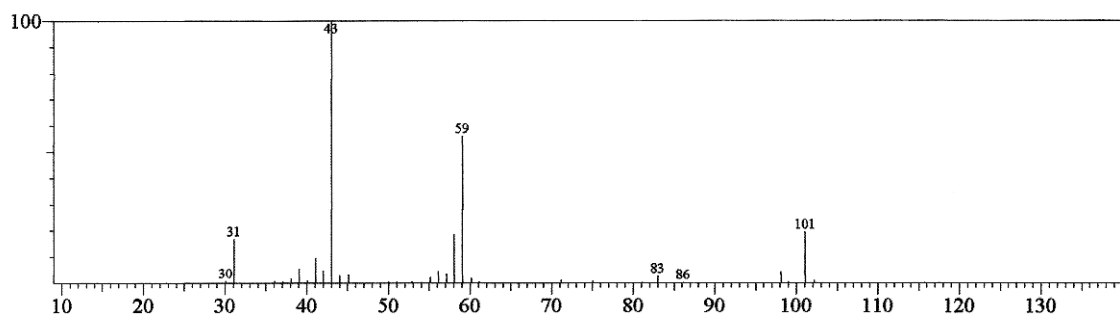


Figura 15: Espectro de massa do pico 2, tr: 4,73 min (2-pentanona)

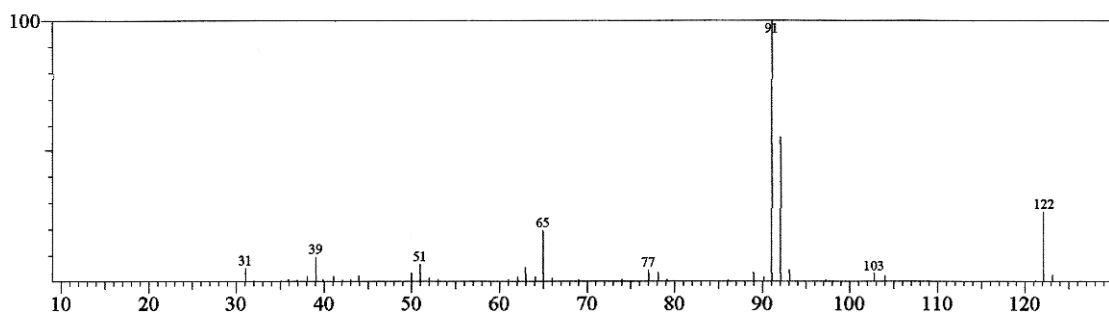


Figura 16: Espectro de massa do pico 3, tr: 9,23 min (2-feniletanol)

Tendo em vista testar a presença de enzimas redutases em vegetais comuns, uma série de cetonas, aldeídos e outros compostos aromáticos e alifáticos (1-22) (**Esquemas 1, 2 e 3, p. 82, 114 e 129, respectivamente**) como substratos, foram tratados com o CC fresco a temperatura ambiente por 72 h (YADAV et al., 2002; SOUZA, 2003; MACHADO, 2004; MACHADO et al., 2006). As misturas reacionais brutas foram submetidas a cromatografia em coluna de sílica gel, acompanhadas através de cromatografia delgada de sílica gel (CCD) e visualizadas utilizando

vanilina como revelador. Os produtos foram quantificados por CG-EM e RMN ^1H , com os resultados apresentados na **Tabela 51 (p. 80)**. Os dados registrados em ambas as técnicas foram em acordo, com pequenas diferenças em precisão. A percentagem de cada produto foi calculada a partir da comparação da integração dos picos de hidrogenios selecionados nos substratos e respectivos produtos, no caso da técnica de RMN ^1H . Assim, foram comparados a integração dos sinais dos grupos metila nas cetonas acetofenona (**1**) e 3-metóxi-acetofenona (**2**) com a integração dos sinais dos hidrogenios carbinólicos nos álcoois **1a** e **2a**, respectivamente; dos hidrogenios aldeídicos do benzaldeído (**3**), anisaldeído (**4**), m-anisaldeído (**5**), vanilina (**6**), cinamaldeído (**7**) e furfural (**9**) com os hidrogenios metilênicos dos álcoois benzílico (**3a**), anísico (**4a**), m-anísico (**5a**), vanílico (**6a**), éter etil vanílico (**6b**), cinâmico (**7a**) e furfurílico (**9a**), respectivamente; e, do hidrogenio aldeídico do α -metil-cinamaldeído (**8**) com os hidrogenios metilicos dos álcoois α -metil-cinâmico (**8a**) e α -metil-dihidro-cinâmico (**8b**) e do ácido α -metil-cinâmico (**8c**). Como exemplo, em termos de discussão de dados espectrais de RMN ^1H registrados para os álcoois obtidos através de redução biocatalítica, no caso da biotransformação de **1** em **1a**, foi observado um quarteto ($J = 6,42$ Hz) em δ_{H} 4,96 no espectro (**Fig. 19, p. 84**) do produto de biorredução (sinal do hidrogênio carbinólico de **1a**), em acordo com o quarteto ($J = 6,45$ Hz) em δ_{H} 4,83, visto no correspondente espectro (**Fig. 18, p. 84**) do mesmo álcool tomado como padrão. Os sinais relativos aos demais compostos foram registrados na **Tabela 52 (p. 132)**.

Tabela 51: Percentagem relativa dos produtos da biorredução de **1-13, 15, 16** e hidrólise de **18** obtidos por RMN ^1H e CG-EM

Produto	Bioconversão (%)	
	RMN ^1H /CG-EM	ee%
1a	34,0/39,3	56,7 (R)
2a	16,1/19,4	41,0 (S)
3a	100,0/99,2	
4a	100,0/100,0	
5a	100,0/100,0	
6a	91,0/90,0	

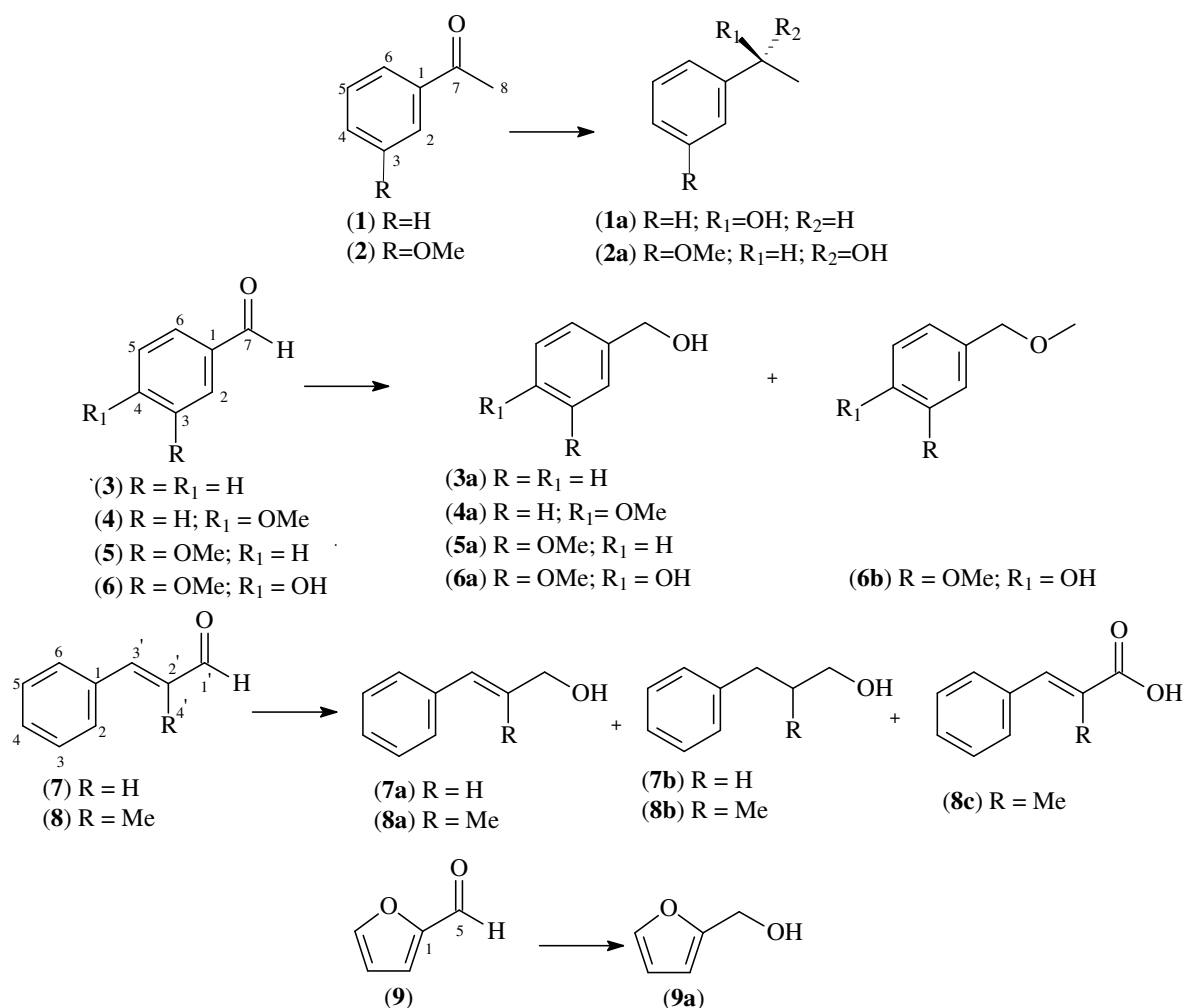
6a; 6b*	43,4; 56,6/34,4; 65,6	
7a; 7b	66,6; 33,4/66,5; 33,5	
8a; 8b; 8c	38,2; 5,7; 56,1/38,2; 5,7; 56,08	
9a	100,0/100,0	
10a	100,0/100,0	
11a	100,0/100,0	
12a	NC/34,0	
13a	NC/81,2	
15a	9,3/2,5	25,7 (S)
16a	100,0/100,0	100,0 (S)
18a	NC/45,3	

NC: não conclusivo; *na presença de DMSO

Como esperado, os aldeídos foram mais reativos que as cetonas, e o grupo metoxila nas posições *para* e *meta* no caso dos compostos **4** e **5** (100% de conversão), respectivamente, praticamente não demonstrou nenhuma influência na conversão quando comparado com **3** (99,2%), que apresenta um anel aromático não substituído. No processo de redução, quase todos os aldeídos testados, exceto **6**, **7**, e **8**, produziram álcoois em excelentes rendimentos de conversão, superiores aos descritos para *Daucus carota* (YADAV et al., 2002) e comparáveis aos obtidos com *Manihot esculenta* e *Manihot dulcis* (MACHADO et al., 2006) e *Zygosaccharomyces rouxii* (ANDERSON et al., 1995). A vanilina (**6**) não foi afetada pelas duas espécies de *Manihot* (MACHADO et al., 2006), porém, na redução biocatalítica com *S. officinarum*, ocorreu formação de **6a** (álcool vanílico) com 90% de conversão. Na presença de dimetilsulfóxido (DMSO), adicionado para aumentar a solubilidade do substrato, esta reação forneceu dois produtos, o álcool **6a** (álcool vanílico) (34,4%) e o éter **6b** (éter metil vanílico) (65,6%). Este fato demonstrou que o DMSO, provavelmente, poderia estar induzindo um processo de transmetilação. Por outro lado, quimiosseletividade não foi observada com cinamaldeído (**7**), onde a reação de redução gerou dois produtos: o álcool cinâmico (**7a**, 66,5%) como resultado da redução seletiva do grupo carbonila e, o álcool dihidro-cinâmico (**7b**, 33,5%), resultante da redução dos grupos carbonila e olefina. Quimiosseletividade também não foi

observada na biorredução do α -metil-cinamaldeído (**8**), onde, um dos produtos, o álcool α -metil-cinâmico (**8a**, 38,2%), apresentou redução somente do grupo carbonila e, um outro, o álcool dihidro- α -metil-cinâmico (**8b**, 5,7%) exibiu redução da carbonila e da ligação olefínica. Inesperadamente, um terceiro composto, ácido α -metil-cinâmico (**8c**, 56,1%), resultado da oxidação do grupo aldeído a ácido carboxílico, apresentou-se como o produto principal (possível auto-oxidação do substrato aldeídico). Finalmente, na série dos aldeídos aromáticos, é importante enfatizar a elevada reatividade e o alto rendimento de conversão observado nas reações desses compostos. Esta observação foi também verificada na redução do furfural (**9**) ao produzir o álcool furfurílico (**9a**), com 100% de conversão.

Esquema 1



A seguir estão relacionados os espectros de RMN ^1H dos compostos de partida (**1-9**) (aldeídos/cetonas) e dos respectivos alcoóis obtidos por redução com NaBH_4 , assim como, os espectros de RMN ^1H , cromatogramas CG-EM [tempo de retenção (tr) dado em minuto] e os espectros de massa dos produtos resultantes da biorredução dos compostos **1-9**.

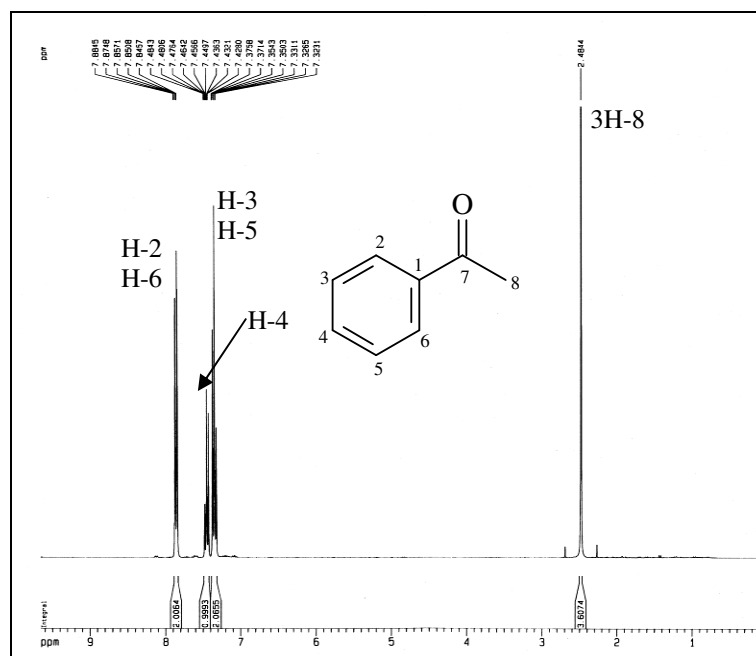


Figura 17: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão acetofenona (**1**)

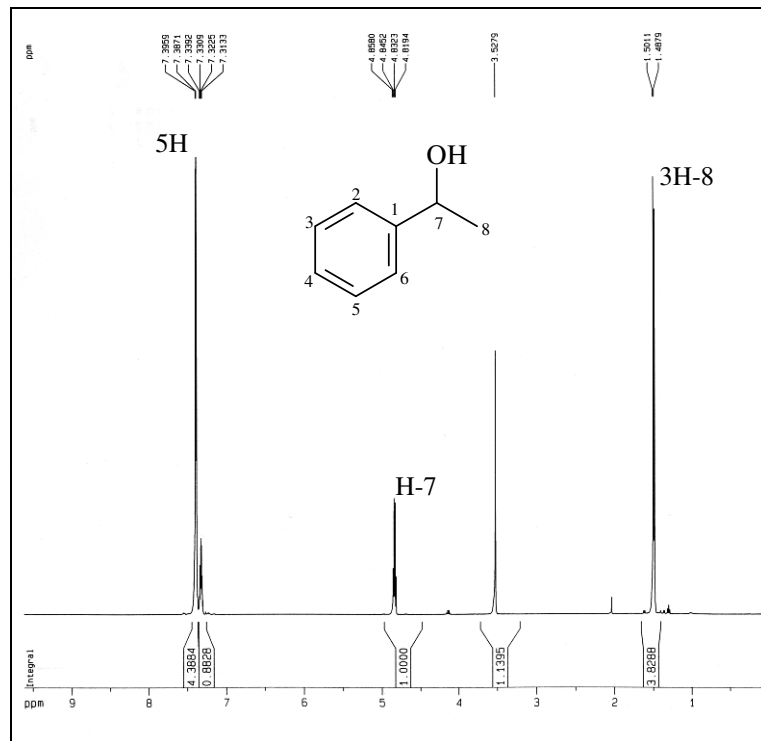


Figura 18: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do padrão 1-fenil-etan-1-ol (1a)

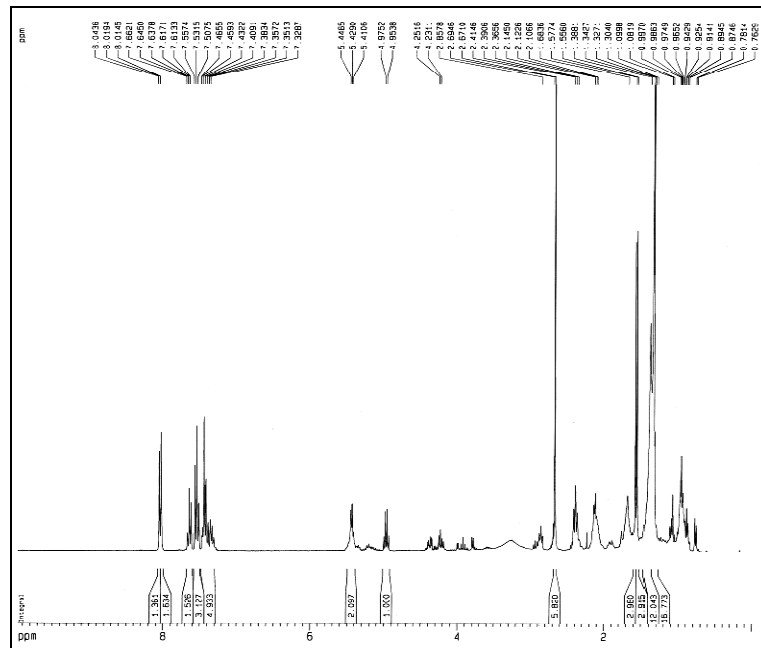


Figura 19: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da mistura obtida na biorredução da acetofenona (1) com CC

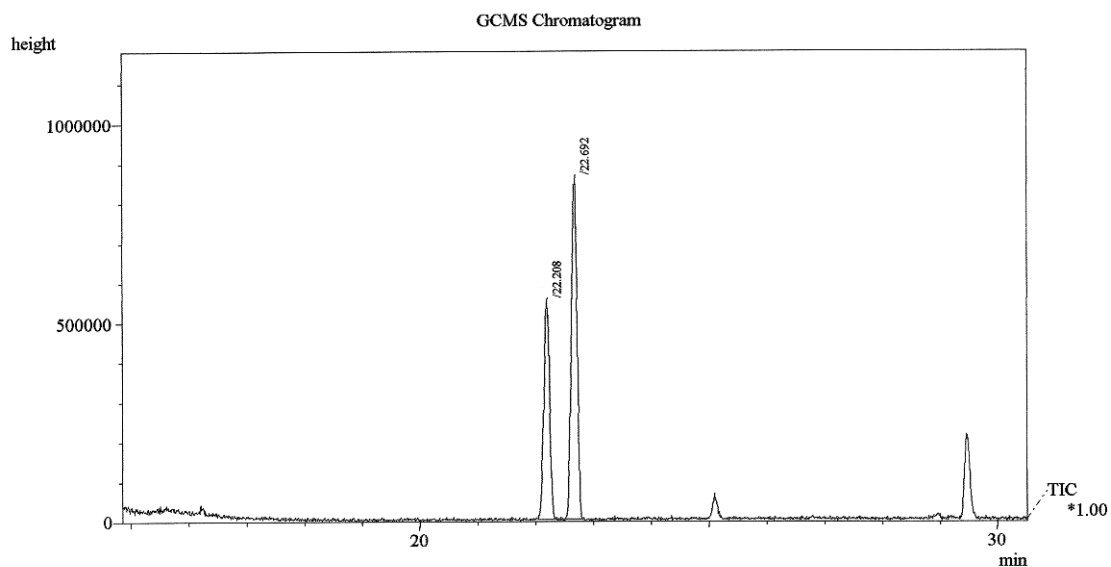


Figura 20: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução da acetofenona (**1**) com CC

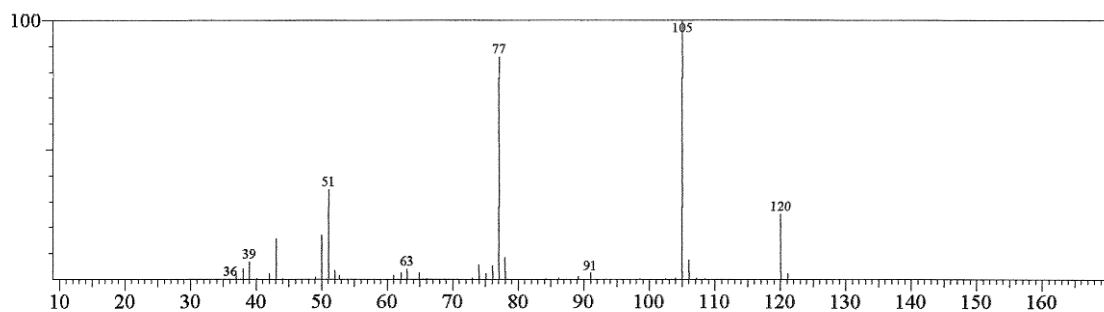


Figura 21: Espectro de massa da acetofenona (**1**), tr: 22,69 min

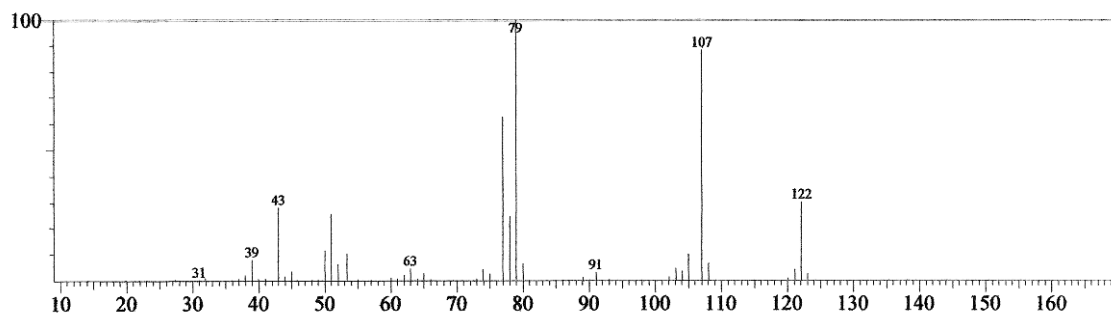


Figura 22: Espectro de massa do 1-fenil-etan-1-ol (**1a**), tr: 22,01 min

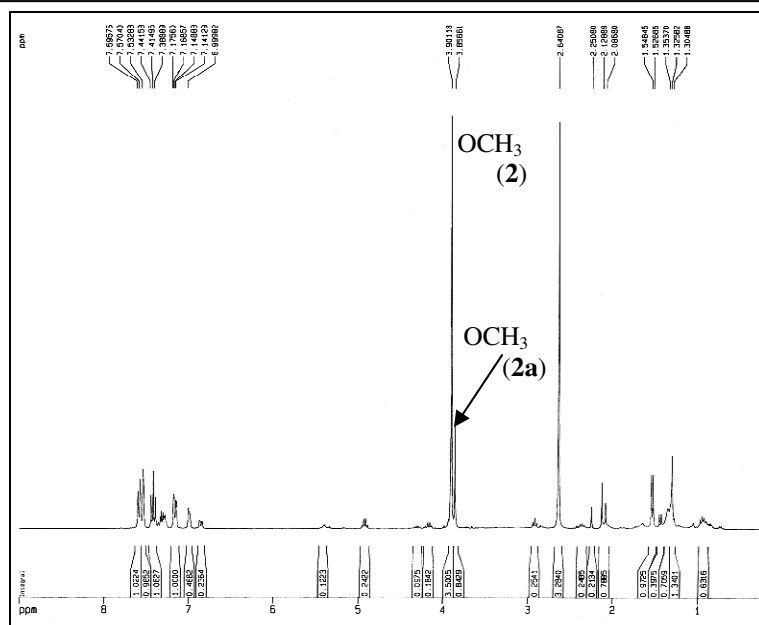


Figura 25: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução da 3-metoxi-acetofenona (**2**) com CC

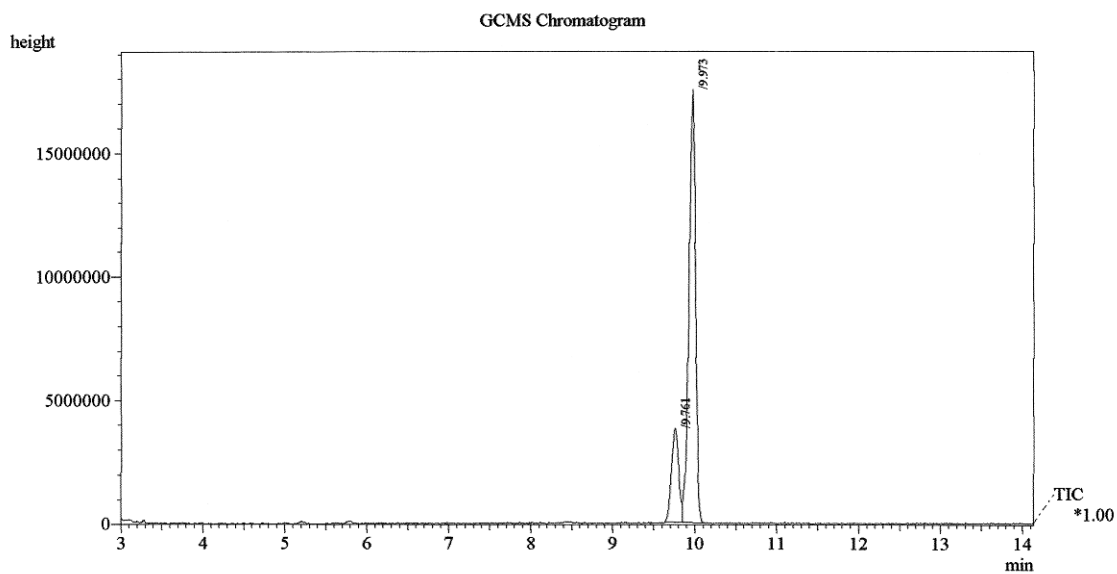


Figura 26: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução da 3-metoxi-acetofenona (**2**) com CC

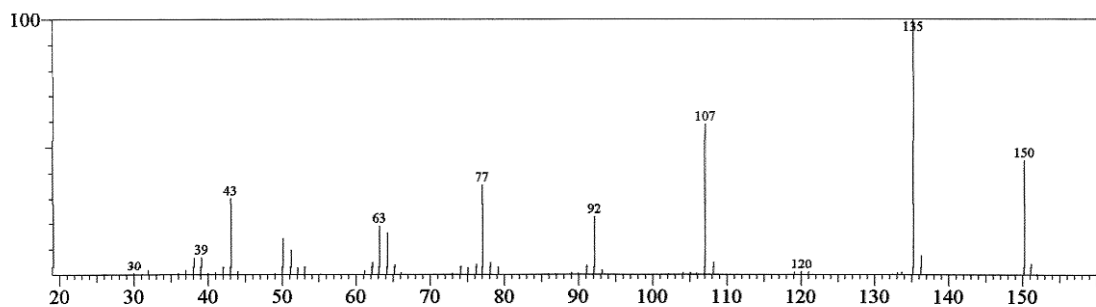


Figura 27: Espectro de massa da 3-metoxi-acetofenona (**2**), tr: 9,97 min

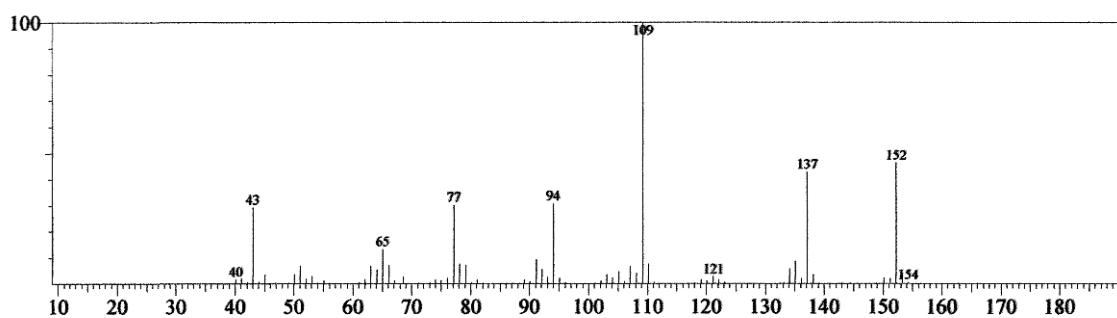


Figura 28: Espectro de massa do 3-metoxi-1-feniletan-1-ol (**2a**), tr: 9,76 min

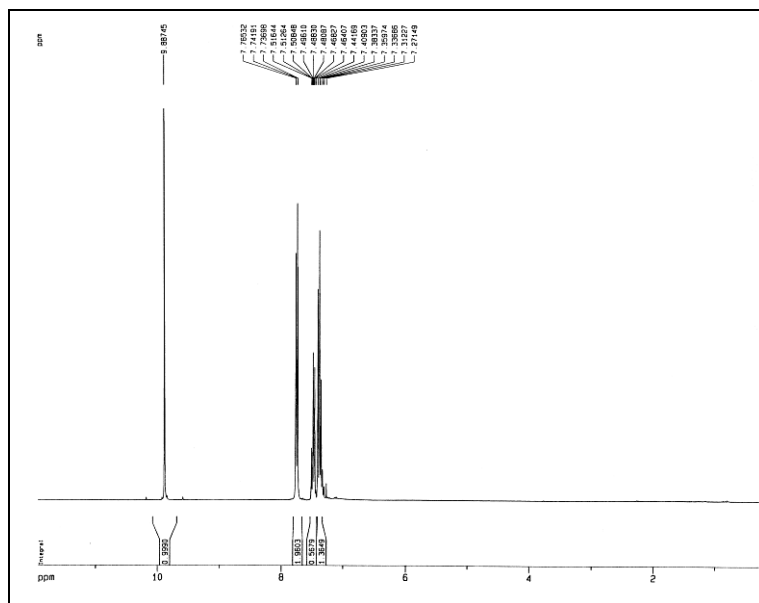


Figura 29: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do benzaldeído (**3**) padrão

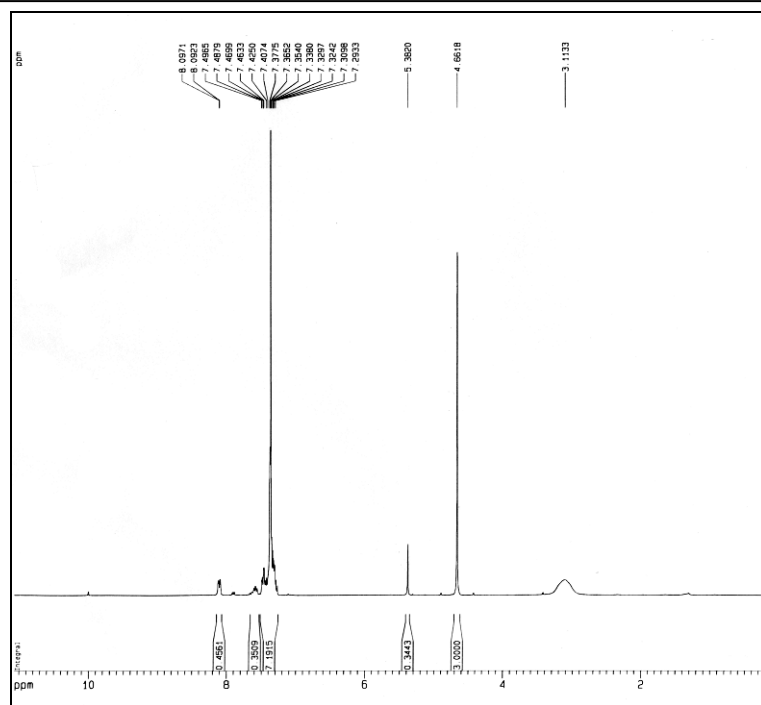


Figura 30: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do álcool benzílico (**3a**) padrão

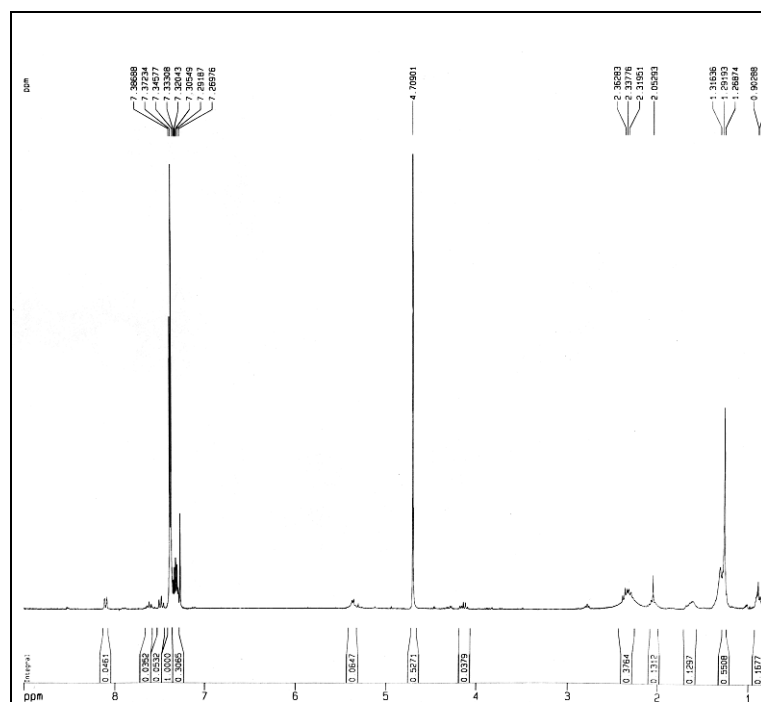


Figura 31: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução do benzaldeído (**3**) com CC

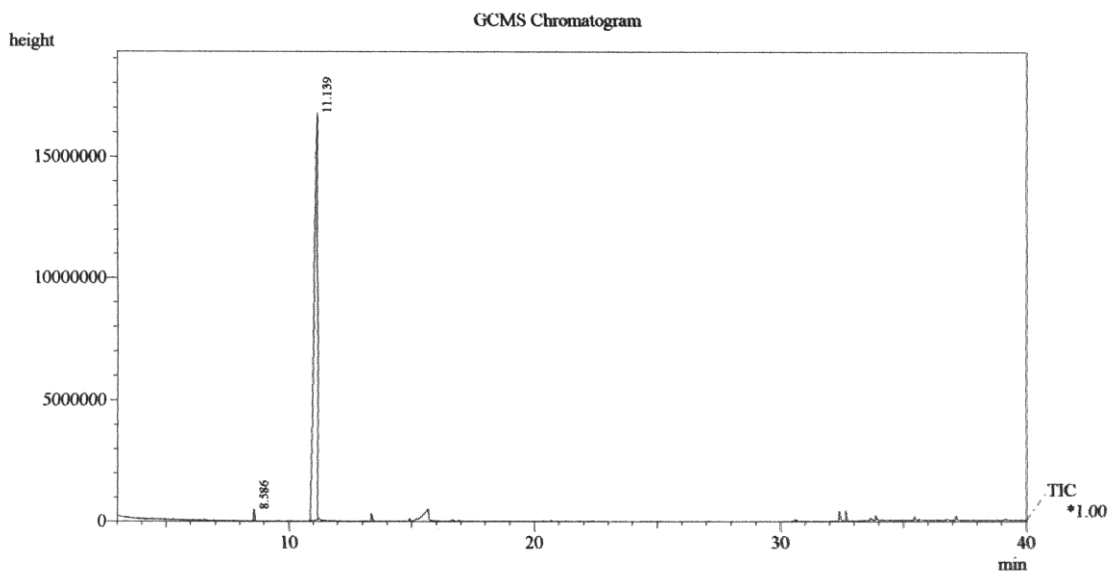


Figura 32: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução do benzaldeído (**3**) com CC

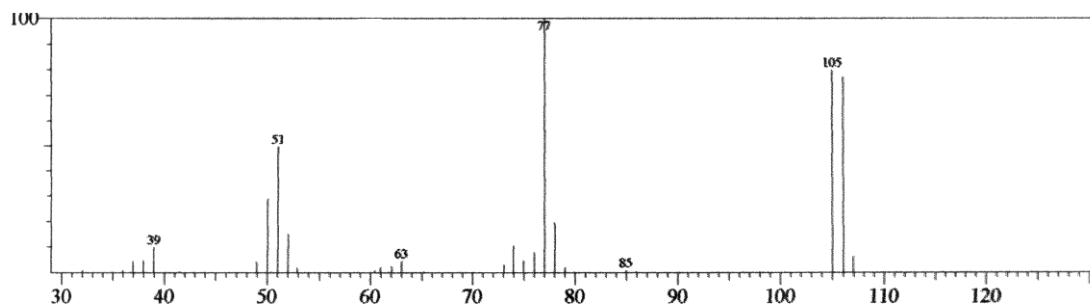


Figura 33: Espectro de massa do benzaldeído (**3**), tr: 8,59 min

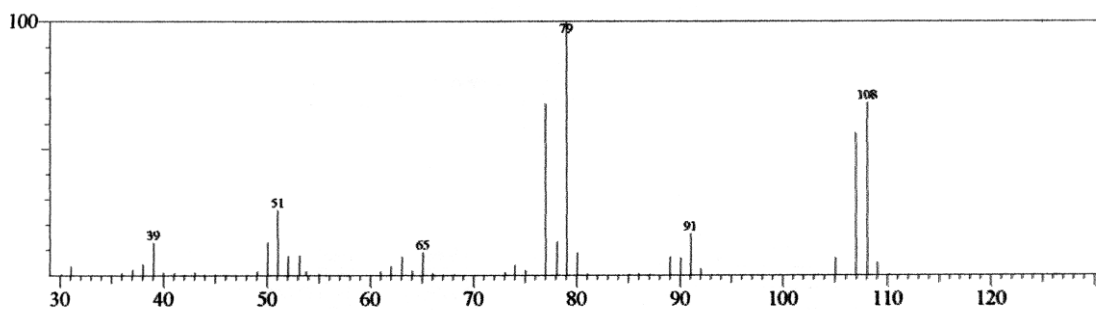


Figura 34: Espectro de massa do álcool benzílico (**3a**), tr: 11,14 min

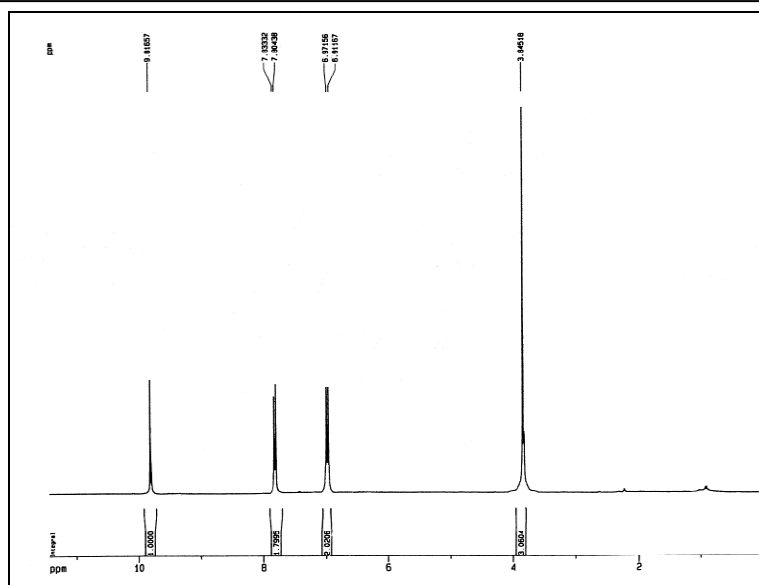


Figura 35: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do padrão anisaldeído (4)

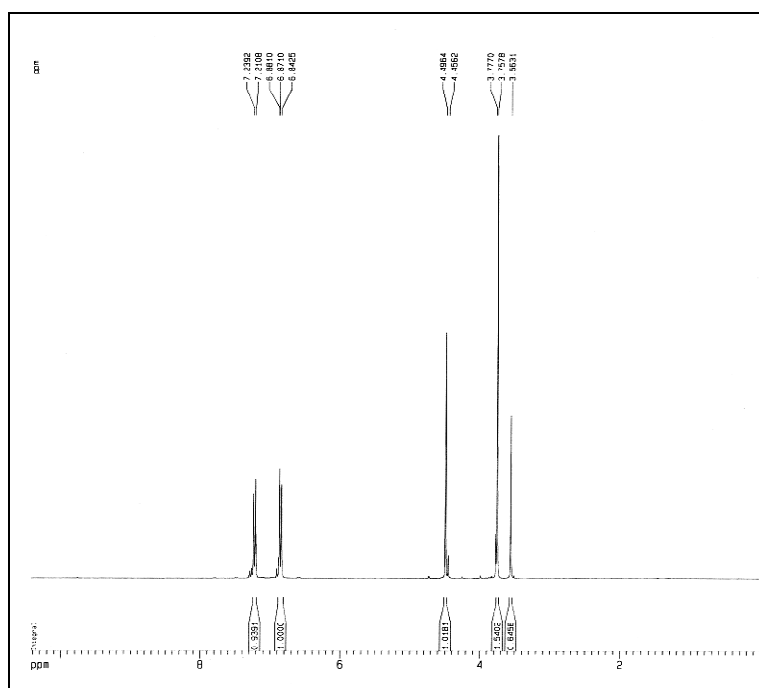


Figura 36: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do padrão álcool anísico (4a)

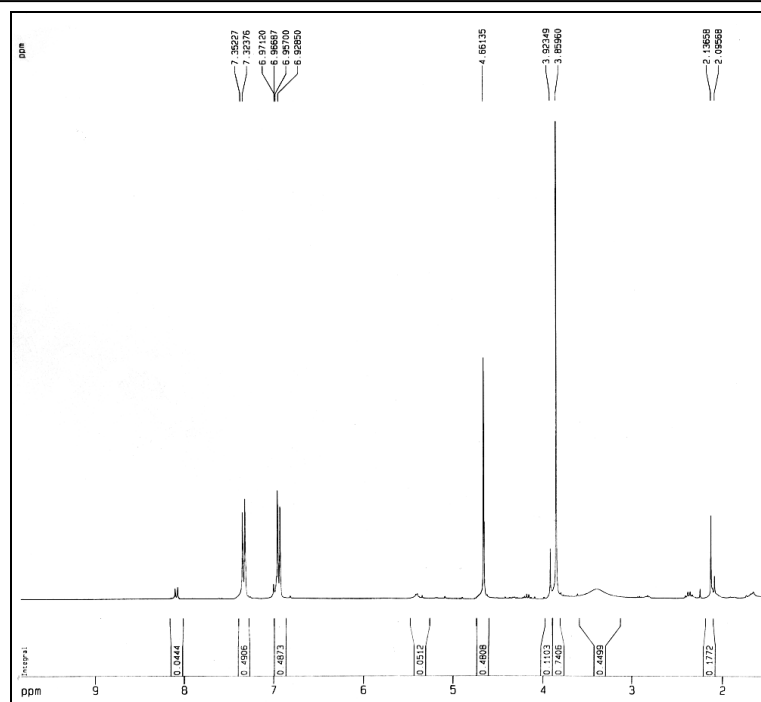


Figura 37: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução do anisaldeído (4) com CC

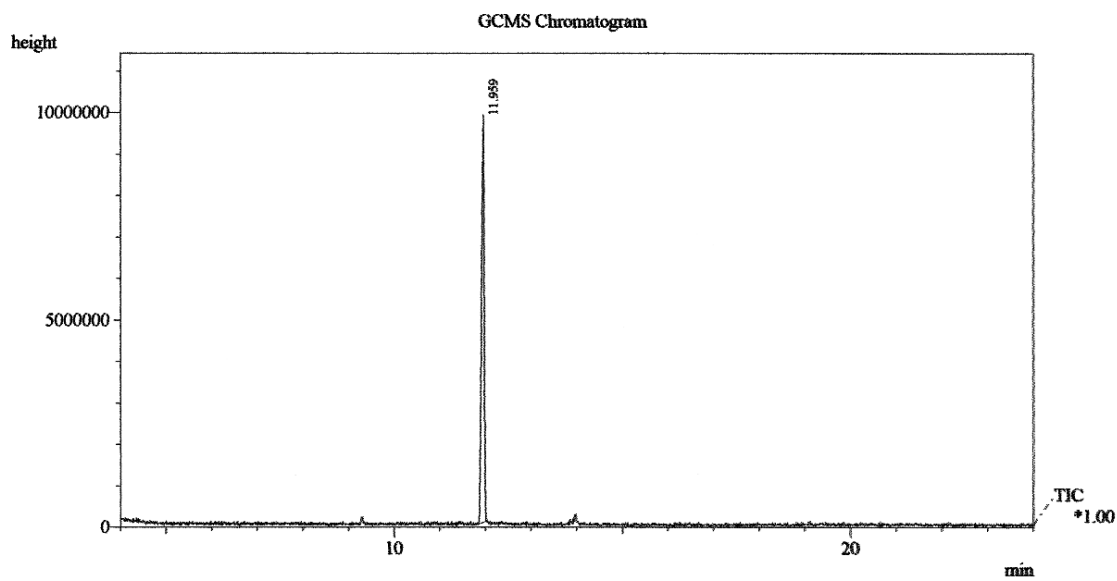


Figura 38: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução do anisaldeído (4) com CC

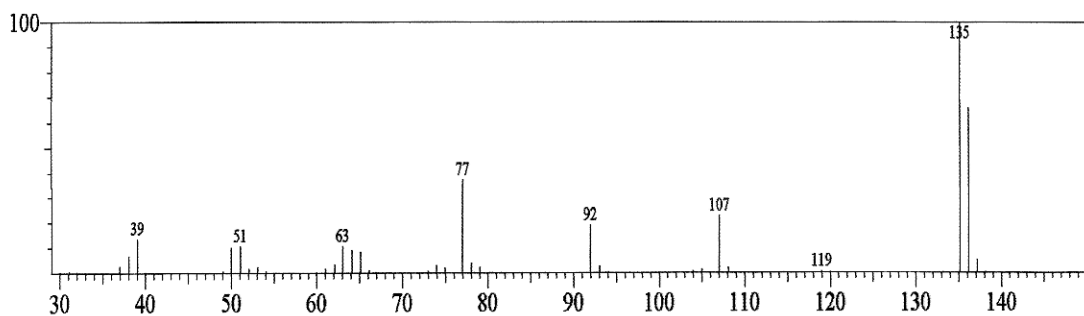


Figura 39: Espectro de massa do anisaldeído (4)

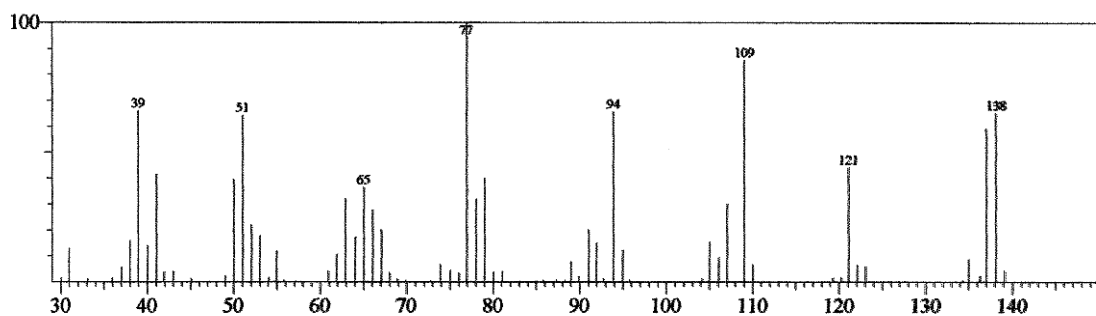


Figura 40: Espectro de massa do álcool anísico (4a), tr: 11,96 min

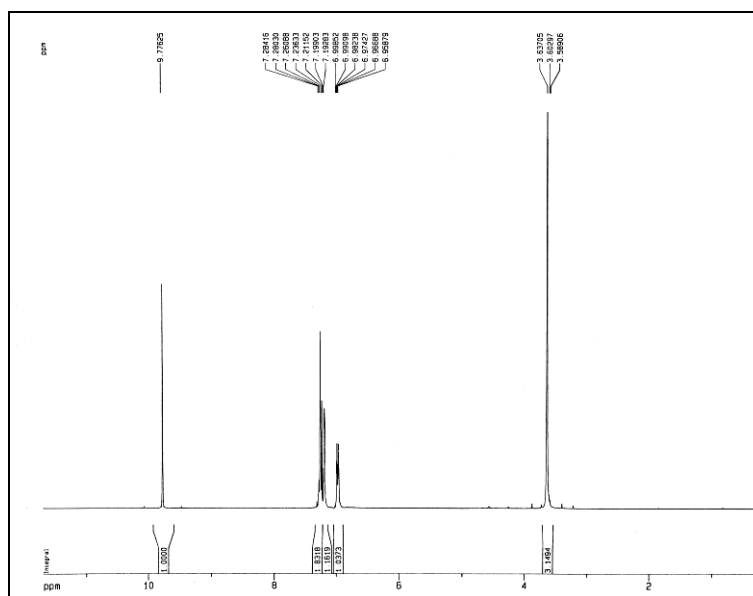


Figura 41: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão m-anisaldeído (5)

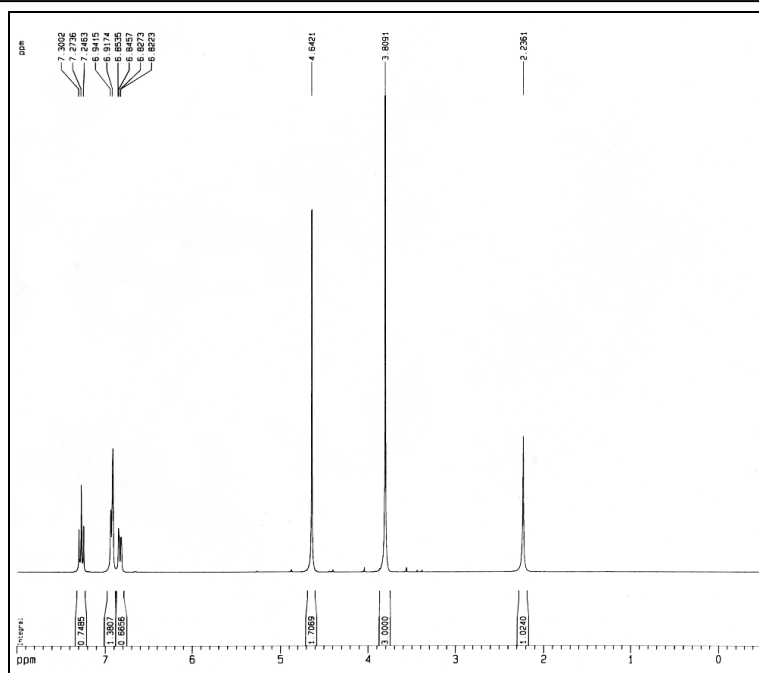


Figura 42: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão álcool 3-metoxi-benzílico (**5a**)

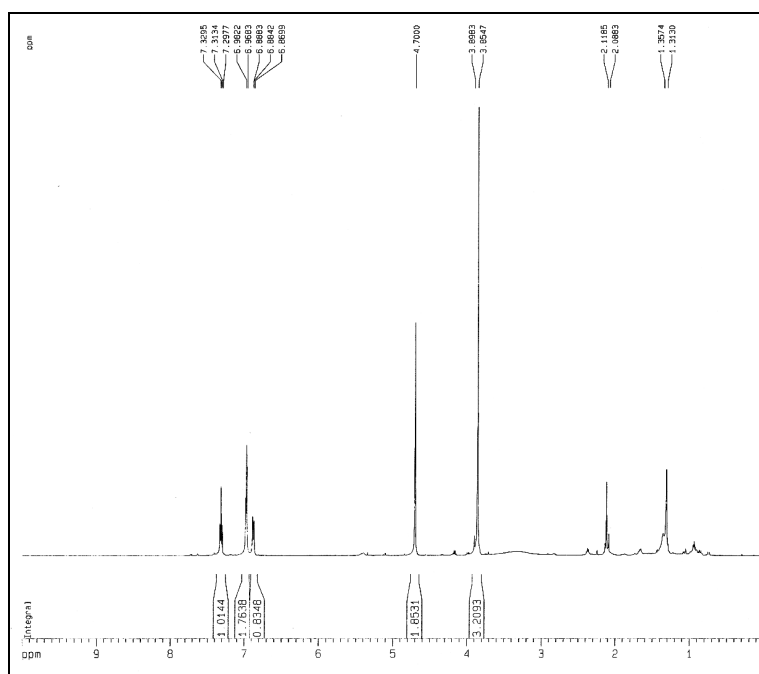


Figura 43: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução do m-anisaldeído (**5**) com CC

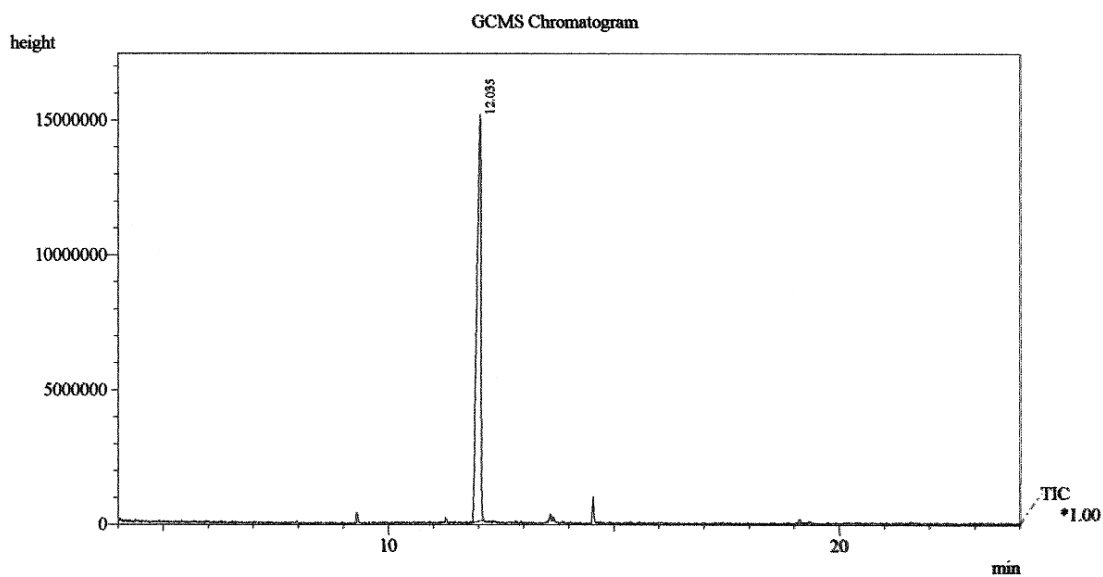


Figura 44: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução do m-anisaldeído (**5**) com CC

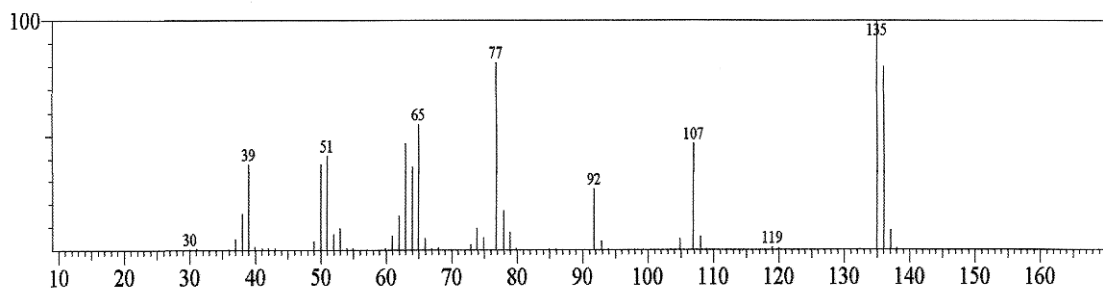


Figura 45: Espectro de massa do m-anisaldeído (**5**)

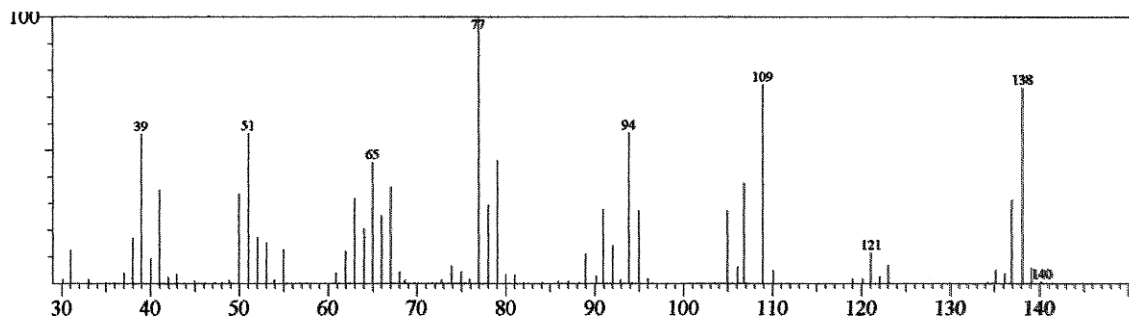


Figura 46: Espectro de massa do álcool 3-metoxi-benzílico (**5a**), tr: 12,03 min

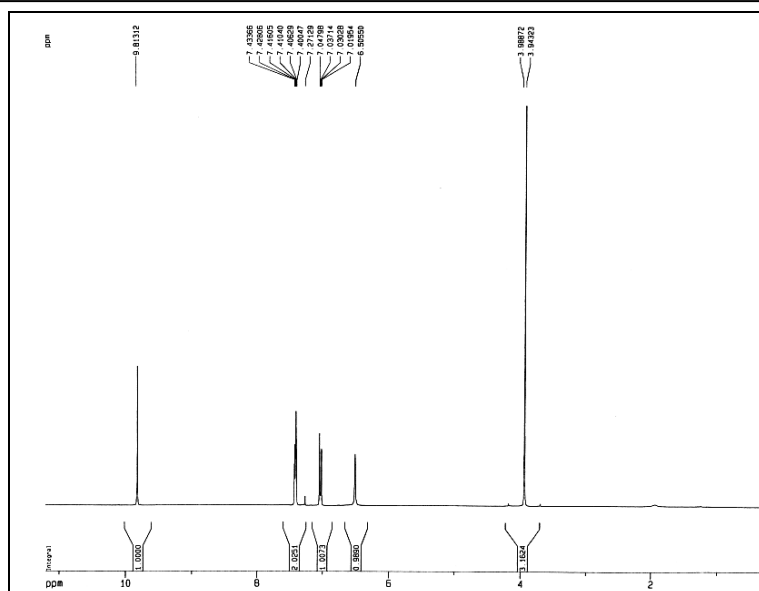


Figura 47: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do padrão vanilina (6)

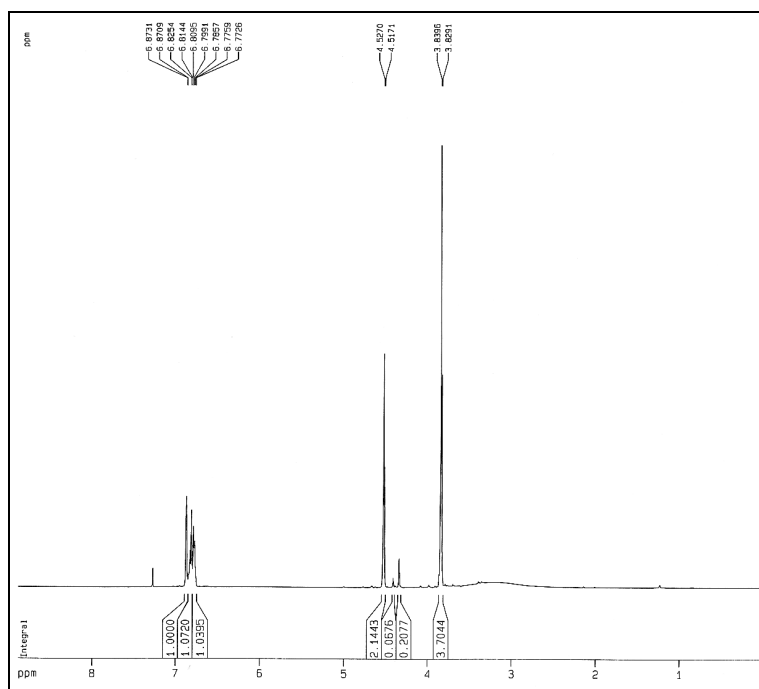


Figura 48: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do padrão álcool vanílico (6a)

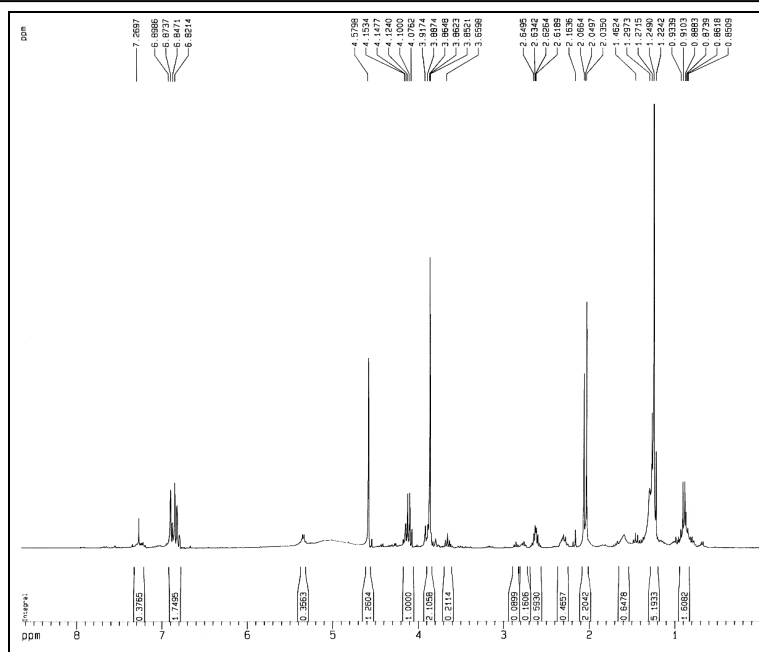


Figura 49: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução da vanilina (6) (sem dissolução em DMSO) com CC

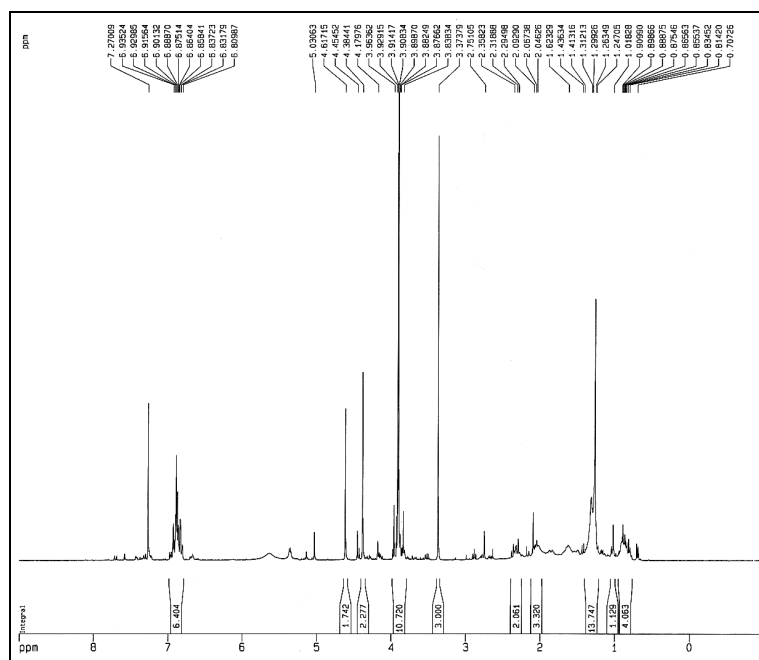


Figura 50: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução da vanilina (6) (com dissolução em DMSO) com CC

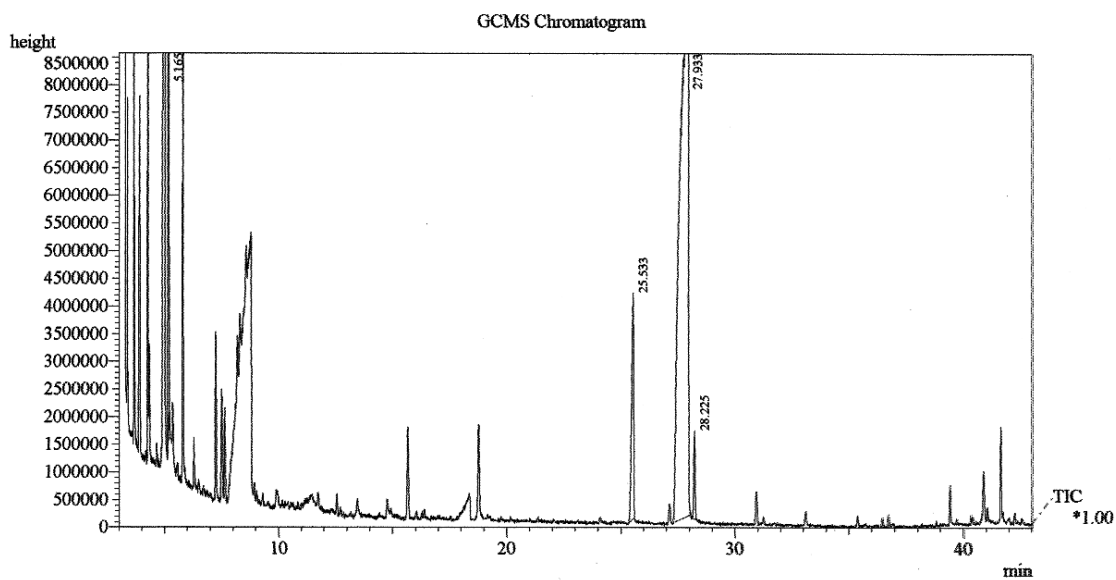


Figura 51: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na vanilina (6) (sem dissolução em DMSO) com CC

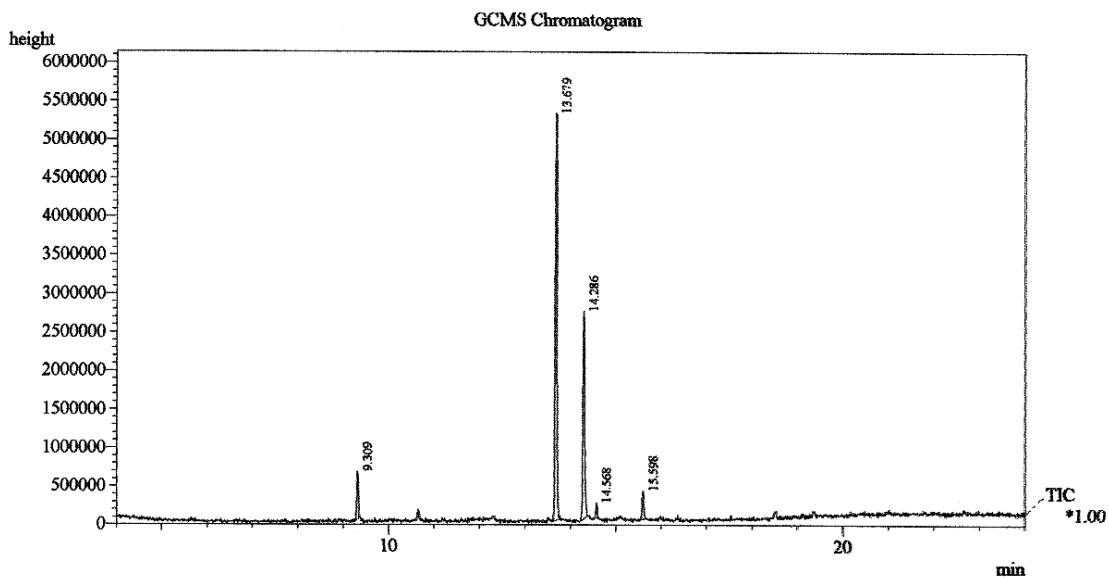


Figura 52: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na vanilina (6) (com dissolução em DMSO) com CC

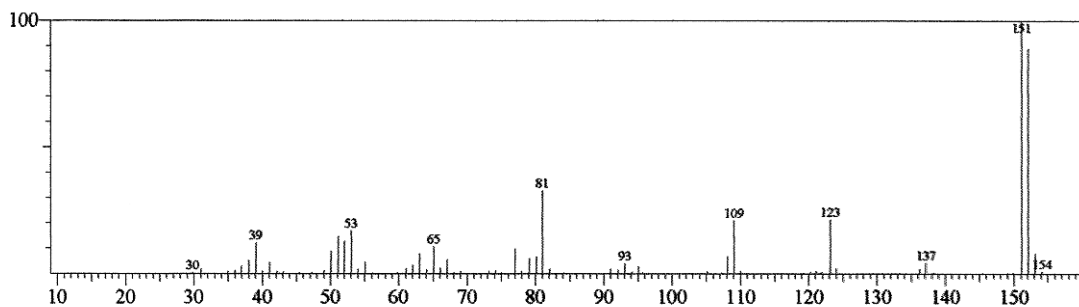


Figura 53: Espectro de massa da vanilina (6), tr: 25,53 min (Fig. 51)

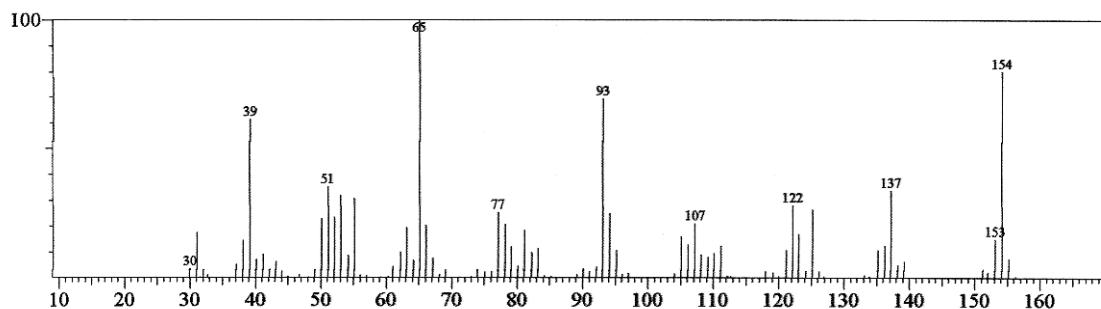


Figura 54: Espectro de massa do álcool vanílico (6a), tr: 27,93 min (Fig. 51) e tr: 14,29 min (Fig. 52)

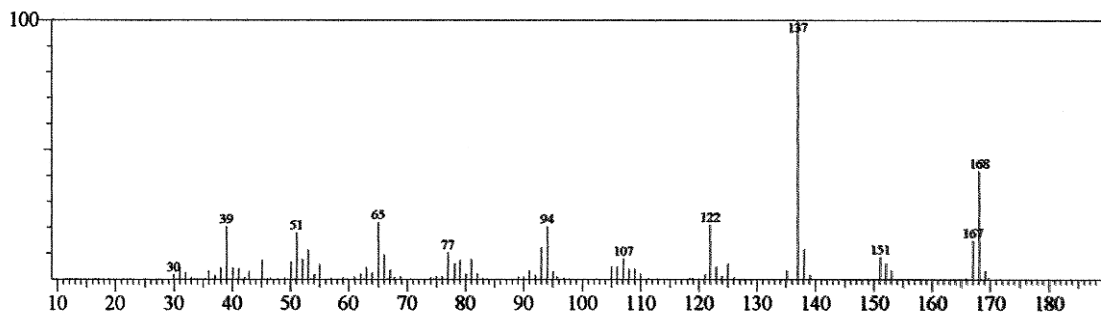


Figura 55: Espectro de massa do éter etil vanílico (6b), tr: 13,68 min (Fig. 52)

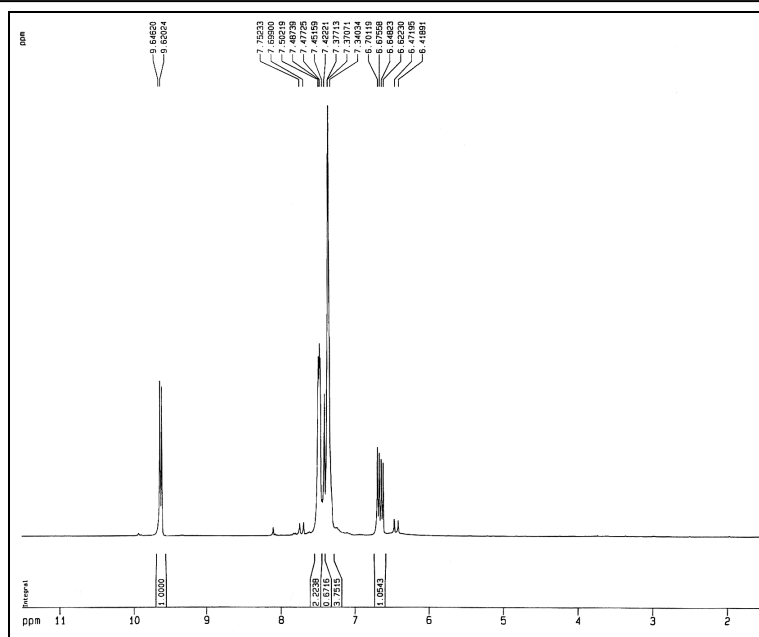


Figura 56: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do padrão cinamaldeído (7)

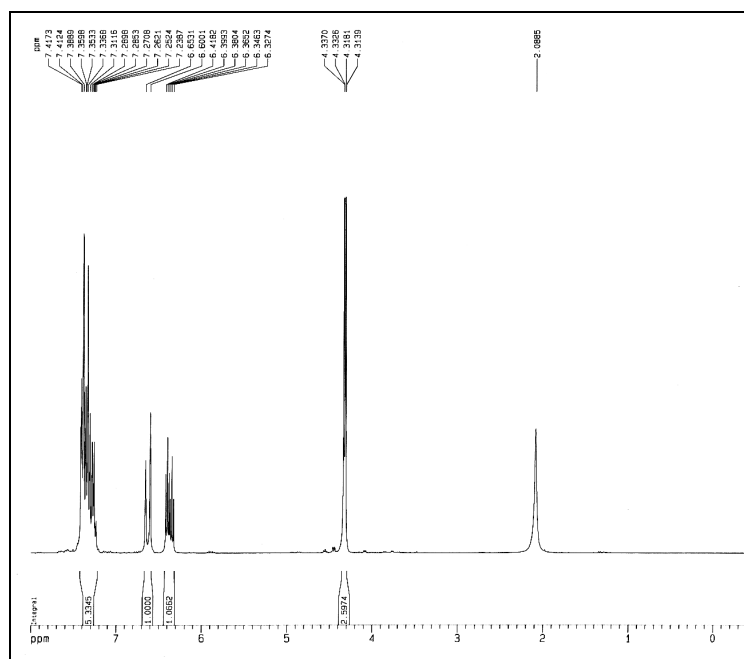


Figura 57: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do padrão álcool cinâmico (7a)

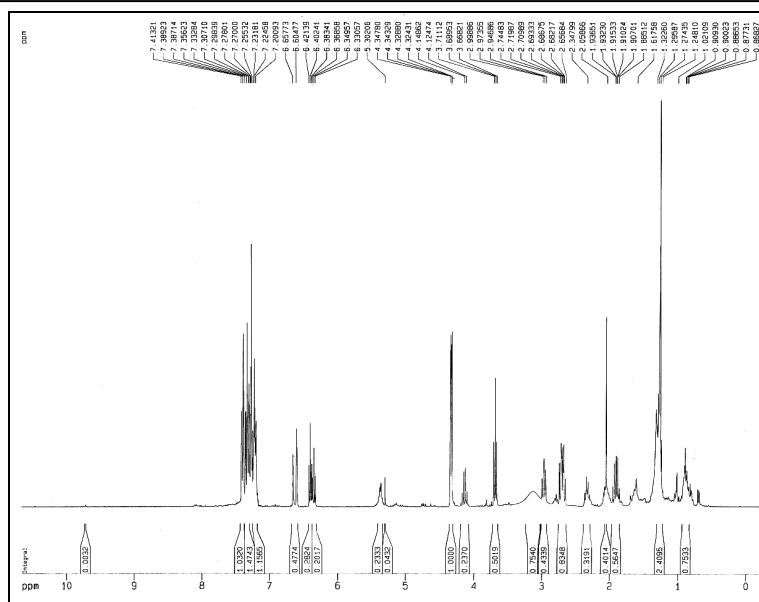


Figura 58: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução do cinamaldeído (7) com CC

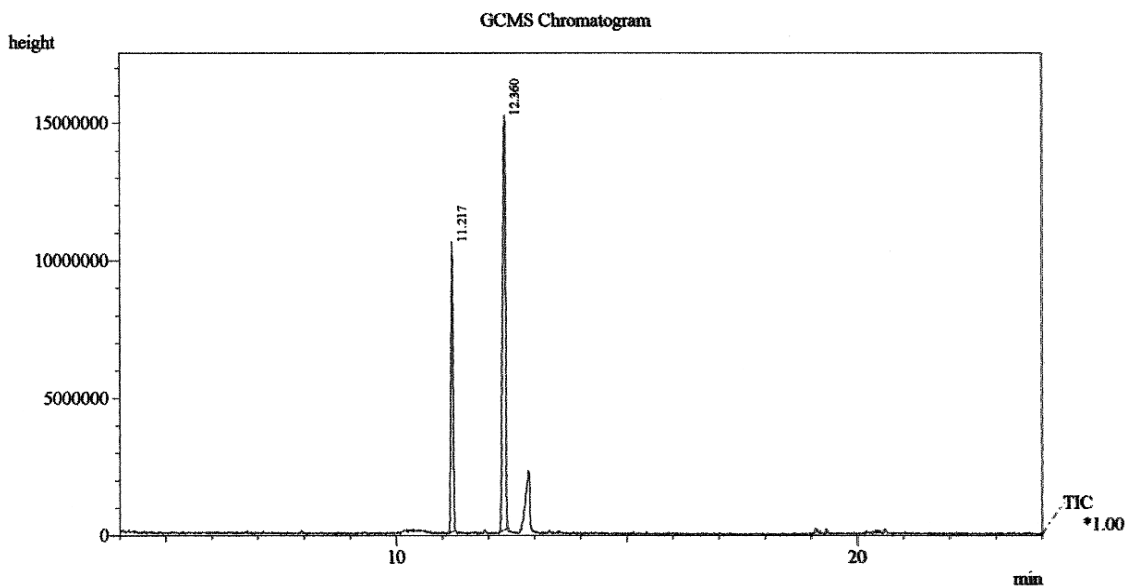


Figura 59: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução do cinamaldeído (7) com CC

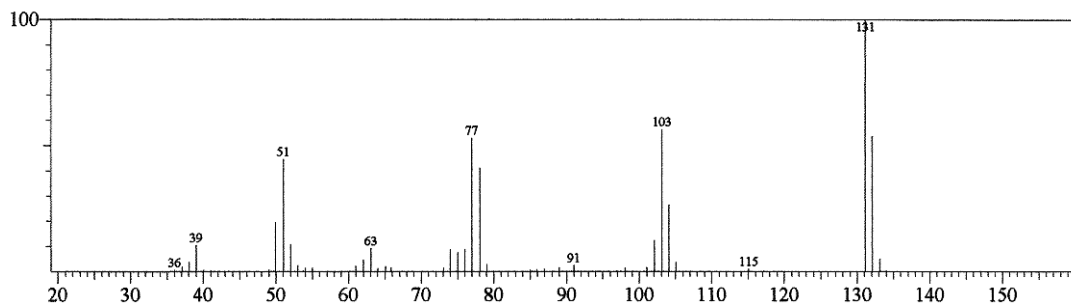


Figura 60: Espectro de massa do cinamaldeído (**6**)

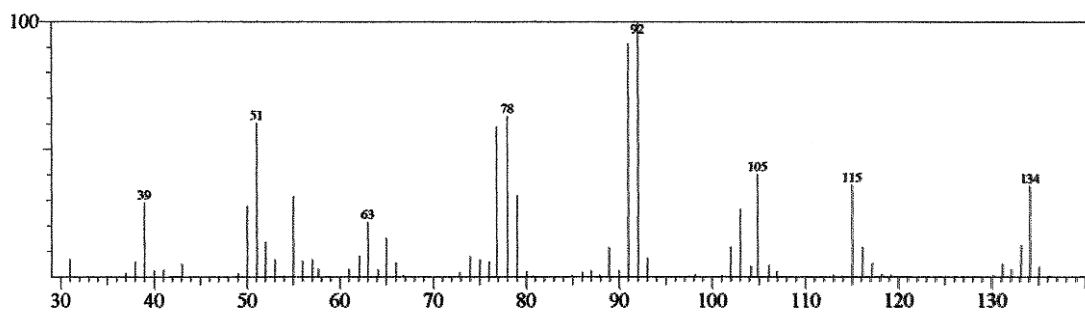


Figura 61: Espectro de massa do álcool cinâmico (**6a**), tr: 12,36 min

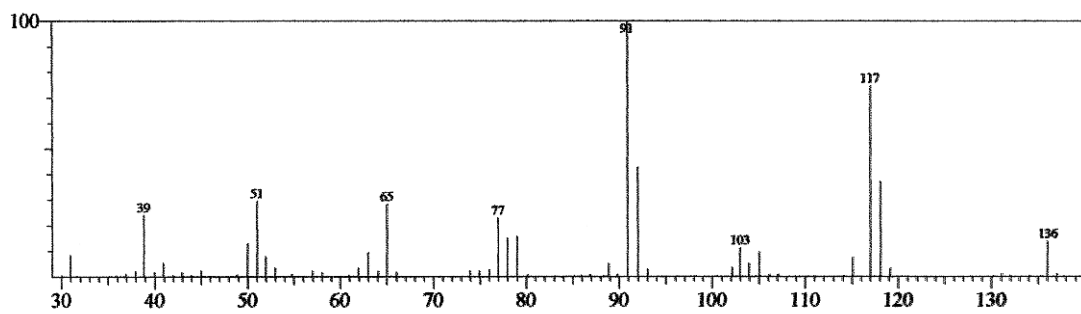


Figura 62: Espectro de massa do álcool dihidrocinâmico (**6b**), tr: 11,22 min

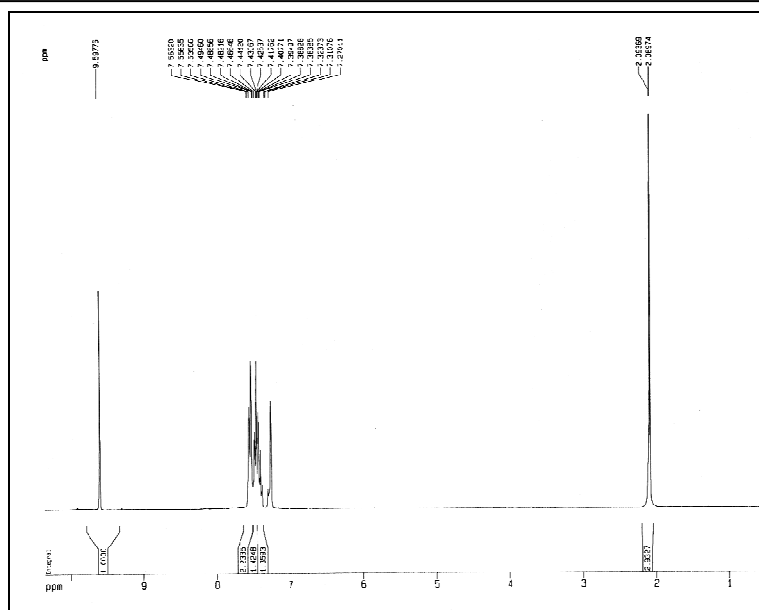


Figura 63: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do padrão α -metil-cinamaldeído (8)

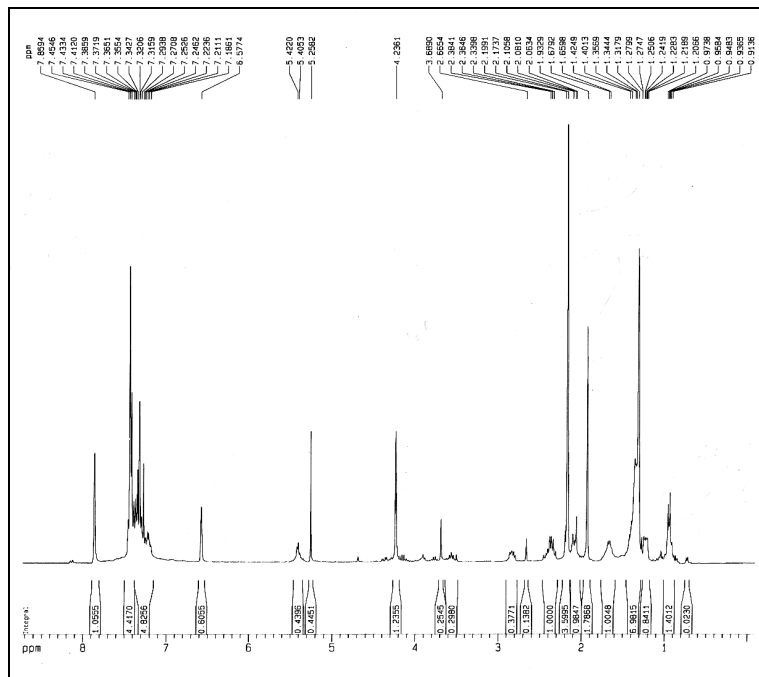


Figura 64: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da mistura obtida na biorredução do α -metil-cinamaldeído (8) com CC

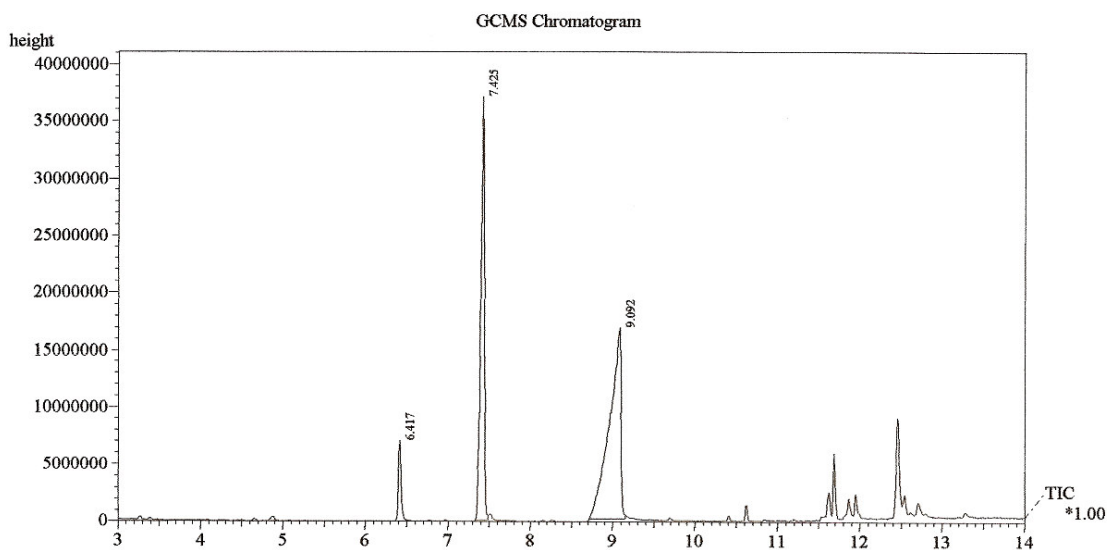


Figura 65: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução do α -metil-cinamaldeído (**8**) com CC

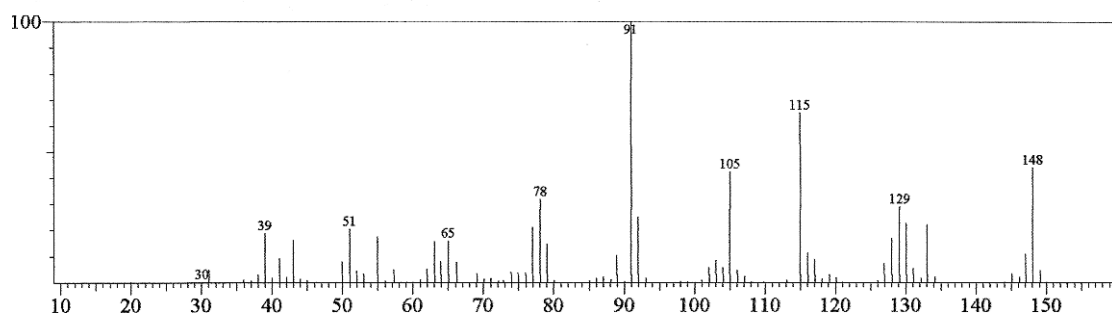


Figura 66: Espectro de massa do álcool α -metil-cinâmico (**8a**), tr: 7,42 min

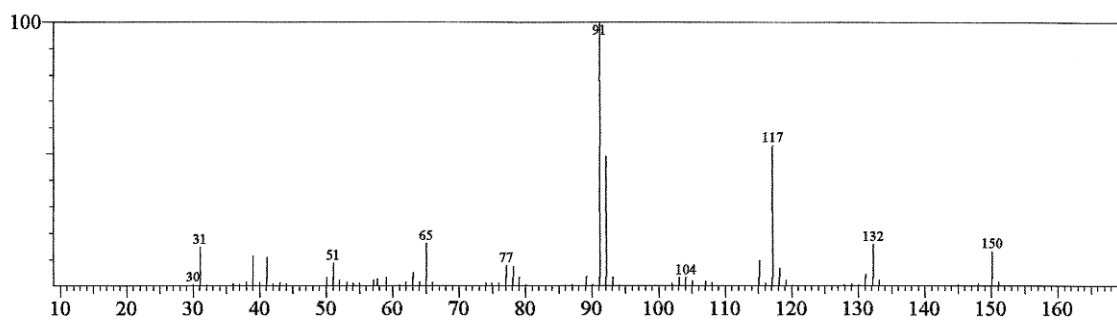


Figura 67: Espectro de massa do álcool dihidro- α -metil-cinâmico (**8b**), tr: 6,42 min

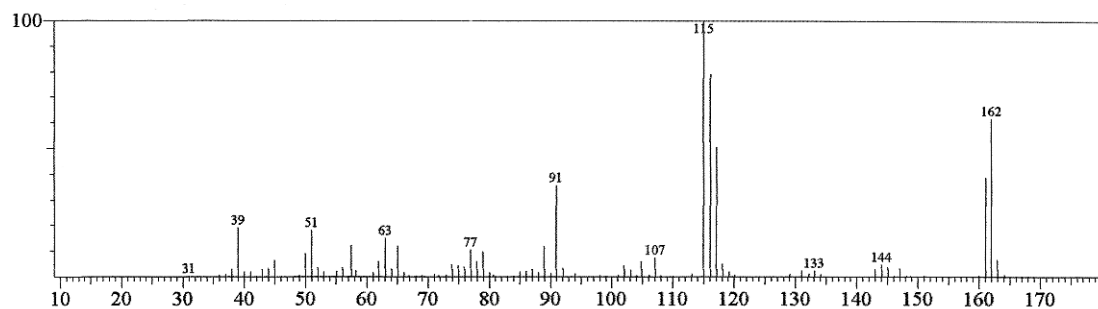


Figura 68: Espectro de massa do ácido α -metil-cinâmico (**8c**), tr: 9,09 min

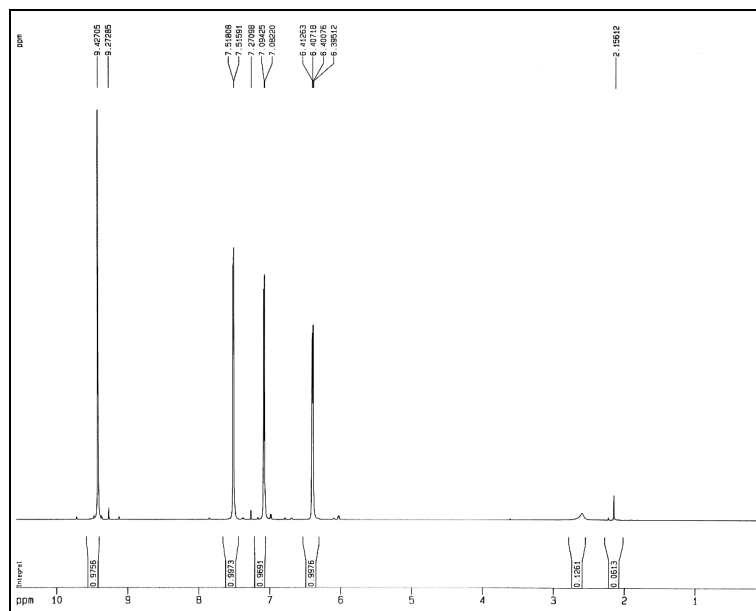


Figura 69: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão furfural (**9**)

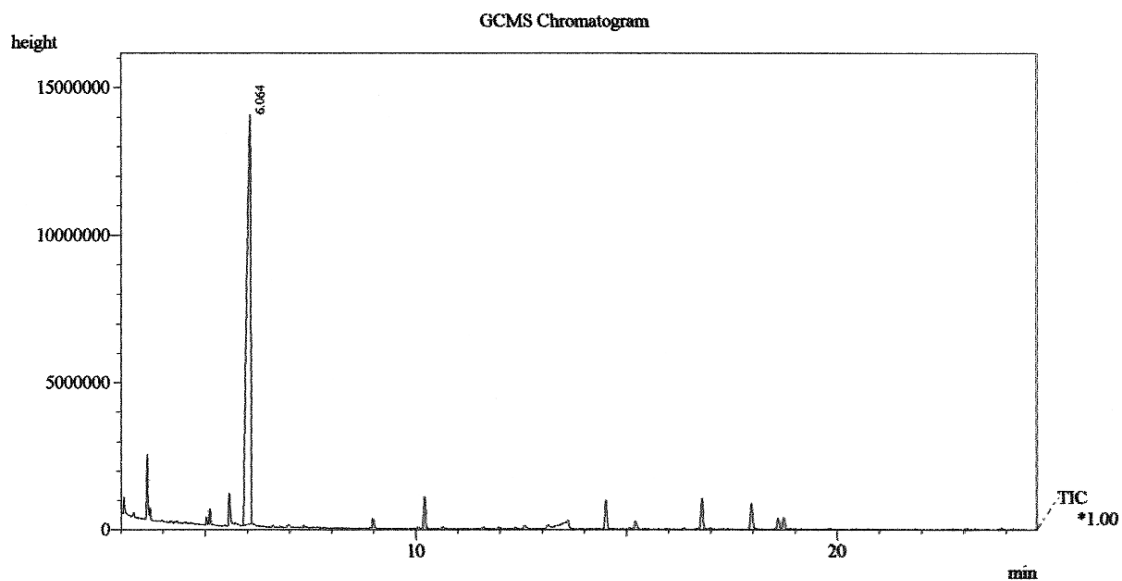


Figura 72: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução do furfural (9) com CC

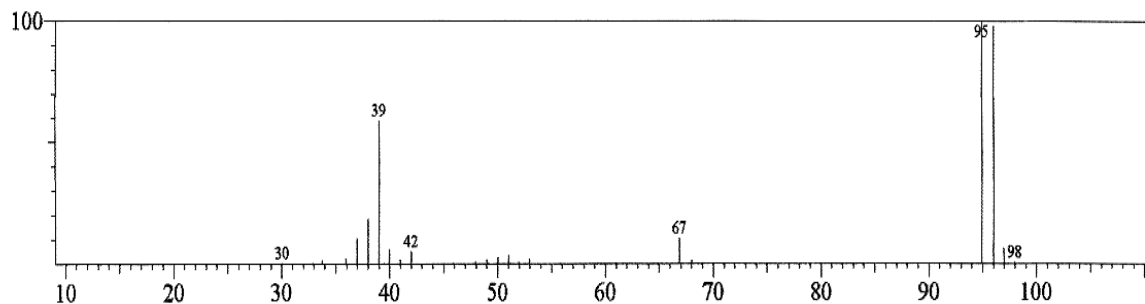


Figura 73: Espectro de massa do furfural (9)

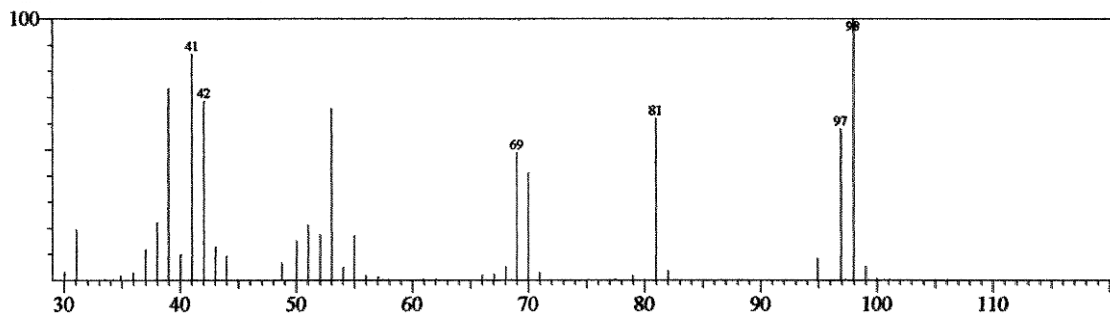


Figura 74: Espectro de massa do álcool furfurílico (9a), tr: 6,06 min

Os álcoois secundários enantiomericamente puros, constituem um grupo de compostos de grande interesse industrial, por exemplo, nas indústrias farmacêutica e de perfumaria, e que podem ser obtidos pela redução enantiosseletiva de cetonas pró-quirais e, onde várias estratégias biocatalíticas estão sendo desenvolvidas (CORDELL et al., 2007; DE CONTI, RODRIGUES e MORAN, 2001). As reações com os compostos selecionados que têm um grupamento cetona encontram-se no **Esquema 1** (p. 82). Para as cetonas **1** e **2**, a bioconversão forneceu os álcoois secundários correspondentes com rendimentos de conversão relativamente baixos (36,6% de **1a** e 17,7% **2a**). Contudo, a conversão ocorreu com enantiosseletividade moderadas, 56,7% ee (**Fig. 76**, p. 109) e 41,0% ee (**Fig. 78**, p. 110) foram obtidas para os enantiômeros *R* (**1a**) e *S* (**2a**), respectivamente. Os excessos enantioméricos (ee) foram calculados utilizando uma coluna quiral, e as configurações *R* e *S* para **1a** e **2a**, respectivamente, foram determinadas através da comparação dos valores da rotação ótica (α_D) obtidos por polarímetro com valores da literatura (CAREY e SUNDBERG, 1990). Os ee% foram calculados empregando fórmula padrão relacionada na literatura:

$$ee\% = \frac{A_{p. maior} - A_{p. menor}}{A_{p. maior} + A_{p. menor}} \times 100$$

$A_{p. maior}$ = área do pico maior
 $A_{p. menor}$ = área do pico menor

A configuração *S* atribuída ao álcool **2a** mostrou-se em acordo com o modelo de Prelog para biorredução de cetonas pró-quirais (YADAV et al., 2002). Por outro lado, a configuração *R* atribuída a **1a** está em discordância com esta regra. Além disso, foi observado que a acetofenona **1**, mais deficiente em elétrons, foi reduzida em maior extensão do que a acetofenona **2**, mais rica em elétrons (apresenta em grupo metoxila na posição meta).

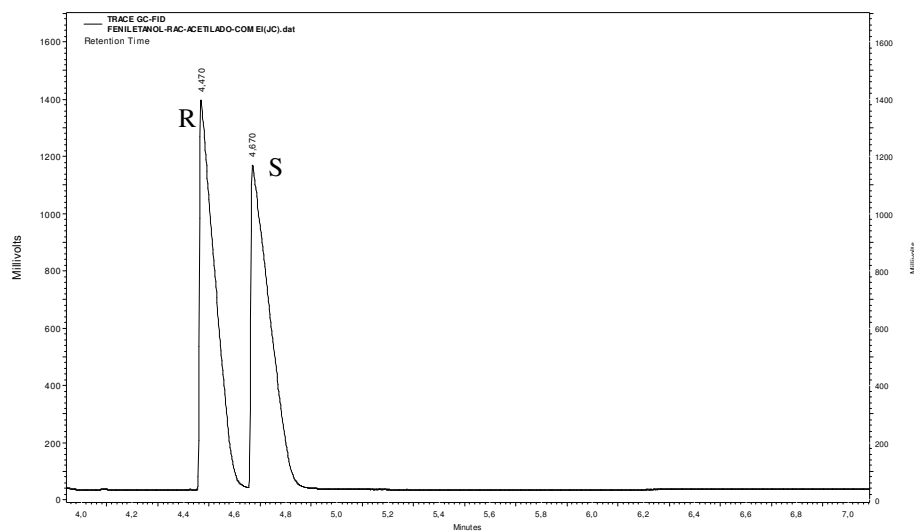


Figura 75: Cromatograma da mistura racêmica *R-1a* (tr: 4,47 min) e *S-1a* (tr: 4,67 min) obtida por redução com NaBH_4

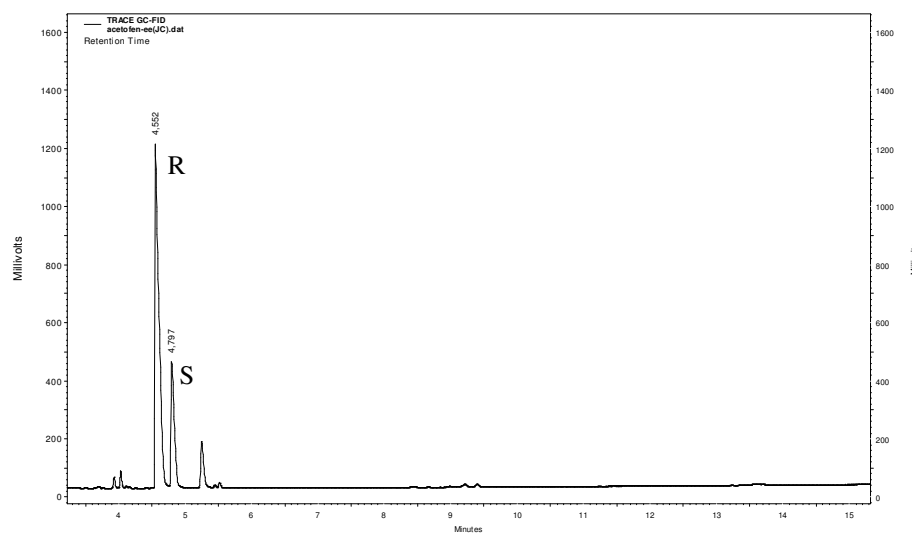


Figura 76: Cromatograma da mistura dos álcoois quirais *R-1a* (tr: 4,55 min) e *S-1a* (tr: 4,78 min) obtida por biorredução com CC

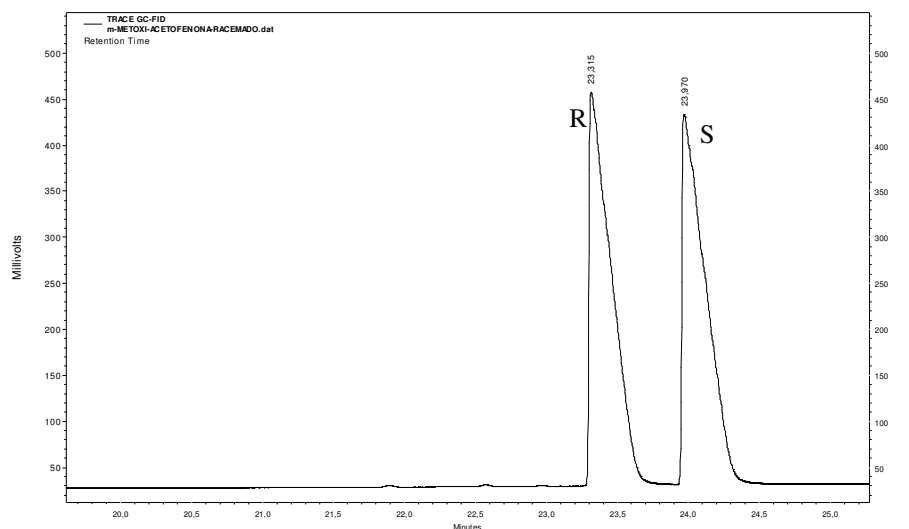


Figura 77: Cromatograma da mistura racêmica *R-2a* e *S-2a* obtida por redução com NaBH_4

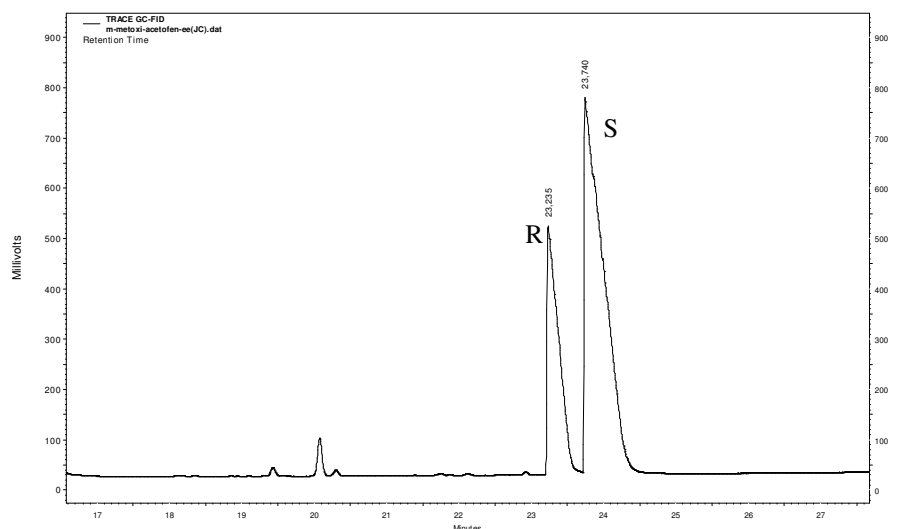


Figura 78: Cromatograma da mistura dos álcoois quirais *R-2a* (tr: 23,23 min) e *S-2a* (tr: 23,74 min) obtida por biorredução com CC

As reações enzimáticas foram estendidas às cetonas alifáticas 3-hexanona (**11**), ciclohexanona (**12**), ciclohexanona (**13**), pulegona (**14**), carvona (**15**) e o β -cetoéster, acetoacetato de etila (**16**) e, ao aldeído alifático citronelal (**10**) (**Esq. 2, p. 114**). Como observado anteriormente para os aldeídos aromáticos, o aldeído alifático citronelal (**10**) também apresentou elevado rendimento (100%) de conversão (**Tab. 51, p. 80**) e, em adição, também foi observada uma quimiosseletividade, onde a ligação olefínica não foi alterada. Uma excelente conversão

(100%) foi obtido com a cetona acíclica 3-hexanona (**11**), enquanto para as cetonas cíclicas ciclopentanona (**12**) (cinco membros) e ciclohexanona (**13**) (seis membros) foram observados rendimentos de conversão moderado (34,0%) e bom (81,2%), respectivamente. Os isômeros (*R* e *S*) resultantes da redução de **11** não puderam ser separados e, devido à sobreposição de sinais nos espectros de RMN ^1H , as misturas reacionais de **11**, **12** e **13** só puderam ser quantificadas por CG-EM. Os resultados encontram-se listados na **Tabela 51** (p. 80). Dentre as cetonas α,β -insaturadas trabalhadas, a pulegona (**14**) não demonstrou nenhuma reatividade frente ao CC, e para carvona (**15**), um rendimento de conversão muito baixo foi observado (2,5%). O baixo ee (25,7%) para o produto **15a** (carvol) (**Fig. 80**, p. 112) foi calculado usando uma coluna quiral, e a configuração *S* para **15a** foi estabelecida por comparação de sua rotação específica com o valor da literatura (VRIES et al., 1994; BLANCHARDA e DE WEGHEA, 2006).

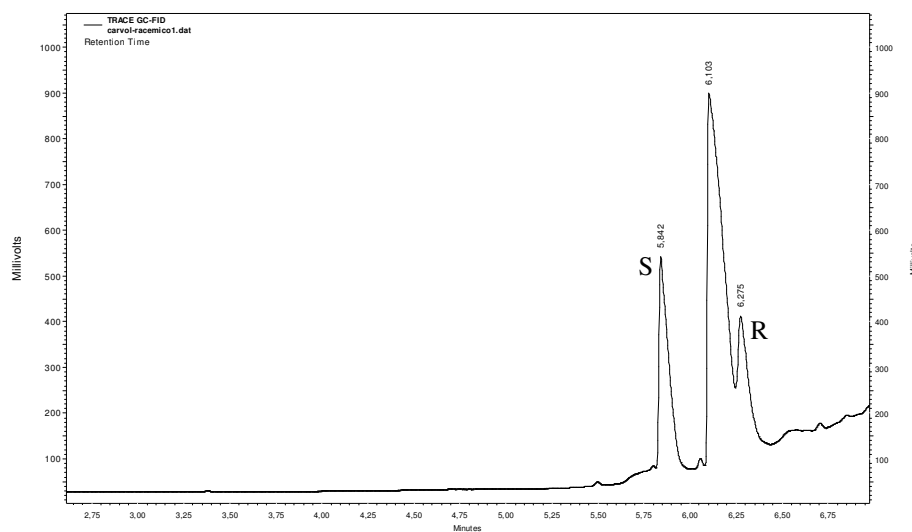


Figura 79: Cromatograma da mistura racêmica *R*-**15a** (tr: 6,27 min) e *S*-**15a** (tr: 5,84 min) obtida por redução com NaBH_4

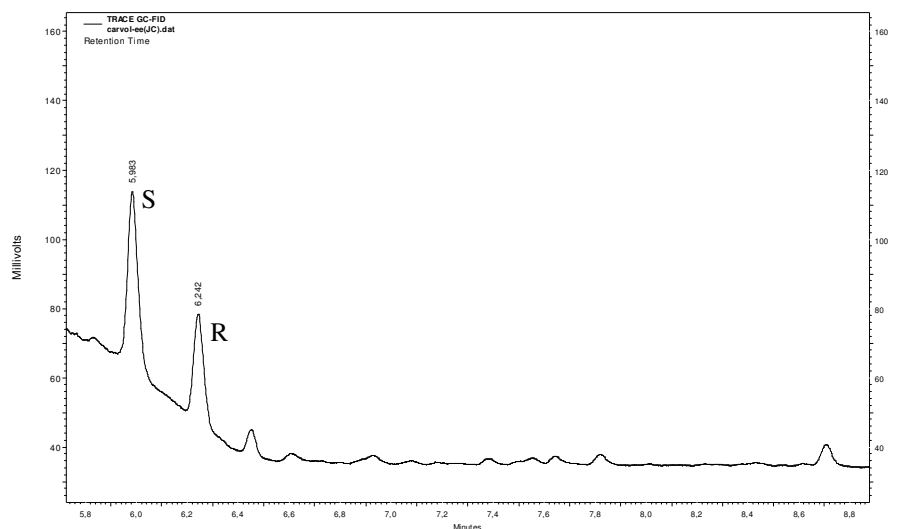


Figura 80: Cromatograma da mistura dos álcoois quirais *R*-15a (tr: 6,24 min) e *S*-15a (tr: 5,98 min) obtida por biorredução com CC

O sistema de enzimas redutase do CC também foi avaliado frente ao acetoacetato de etila (**16**), um β -cetoester. Neste caso, foi observada uma completa quimio e enantiosseletividade, com redução exclusiva do grupo cetônico produzindo o isômero 3*S*(+)-hidroxi-butanoato de etila (**16a**) com 100% de conversão e 100% de ee (*S*) (**Fig. 82, p. 113**). Para **16** e **16a**, as absorções selecionadas para integração no espectro de RMN ^1H foram as do grupo CH_2 alfa aos grupos carbonila e do hidrogênio de metínico do álcool secundário obtido. A configuração *S* de **16a** foi estabelecida por comparação de sua rotação específica com o valor da literatura (VRIES et al., 1994; BLANCHARDA e DE WEGHEA, 2006). Nesta série, como exemplo para discussão de dados de RMN ^1H , pode-se destacar no espectro (**Fig. 85, p. 116**) de **10a** obtido via biorredução, a ausência de sinal correspondente ao hidrogênio aldeídico [δ_{H} 9,74 no espectro (**Fig. 83, p. 115**) do citronelal], assim como, a presença do sinal em δ_{H} 3,58 devido aos hidrogênios carbinólicos, em acordo com o sinal em δ_{H} 3,66 no espectro (**Fig. 84, p. 115**) do citronelol, tomado como padrão. Os sinais selecionados nos espectros de RMN ^1H para os demais compostos (com exceção de **11-13**), foram registrados na **Tabela 52 (p. 132)**.

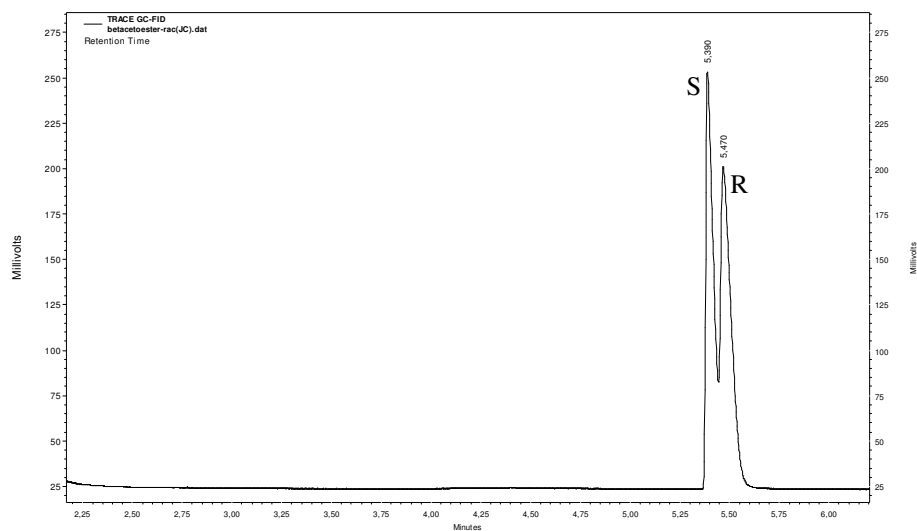


Figura 81: Cromatograma da mistura racêmica *R*-16a (tr: 5,47 min) e *S*-16a (tr: 5,39 min) obtida por redução com NaBH_4

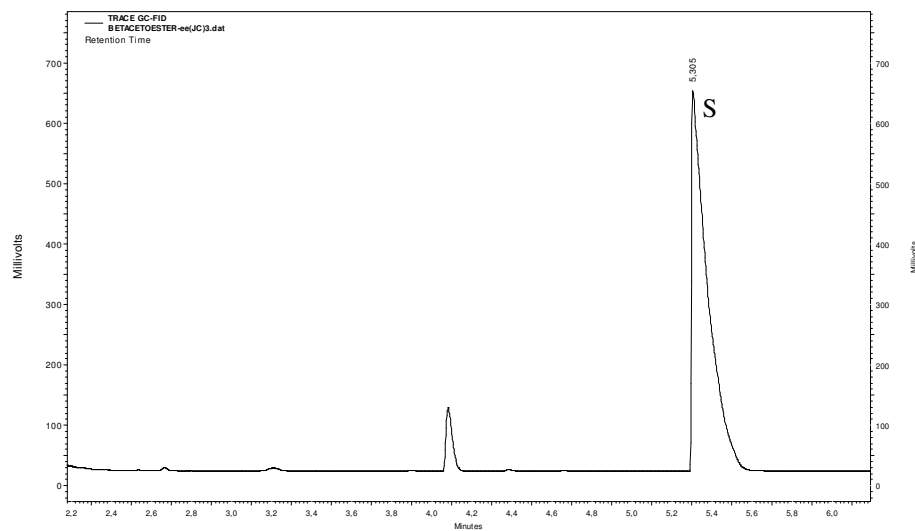
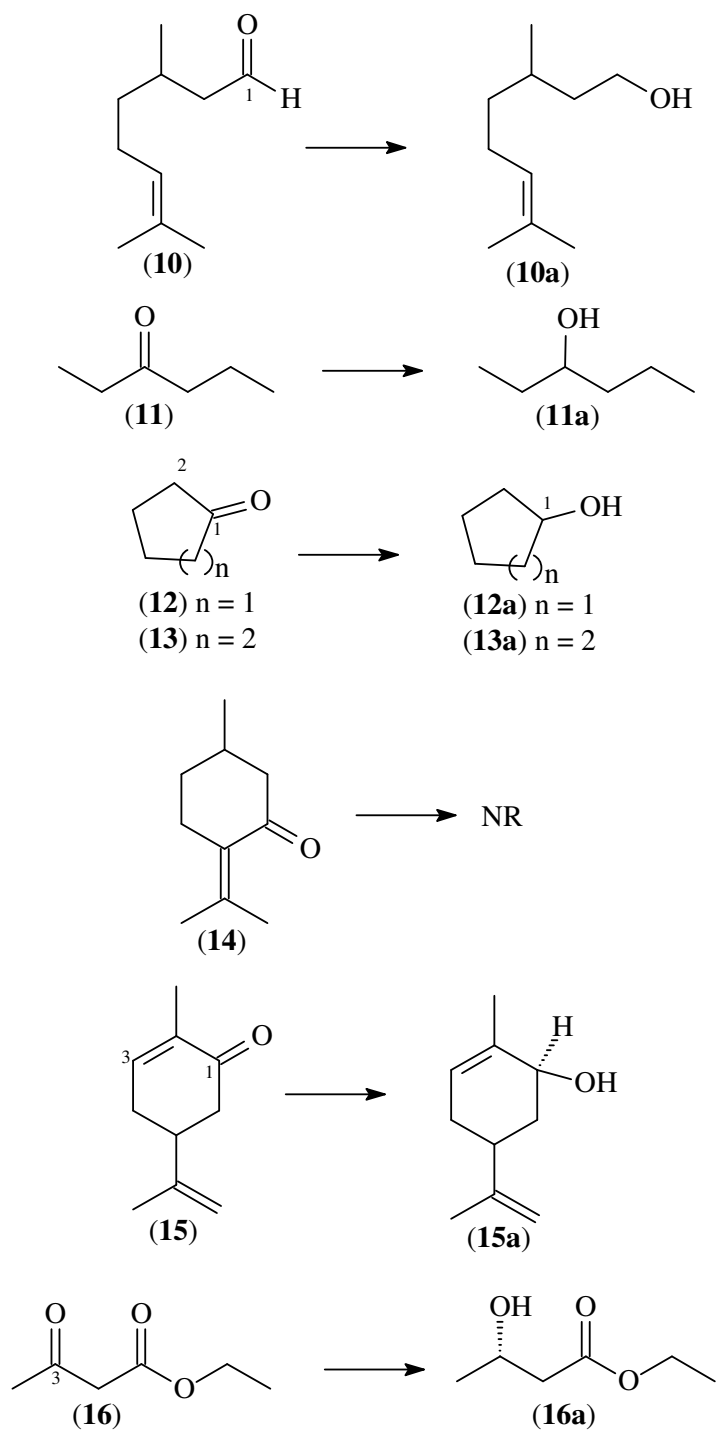


Figura 82: Cromatograma do álcool *S*-16a (tr: 5,30 min) obtida por biorredução com CC

Esquema 2



Abaixo são mostrados os espectros de RMN ^1H dos compostos de partida (**10-13**, **15** e **16**) (aldeído/cetonas) e dos respectivos alcoóis obtidos por redução com NaBH_4 , assim como, os espectros de RMN ^1H , cromatogramas CG-EM [tempo de retenção (tr) dado em minuto] e os espectros de massa dos produtos resultantes da biorredução dos compostos **10-13**, **15** e **16**.

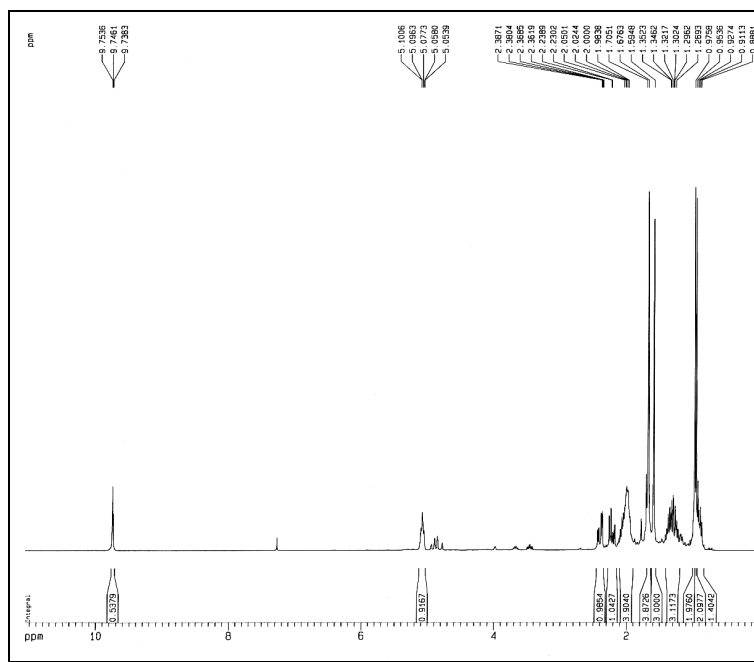


Figura 83: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão citronelal (**10**)

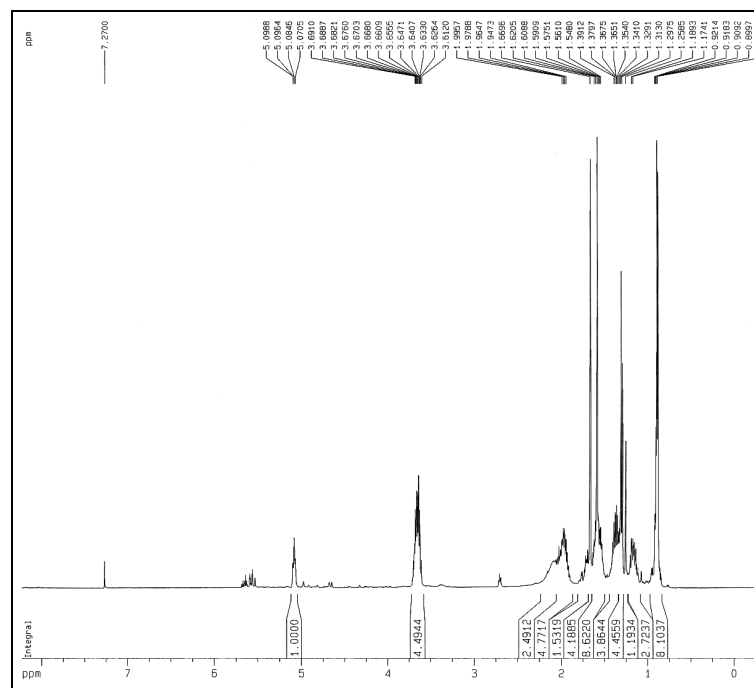


Figura 84: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do padrão citronelol (**10a**)

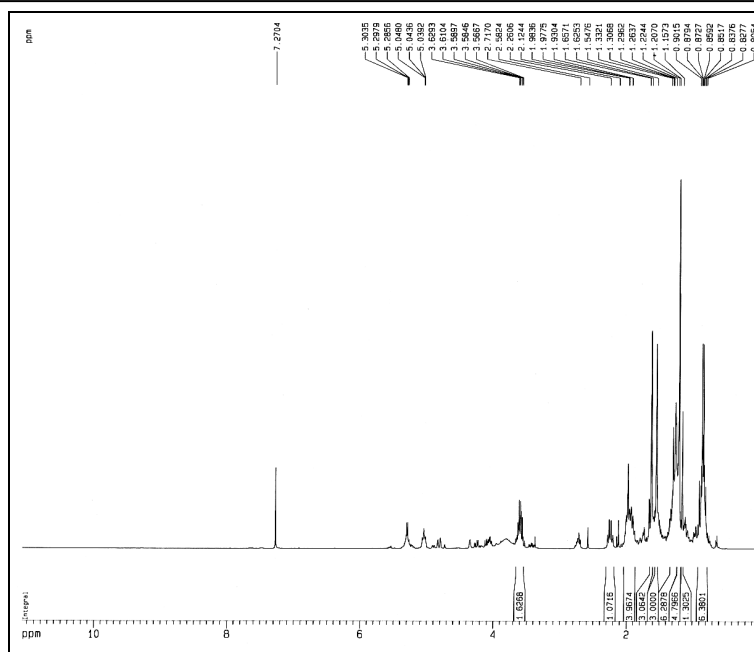


Figura 85: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução da citronelal (**10**) com CC

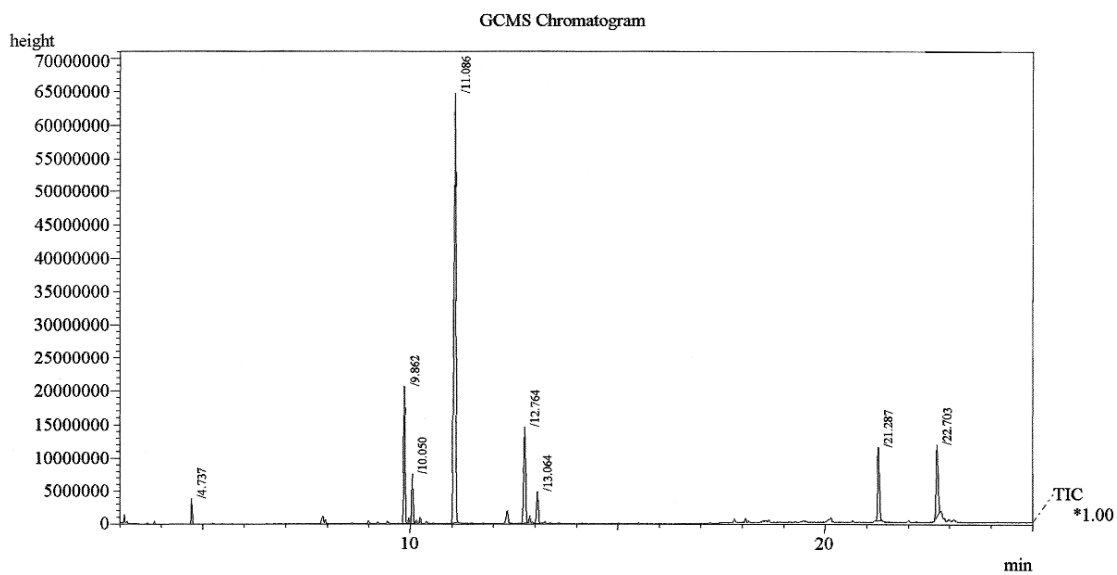


Figura 86: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução do citronelal (**10**) com CC

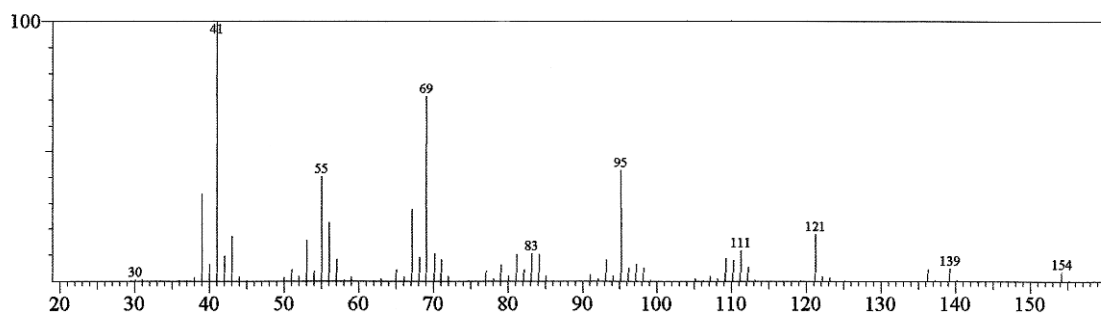


Figura 87: Espectro de massa do citronelal (10), tr: 9,98 min

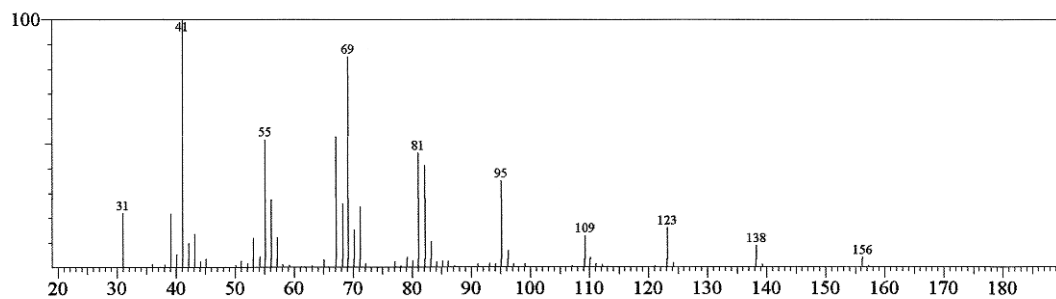


Figura 88: Espectro de massa do citronelol (10a), tr: 11,09 min

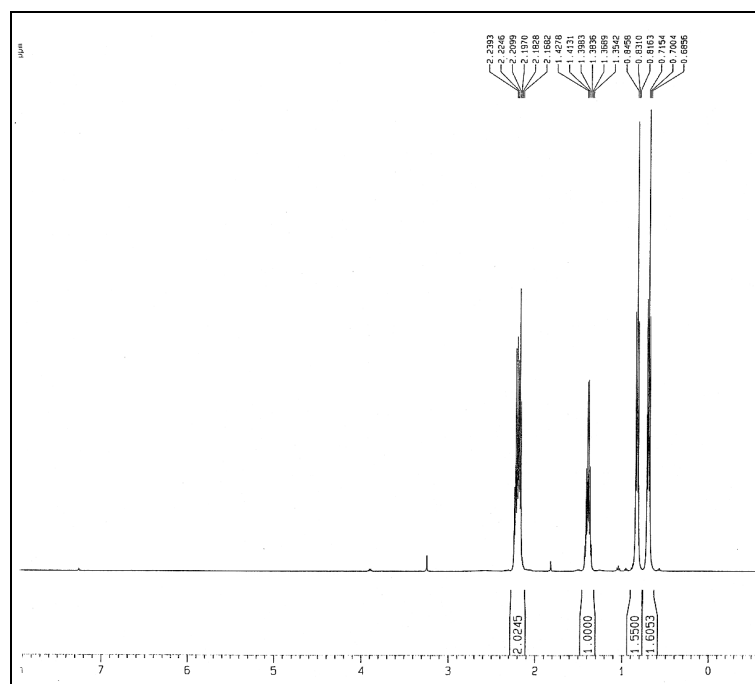


Figura 89: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do padrão 3-hexanona (11)

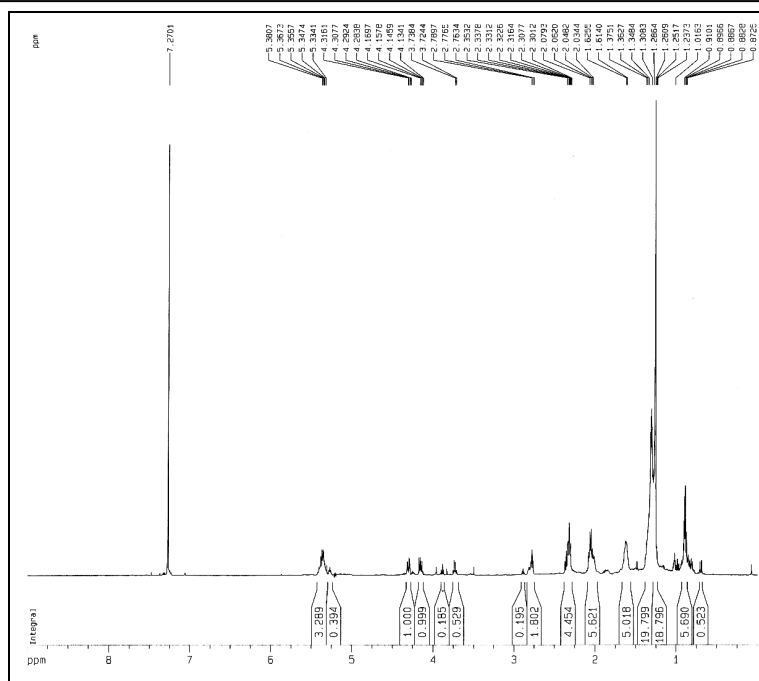


Figura 90: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução da 3-hexanona (**11**) com CC

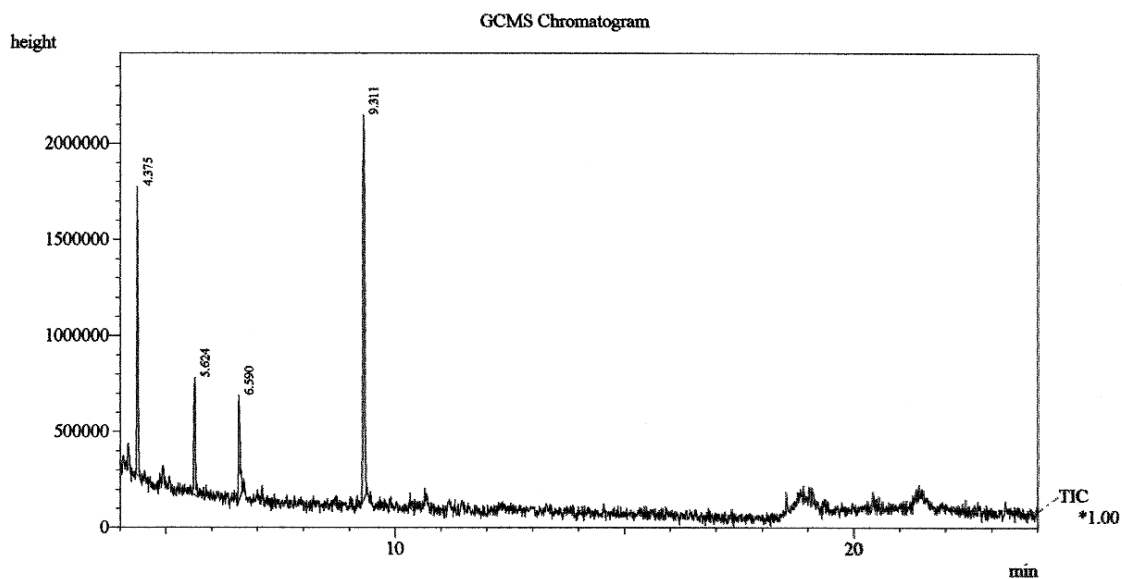


Figura 91: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução da 3-hexanona (**11**) com CC

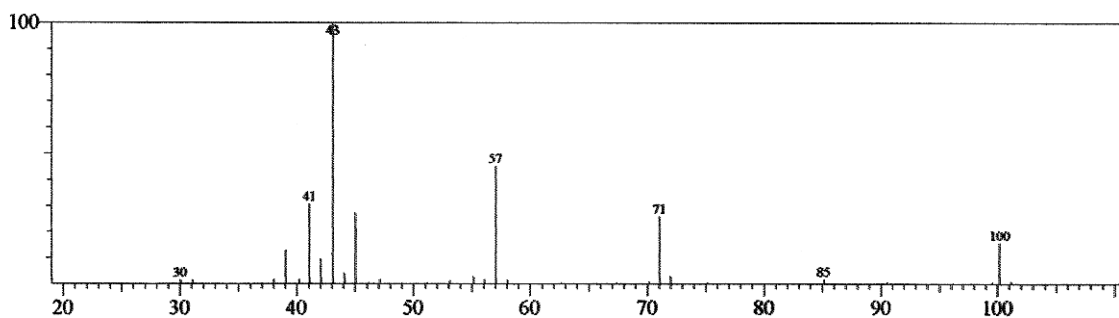


Figura 92: Espectro de massa da 3-hexanona (11)

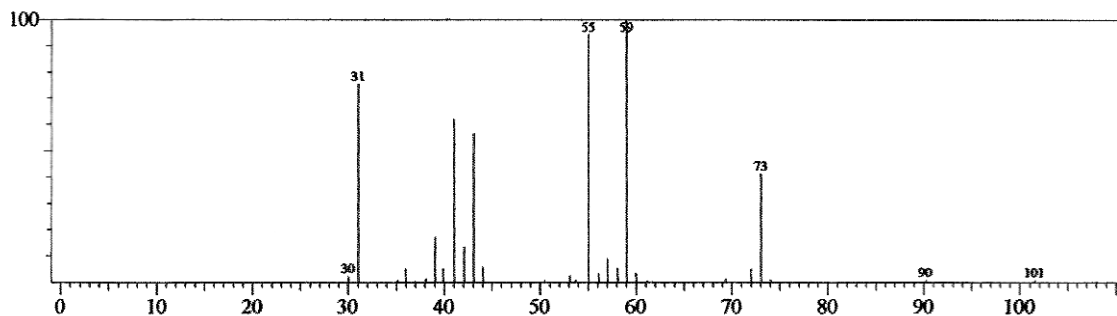


Figura 93: Espectro de massa do 3-hexanol (11a), tr: 4,37 min

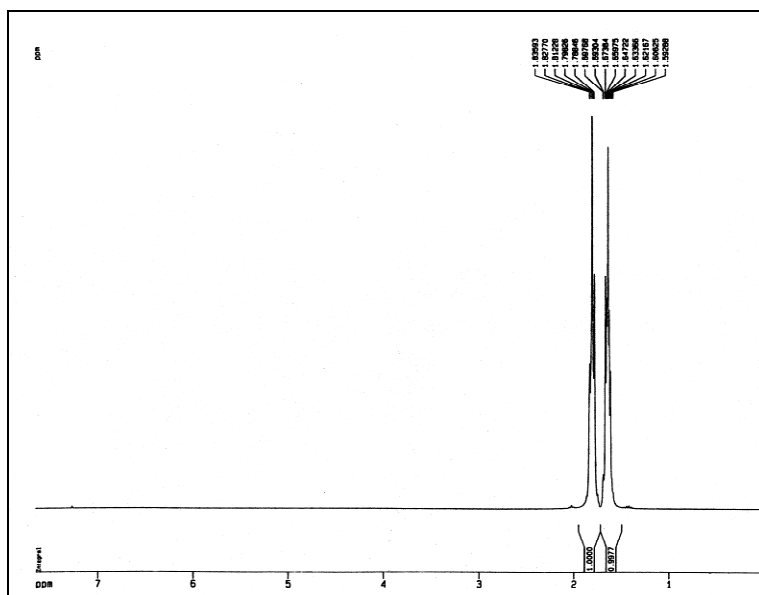


Figura 94: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão ciclopentanona (12)

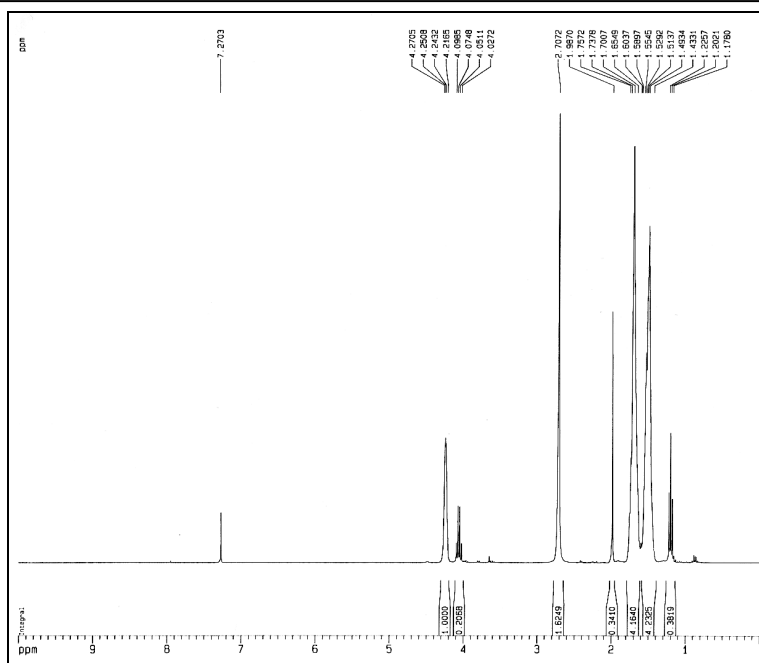


Figura 95: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão ciclopentanol (**12a**)

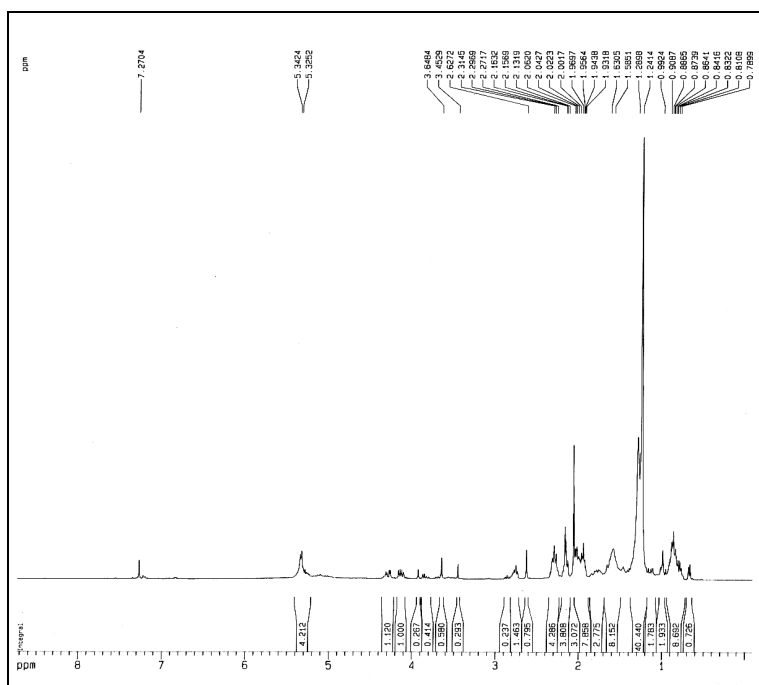


Figura 96: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução da ciclopentanona (**12**) com CC

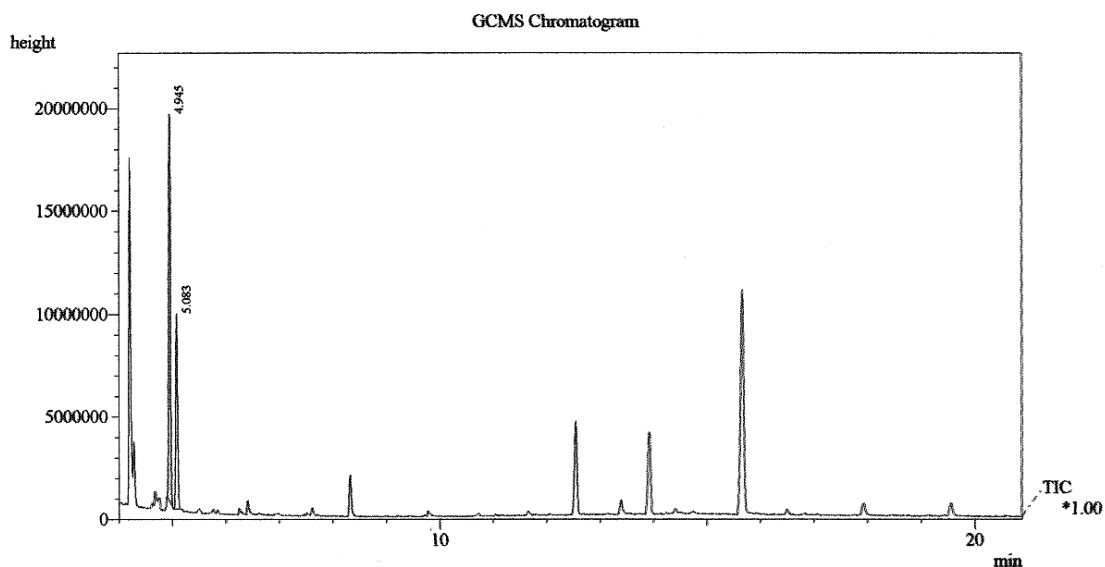


Figura 97: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução da ciclopentanona (**12**) com CC

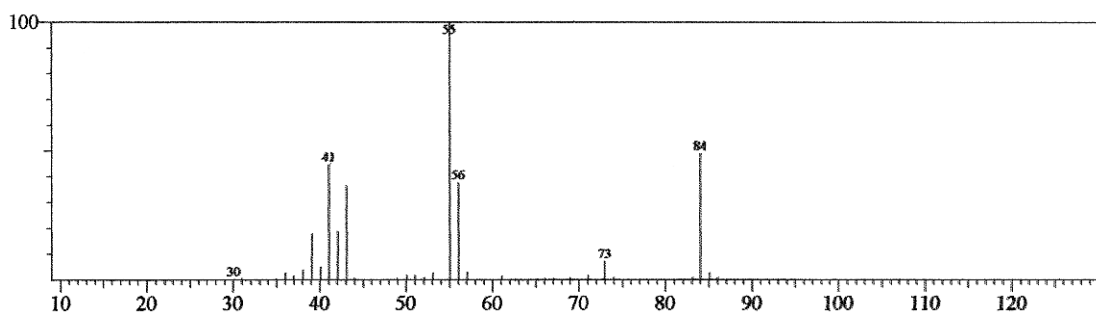


Figura 98: Espectro de massa da ciclopentanona (**12**), tr: 4,94 min

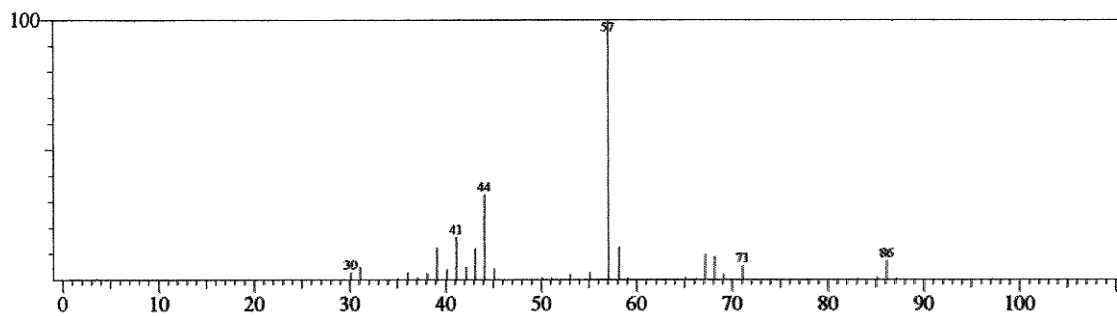


Figura 99: Espectro de massa do ciclopentanol (**12a**), tr: 5,08 min

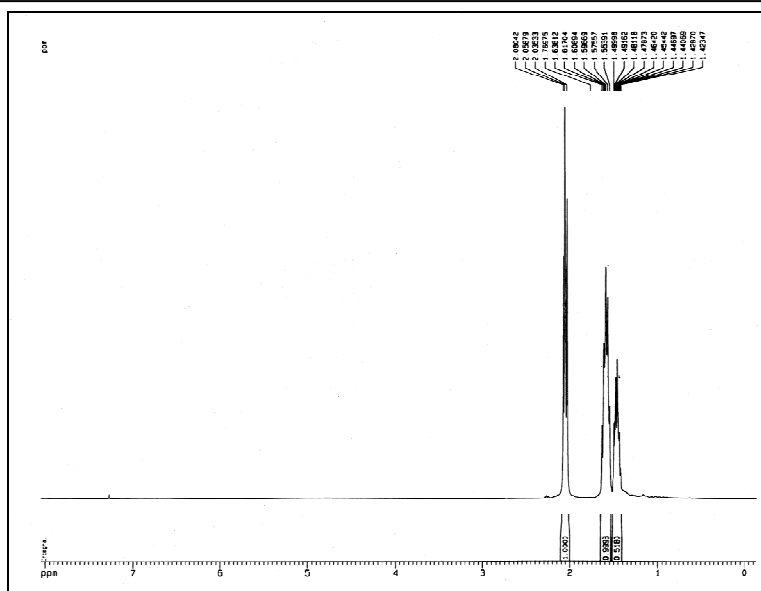


Figura 100: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão ciclohexanona (13)

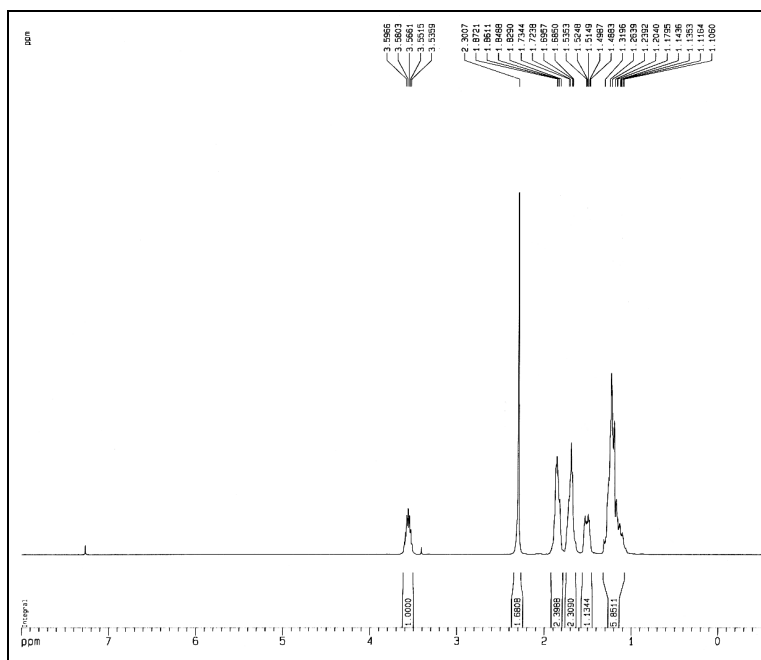


Figura 101: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão ciclohexanol (13a)

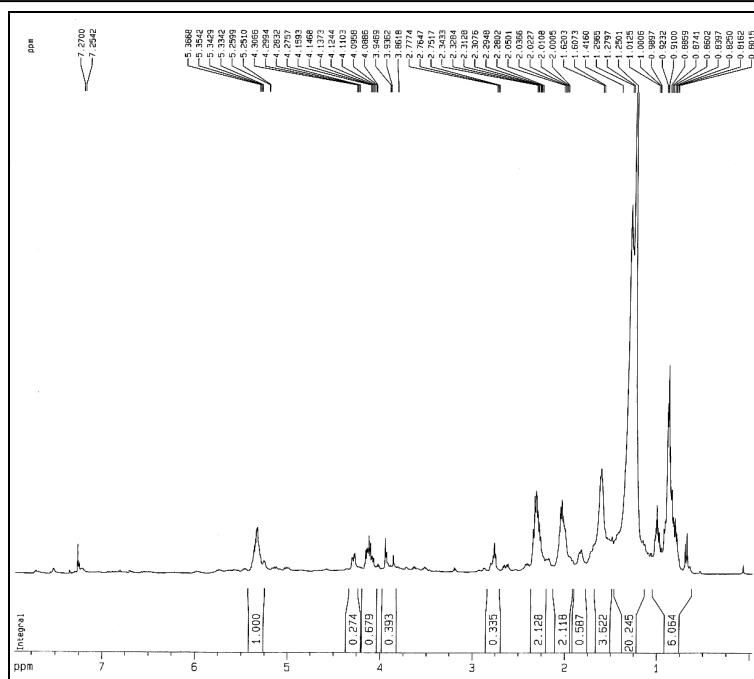


Figura 102: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução da ciclohexanona (**13**) com CC

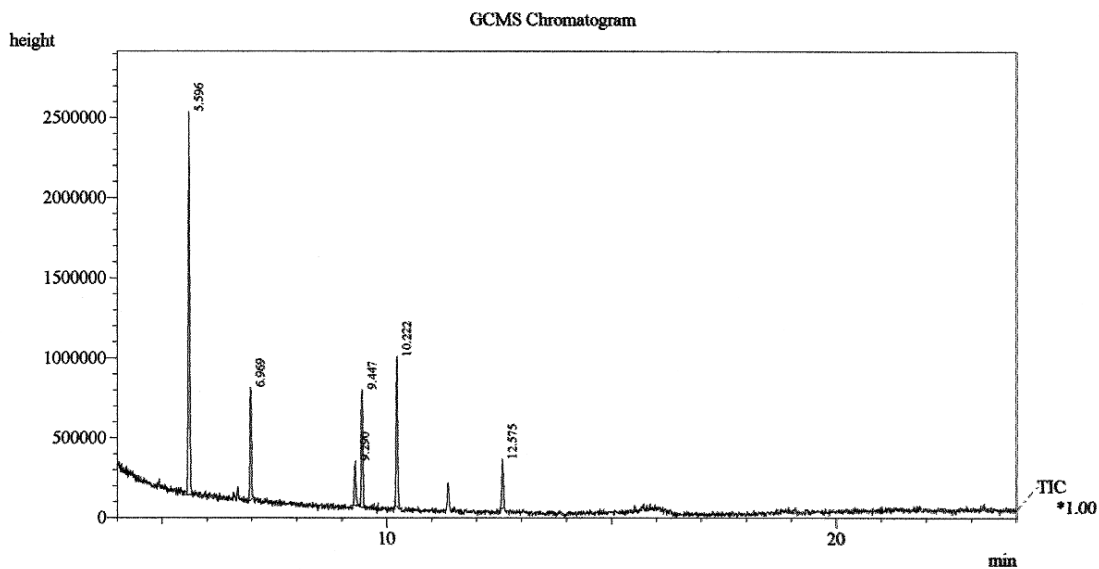


Figura 103: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução da ciclohexanona (**13**) com CC

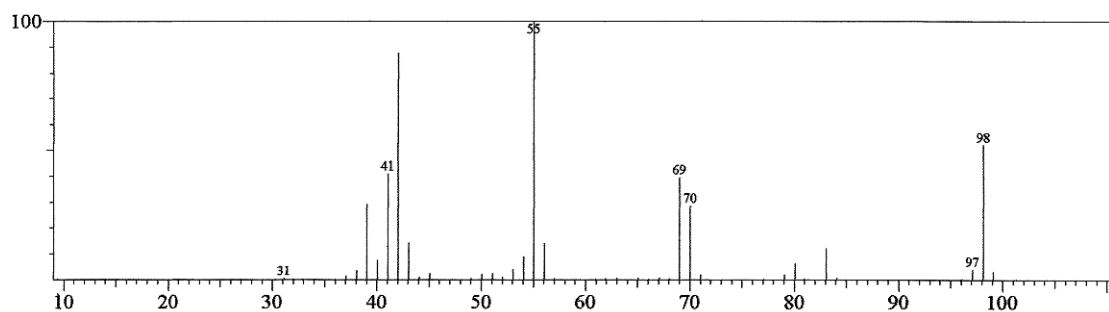


Figura 104: Espectro de massa da ciclohexanona (13)

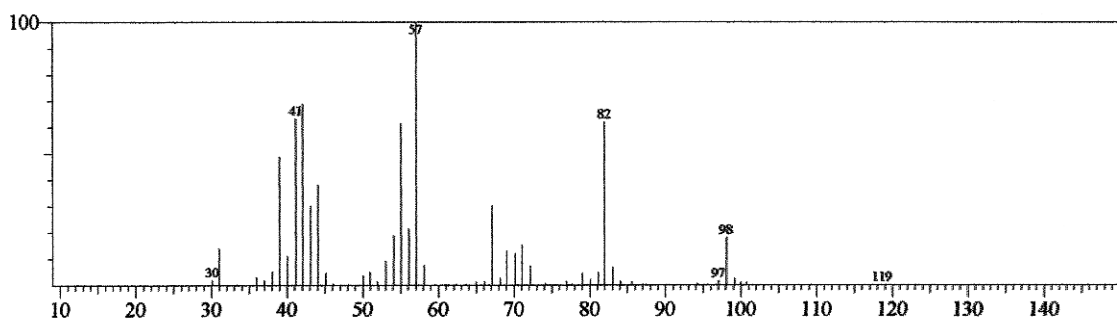


Figura 105: Espectro de massa do ciclohexanol (13a), tr: 5,60 min

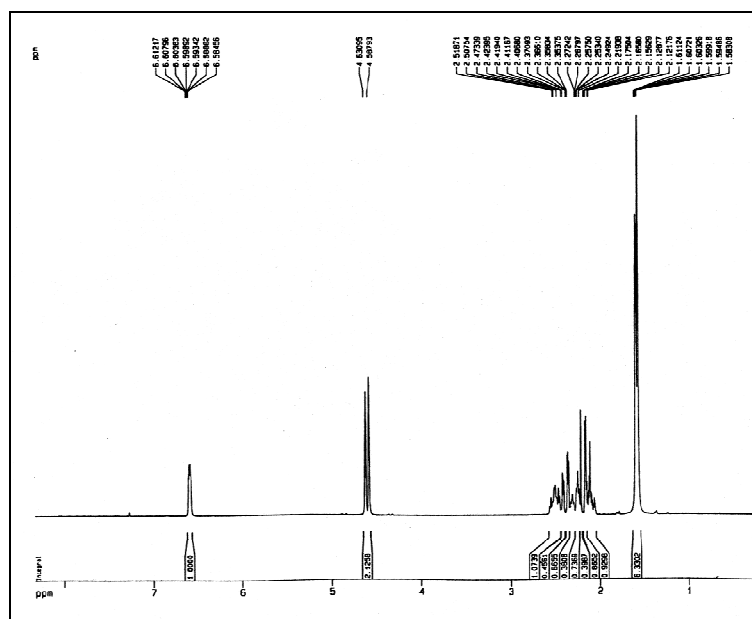


Figura 106: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão carvona (15)

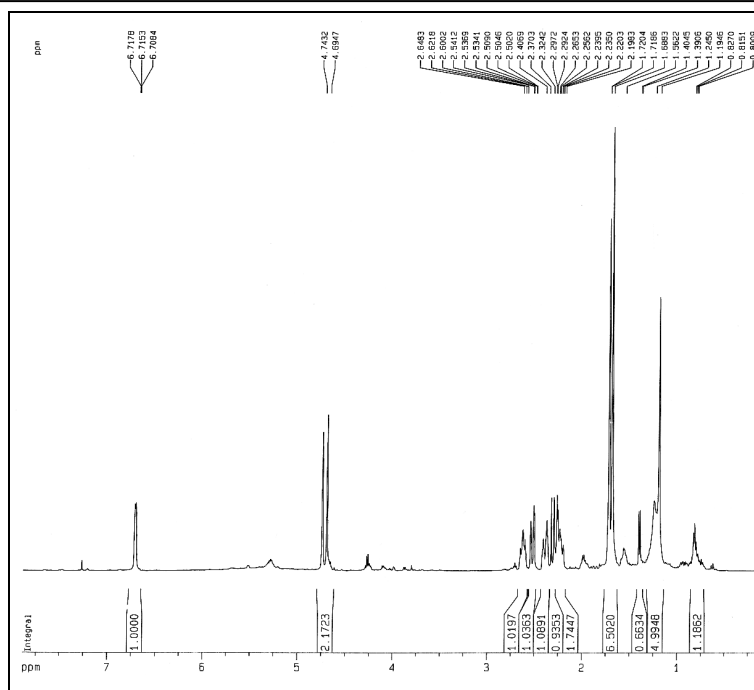


Figura 107: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução da carvona (**15**) com CC

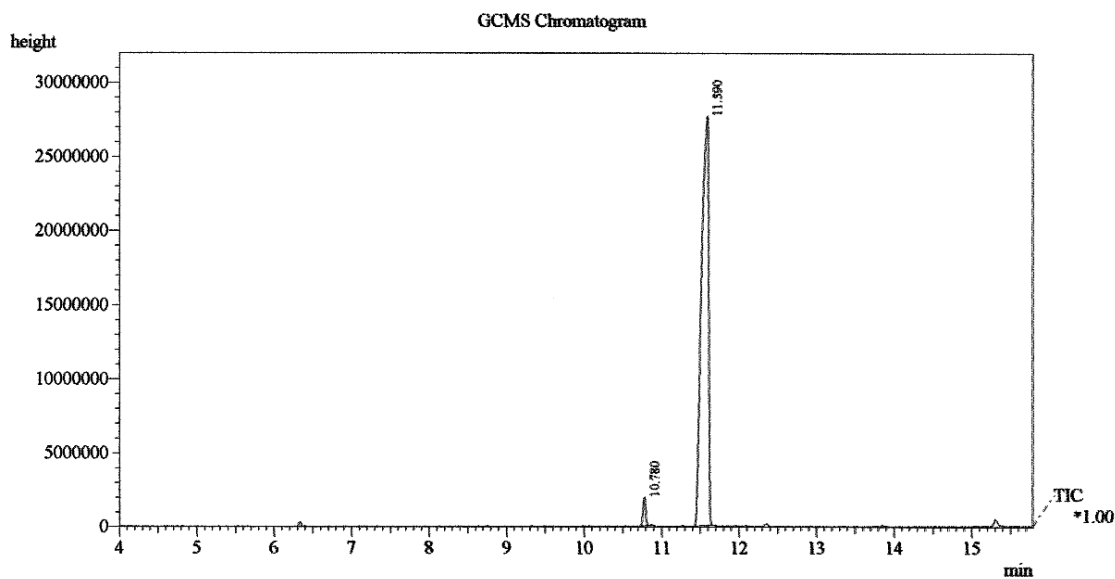


Figura 108: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução da carvona (**15**) com CC

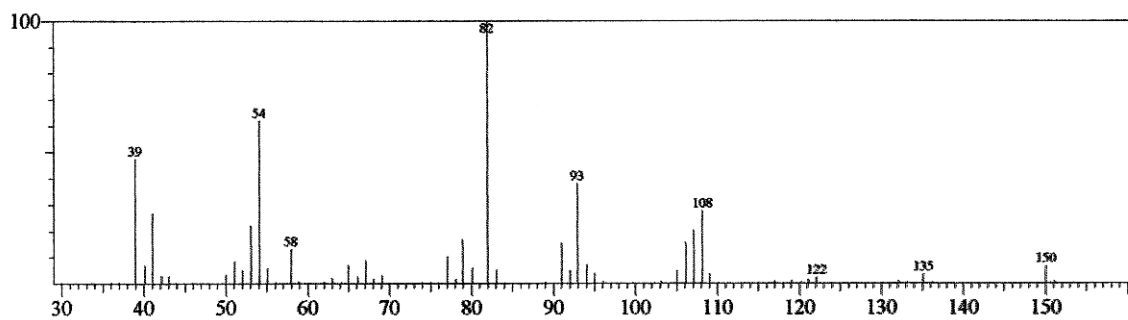


Figura 109: Espectro de massa da carvona (**15**), tr: 11,59 min

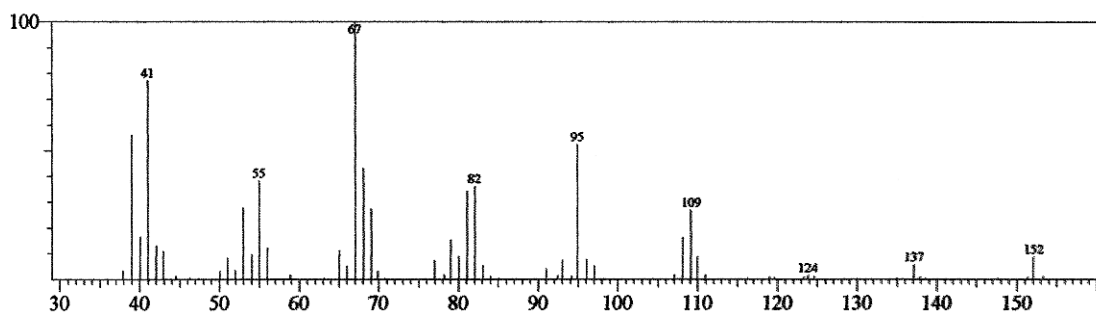


Figura 110: Espectro de massa do carvol (**15a**), tr: 10,78 min

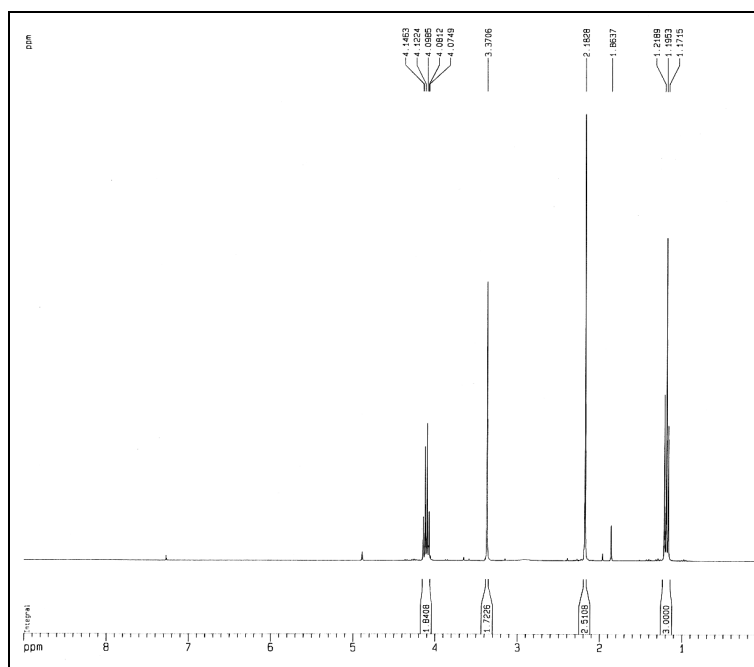


Figura 111: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão acetoacetato de etila (**16**)

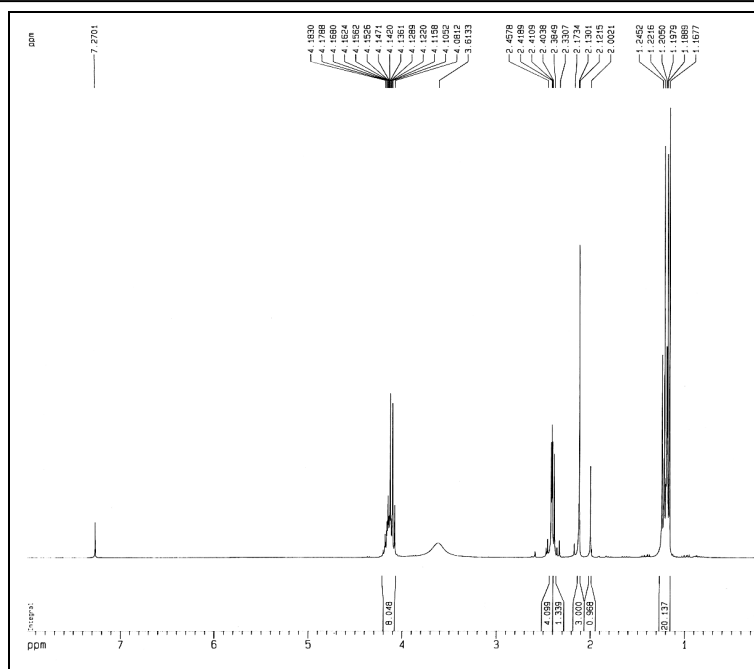


Figura 112: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão 3-hidroxi-butanoato de etila (16a)

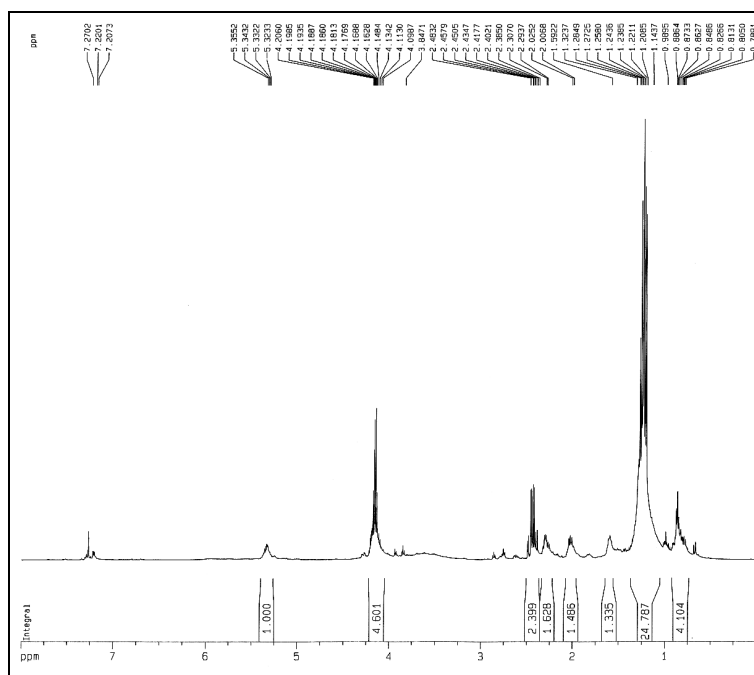


Figura 113: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução do acetoacetato de etila (16) com CC

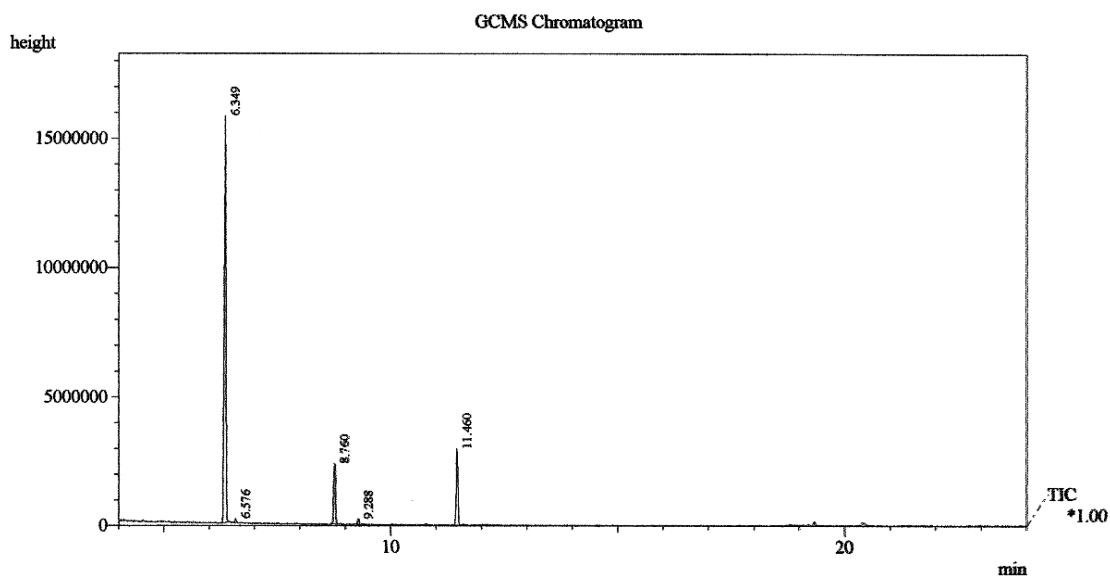


Figura 114: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução do acetoacetato de etila (16) com CC

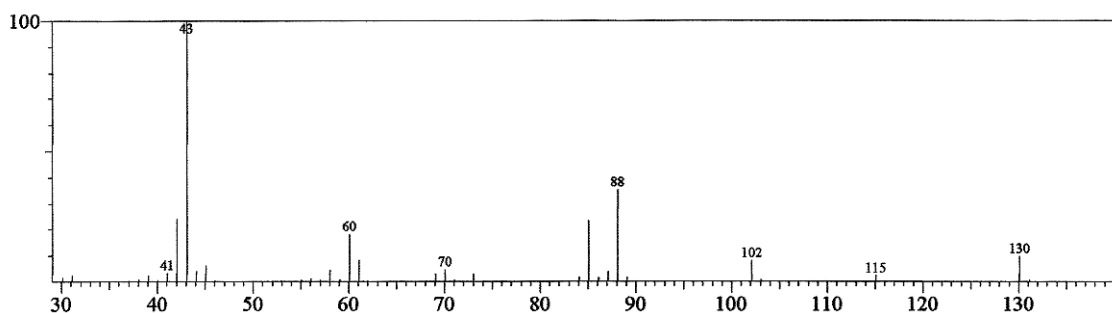


Figura 115: Espectro de massa do acetoacetato de etila (16)

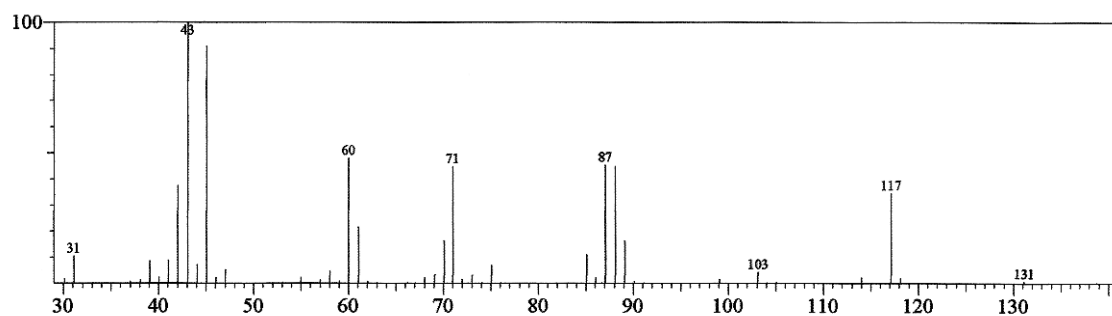
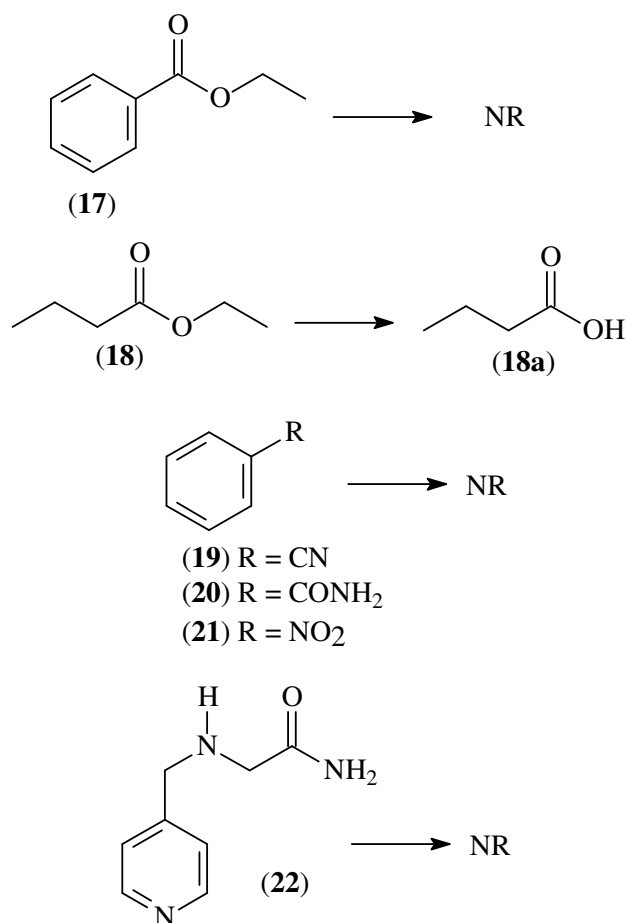


Figura 116: Espectro de massa do 3-hidroxi-butanoato de etila (16a), tr: 6,35 min

Finalmente, as reações enzimáticas foram estendidas a outros compostos com diferentes funções (**Esquema 3**): ésteres (benzoato de etila, **17** e butirato de etila, **18**), nitrila (benzônitrila, **19**), amidas (benzamida, **20** e isoniazida, **22**), e um nitro derivado (nitrobenzeno, **21**). O éster aromático não foi afetado, enquanto, o éster alifático produziu o ácido carboxílico correspondente (ácido butírico em 45% de conversão) em lugar do álcool esperado. Nenhuma reatividade foi observada para os compostos benzônitrila (**19**), benzamida (**20**) e nitrobenzeno (**21**). No espectro de RMN ^1H (**Fig. 118**, p. **130**) do produto de reação do éster **18** com CC, não foi mais observado o quarteto em δ_{H} 4,04 relativo aos hidrogênios oximetilênicos presente no espectro (**Fig. 117**, p. **130**) de **18**.

Esquema 3

As figuras abaixo mostram os cromatogramas GC-EM [tempo de retenção (tr) em minutos], os espectros de RMN ^1H e de massas do substrato e produto da biorredução do butirato de etila (**18**) com CC.

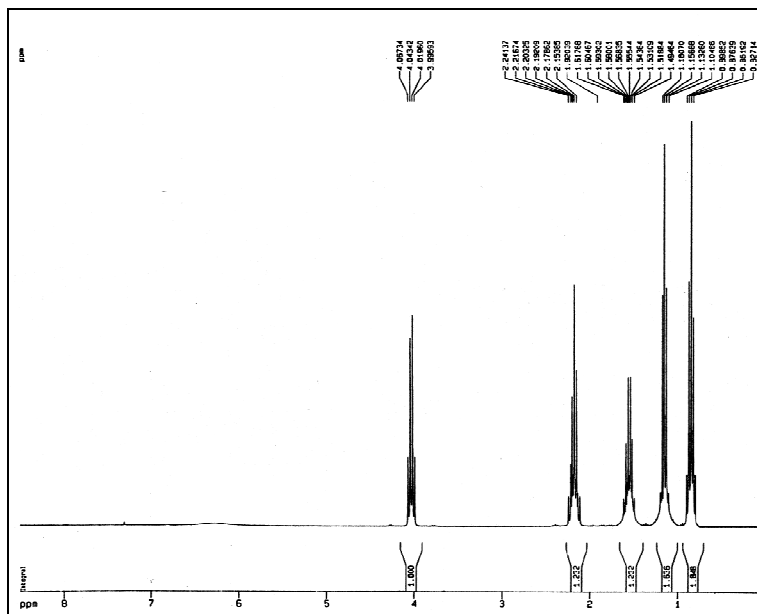


Figura 117: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão butirato de etila (**18**)

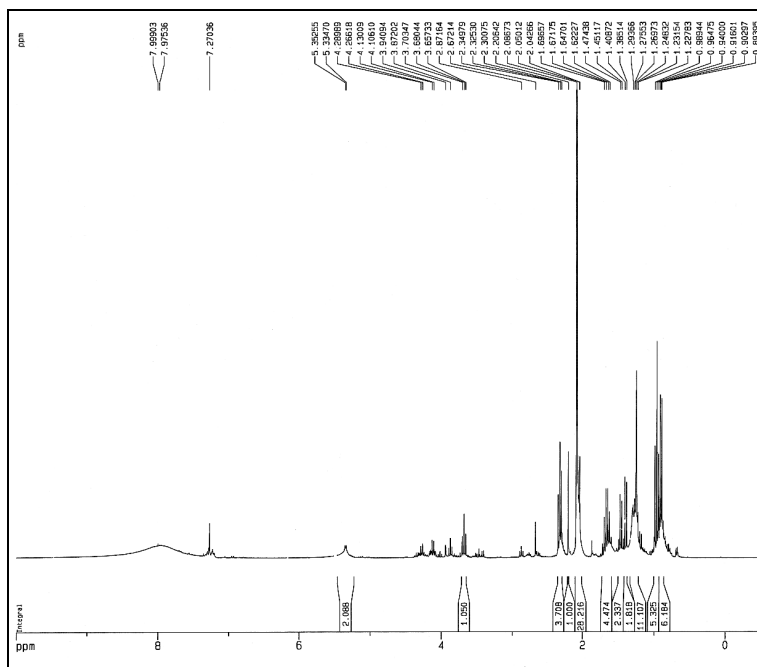


Figura 118: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na biorredução do butirato de etila (**18**) com CC

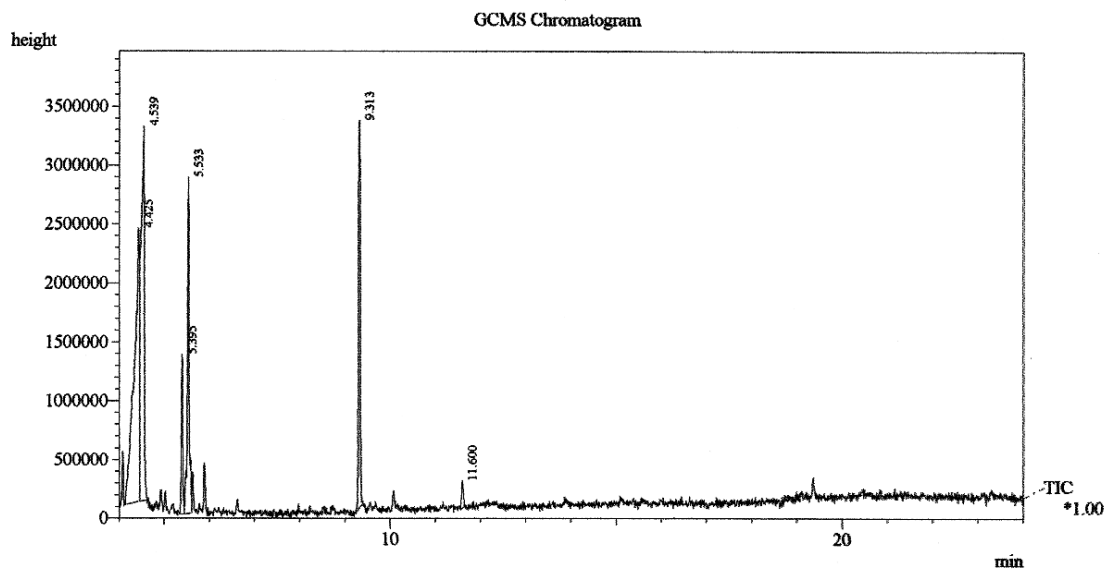


Figura 119: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na biorredução do butirato de etila (**18**) com CC

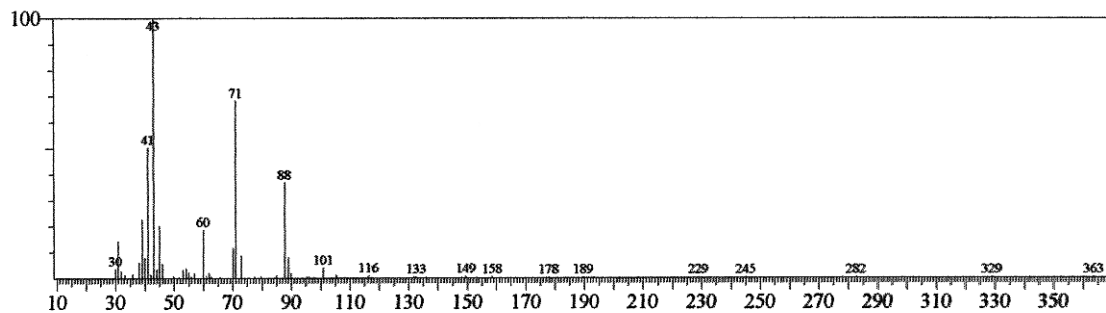


Figura 120: Espectro de massa do butirato de etila (**18**), tr: 4,42 min

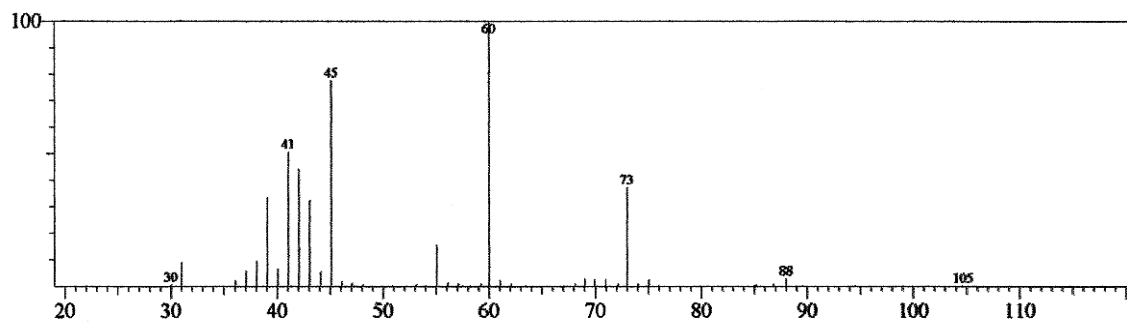


Figura 121: Espectro de massa do ácido butírico (**18a**), tr: 4,54 min

Tabela 52: Sinais de RMN ^1H utilizados na integração dos hidrogênios selecionados para os compostos **1-13**, **15** e **16**, comparados com a integração dos sinais dos produtos, álcoois **1a-13a**, **15a** e **16a**, obtidos por biorredução com CC

Substratos	H-observado	δ_{H}	Produtos	H-observado	δ_{H}
1	3H-8	2,48 (s)	1a	H-7	4,96 (q)
2	3H-8	2,55 (s)	2a	H-7	4,91 (q)
3	CHO	9,89 (s)	3a	2H-7	4,70 (s)
4	CHO	9,82 (s)	4a	2H-7	4,66 (s)
5	CHO	9,78 (s)	5a	2H-7	4,70 (s)
6	CHO	9,81 (s)	6a	2H-7	4,61 (s)
			6b	2H-7	4,45 (s)
			7a	2H-1'	4,33 (dd)
7	CHO	9,63 (d)	7b	2H-1'	3,68 (t)
			8a	3H-4'	1,93 (s)
			8	CHO	9,60 (s)
8	CHO	9,60 (s)	8c	3H-4'	0,94 (d)
			9	CHO	9,43 (s)
10	CHO	9,74 (t)	10a	2H-1	3,58 (t)
11	3H-1	2,20 (m)	11a		
12	2H-2	1,81 (m)	12a		
13	2H-2	2,05 (m)	13a		
15	H-3	6,60 (qd)	15a	H-3	5,35 (m)
				H-1	4,34 (m)
16	2H-2	3,37 (s)	16a	H-3	4,19 (m)

5.2.1. Estudo Cinético das reações de biorredução de compostos carbonílicos com CC

A partir de cinco compostos, três representantes do grupo dos aldeídos e dois do grupo das cetonas, que exibiram melhores rendimentos na redução com CC, foi realizado estudo cinético de biorredução. Utilizando 200 mg dos aldeídos benzaldeído (**3**), anisaldeído (**4**), furfural (**9**) e das cetonas ciclohexanona (**13**) e o β -cetoéster (**16**) em 200 mL de CC, monitorou-se os rendimentos de conversão entre 12 e 72 horas de reação, em intervalos de 12 horas. Os resultados deste estudo encontram-se listados nos **Gráfico 2 (p. 133)**, **3 (p. 134)**, **4 (p. 134)**, **5 (p. 135)** e **6 (p. 135)**.

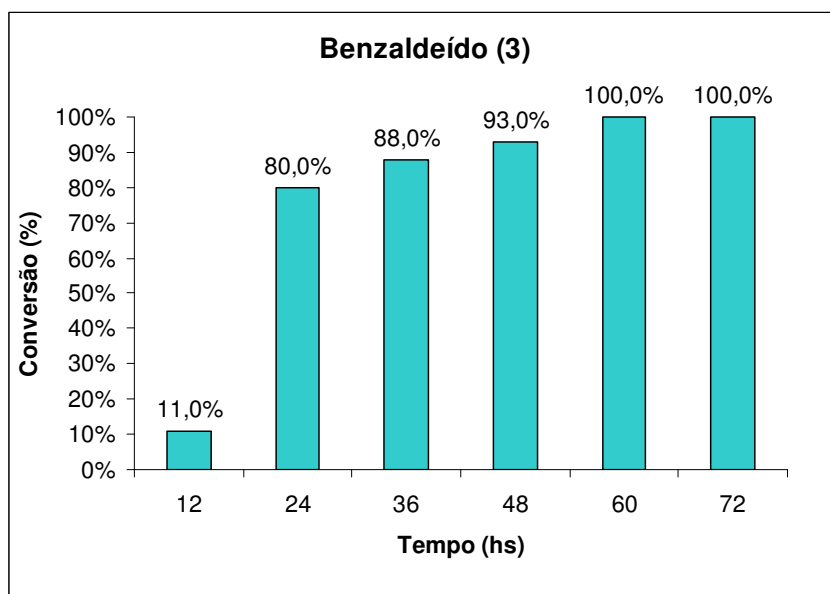


Gráfico 2: Resultados do estudo cinético da biorredução do benzaldeído (**3**) com CC realizado entre 12 e 72 horas

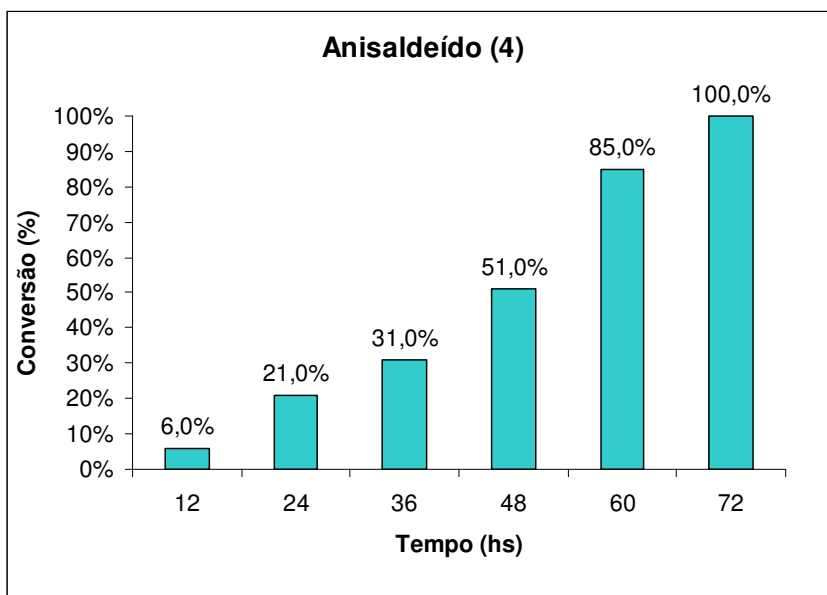


Gráfico 3: Resultados do estudo cinético da biorredução do anisaldeído (4) com CC realizado entre 12 e 72 horas

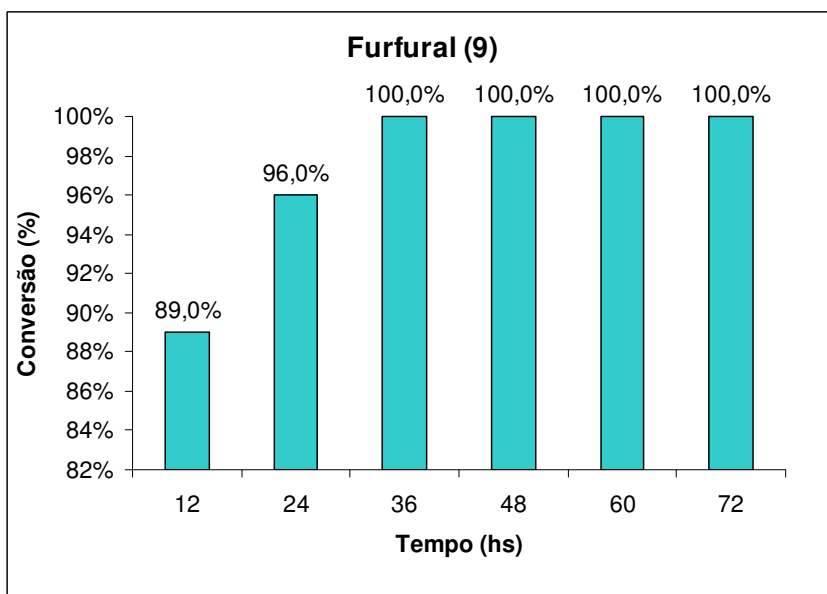


Gráfico 4: Resultados do estudo cinético da biorredução do furfural (9) com CC realizado entre 12 e 72 horas

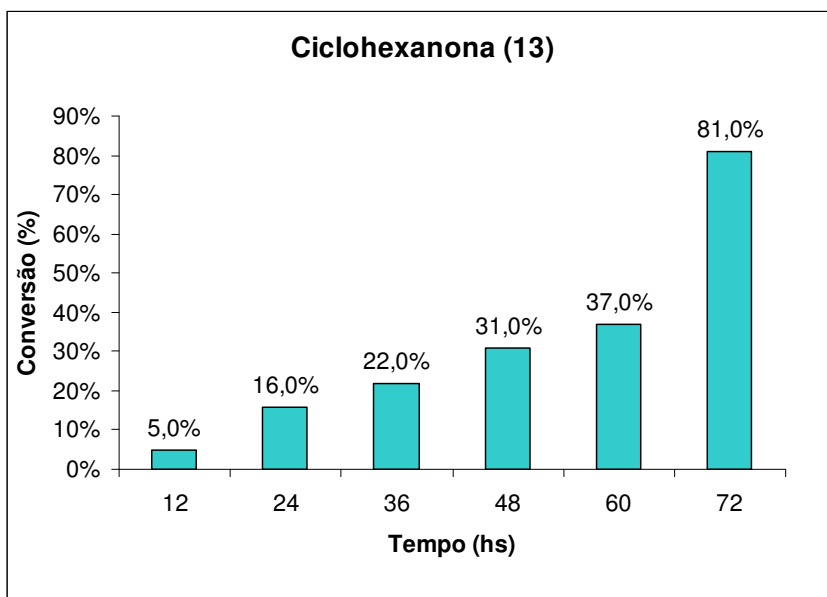


Gráfico 5: Resultados do estudo cinético da biorredução da ciclohexanona (13) com CC realizado entre 12 e 72 horas

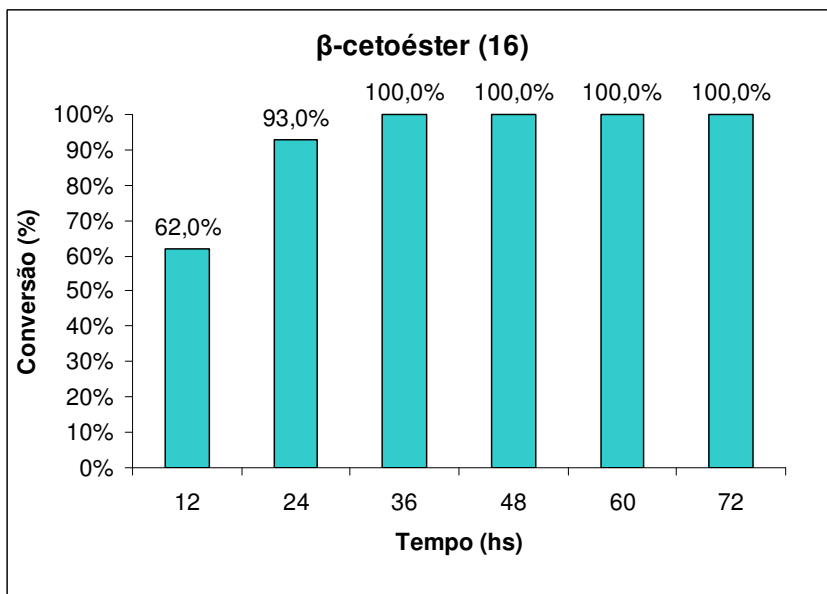


Gráfico 6: Resultados do estudo cinético da biorredução do β-cetoéster (16) com CC realizado entre 12 e 72 horas

Este estudo revela a altíssima reatividade dos compostos **9** (furfural) (**Graf. 4, p. 134**) e **16** (acetoacetato de etila) (**Graf. 6, p. 135**) frente ao sistema biorredutor de CC, visto que os

mesmos apresentaram rendimentos de conversão acima de 90% com apenas 24 horas de reação e total conversão em apenas 36 horas. Os outros aldeídos, benzaldeído (3) (**Graf. 2, p. 133**) e anisaldeído (4) (**Graf. 3, p. 134**), demonstraram, também, elevada reatividade com 100% de conversão após 72 horas, sendo que o primeiro já apresentava esta conversão com 64 horas. Já a cetona cíclica saturada **13** (ciclohexanona), exibiu uma boa conversão após 72 horas de reação (81,0%), porém, bem inferior aos observados com os outros compostos testados.

5.3. Bioacetilações Utilizando as Enzimas Imobilizadas do Caldo de Cana (EICC)

5.3.1. Imobilizações Enzimáticas

As enzimas, catalisadores extremamente eficientes, são espécies sensíveis à inativação por fatores como temperatura, solvente, pH, entre outros. Assim, um mecanismo de proteção das enzimas é essencial para que seu potencial catalítico se mantenha. Várias técnicas de imobilização foram e estão sendo desenvolvidas com a finalidade de fornecer maior estabilidade, facilitar a recuperação e reutilização desses catalisadores (VILLENEUVE et al., 2000).

A aplicação de enzimas ou complexos enzimáticos imobilizados cresceu bastante nos últimos anos. As indústrias de medicamentos, detergentes, couros e panificação, entre outras (PANDEY et al., 1999; SALUNKHE e NAIR, 2000), já utilizam enzimas imobilizadas em seus processos.

Para a imobilização das enzimas de CC foi utilizado o processo de Kalogeris (KALOGERIS, et al., 2006) (**Cap. 6, sub item 6.6, p. 209**). Primeiramente, uma leitura no espectrofotômetro de UV foi efetuada a partir do CC e que foi utilizada para determinar o teor (1,4%) total de proteínas através de uma curva de calibração obtida utilizando soluções padrões de albumina bovina. O CC, ao qual foi adicionado alginato de sódio para imobilização das enzimas, foi gotejado sobre uma solução de cloreto de cálcio (5% m/v). O material precipitado foi separado por filtração e a partir do filtrado foi efetuada uma leitura no espectrômetro. O valor dessa leitura foi dividido pelo valor da primeira e multiplicado por 100, obtendo-se assim, a percentagem de proteínas não imobilizadas. Esta percentagem foi subtraída de 100 fornecendo a percentagem (99,2%) de enzimas imobilizadas do caldo de cana (EICC).

Inicialmente, o potencial biorredutor de EICC foi investigado, utilizando o benzaldeído (**3**) como substrato. Diferentemente do CC bruto, não foi revelado nenhum indício de reatividade em presença de EICC. Provavelmente, a ausência de cofatores (perdido no processo de imobilização) pode explicar este fato, uma vez que as redutases necessitam dessas espécies para atuarem. Posteriormente, EICC foi testado como biocatalisador na reação de acetilação do álcool anísico (**Esq. 55, p. 144**), exibindo um bom resultado (67,8% de conversão). As lipases (enzimas que catalisam esse tipo de reação), segundo a literatura (DALLA-VECCIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004), não necessitam de cofatores na catálise de reações. O álcool anísico foi o substrato selecionado para ser utilizado na otimização das condições reacionais de acetilação deste álcool com EICC como biocatalisador.

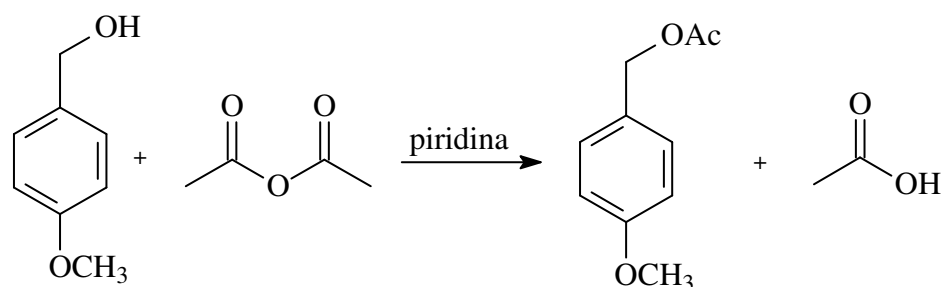
5.3.2. Lipases

São enzimas hidrolíticas muito utilizadas em síntese orgânica, capazes de catalisar reações de **esterificação**, transesterificação, aminólise e tiotransesterificação em solventes orgânicos anidros, sistemas bifásicos e em solução micelar com alta especificidade. Apresentam diversas vantagens, tais como: **não necessitam de cofatores**, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis em meio orgânico, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade, baixo custo e grande disponibilidade (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

5.3.3. Acetilação Convencional do Álcool Anísico

O acetato de anisila (**Esq. 54, p. 138**), obtido a partir do álcool anísico através de acetilação (anidrido acético/piridina), segundo metodologia usual [**Capítulo 6, sub-item 6.7.2 (p. 213)**], foi tomado como padrão para as reações de acetilação efetuadas. O produto de reação, obtido com 95% de rendimento foi purificado em coluna de sílica gel e analisado por CG-EM e RMN ^1H e ^{13}C (**Tab. 53, p. 143**).

Esquema 54



Para efeito de comparação foram introduzidos os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do álcool anísico.

O espectro de RMN ^1H (**Fig. 123, p. 139**) do álcool anísico padrão (**Fig. 122, p. 138**), conforme esperado, apresentou: dois dubletos em δ_{H} 7,21 (d, $J=8,5$ Hz) e 6,84 (d, $J=8,5$ Hz), com multiplicidade para dois hidrogênios cada, do hidrogênios aromáticos do anel *para*-substituído; dois singletos em δ_{H} 4,50 e 3,76, dos hidrogênios dos grupos OCH_2 e OCH_3 , respectivamente.

Os espectros de RMN ^{13}C (BB, **Fig. 124, p. 139** e DEPT 135° , **Fig. 125, p. 140**) mostraram os sinais em δ_{C} 158,94 (carbono oxigenado) e 133,27 e os sinais em δ_{C} 128,50 e 113,79, relacionados aos carbonos não hidrogenados e metínicos do sistema aromático *para*-substituído, respectivamente, e, os sinais em δ_{C} 64,34 e 55,14 devidos aos carbonos sp^3 dos grupos OCH_2 e OCH_3 , respectivamente.

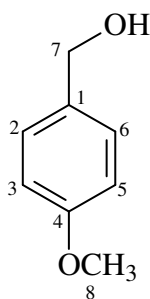


Figura 122: Estrutura química do álcool anísico

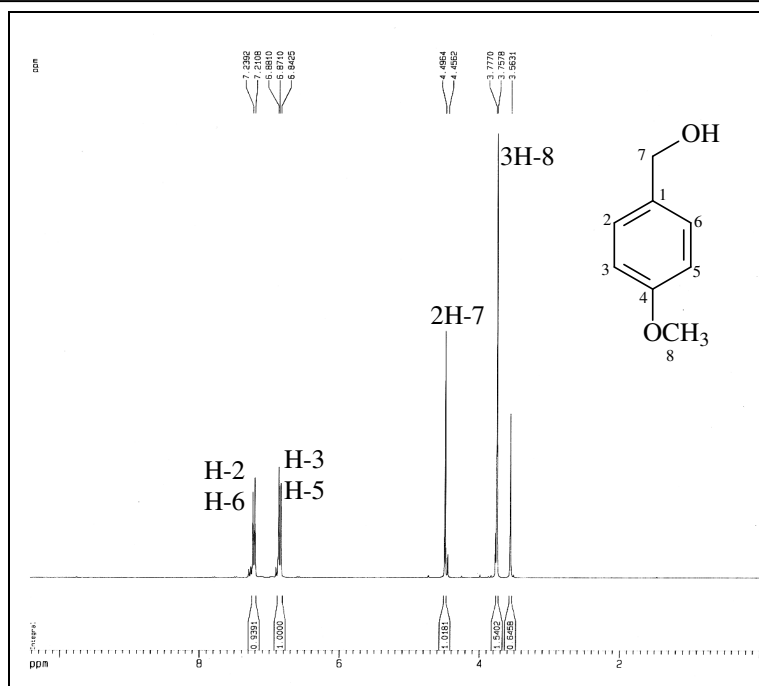


Figura 123: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do álcool anísico

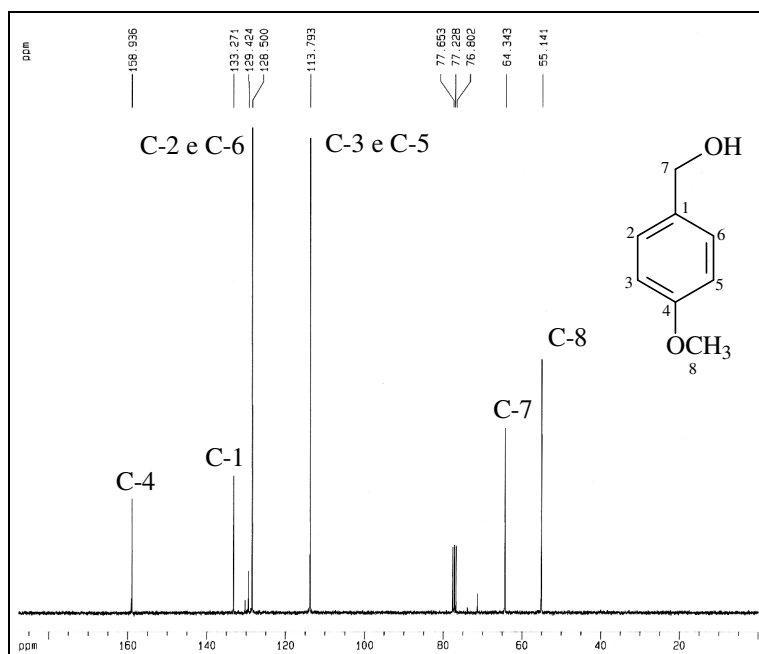


Figura 124: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do álcool anísico

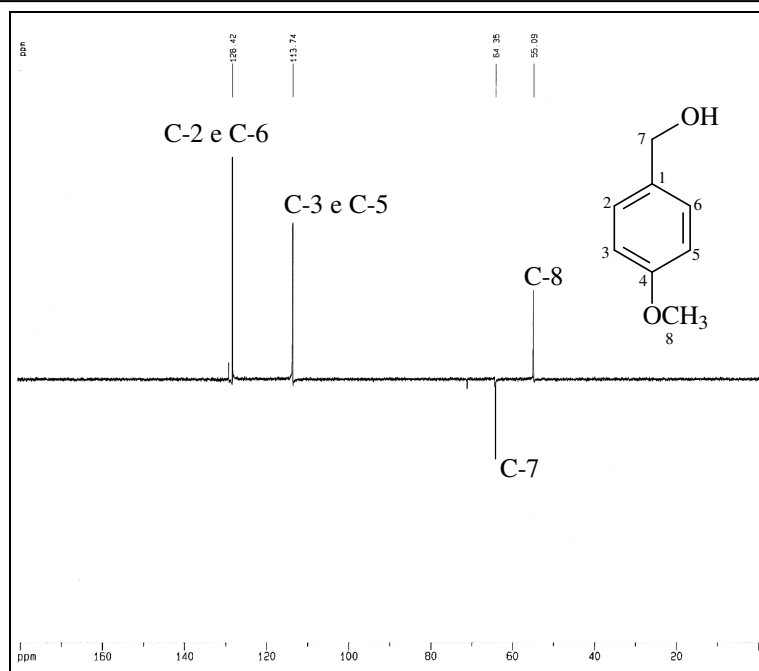


Figura 125: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) do álcool anísico

O espectro de RMN ^1H (Fig. 127, p. 141) do produto de acetilação (Fig. 126, p. 141) revelou dois dubletos em δ_{H} 7,33 (2H, $J=8,5$ Hz) e 6,92 (2H, $J=8,5$ Hz) e dois singletos em δ_{H} 5,08 (2H) e 3,83 (3H). O deslocamento químico do sinal singlete em δ_{H} 5,08 (5,08; $\Delta\delta_{\text{H}}=0,58$), dos hidrogênios carbinólicos, mostrou-se em acordo com o efeito paramagnético devido ao grupo acetoxila. Um terceiro singlete devido aos hidrogênios metílicos do grupo acetoxila foi registrado em δ_{H} 2,11.

Através dos espectros de RMN ^{13}C (BB, Fig. 128, p. 142 e DEPT 135° Fig. 129, p. 142) foram confirmados todos os sinais dos carbonos. Assim, os sinais em δ_{C} 159,70 (carbono oxigenado) e 128,16 e em δ_{C} 130,11 e 113,97, foram correlacionados aos carbonos não hidrogenados e metínicos do sistema aromático *para*-substituído, respectivamente. Já, os sinais em δ_{C} 66,08 (sinal negativo no DEPT 135°) e 55,21 foram atribuídos aos carbonos sp^3 dos grupos OCH_2 e OCH_3 , respectivamente. Em adição, surgiram sinais em δ_{C} 170,86 e 20,98, devidos aos carbonos carbonílico e metílico, respectivamente, do grupo acetoxila.

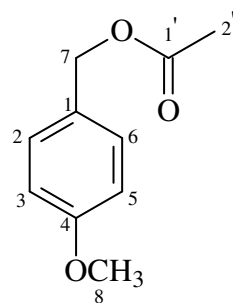


Figura 126: Estrutura química do acetato de anisila

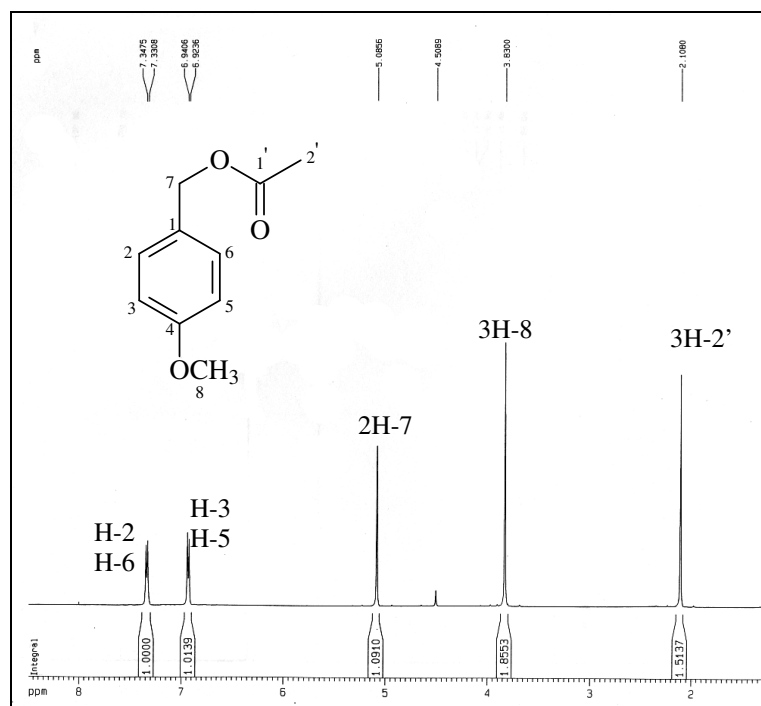


Figura 127: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do acetato de anisila

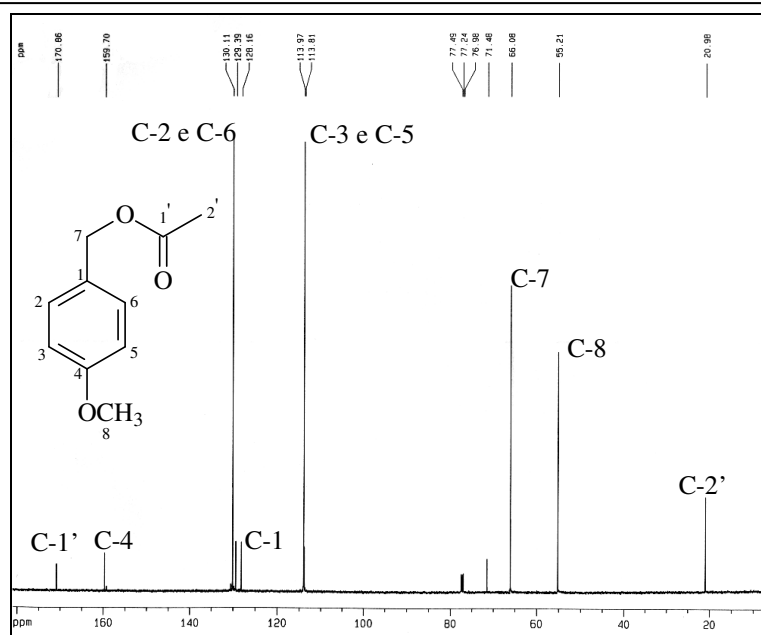


Figura 128: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do acetato de anisila

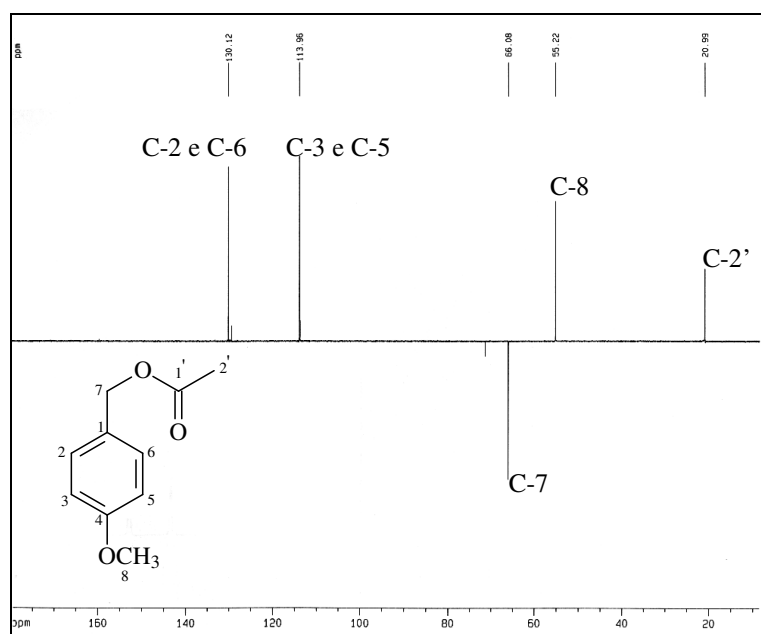


Figura 129: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) do acetato de anisila

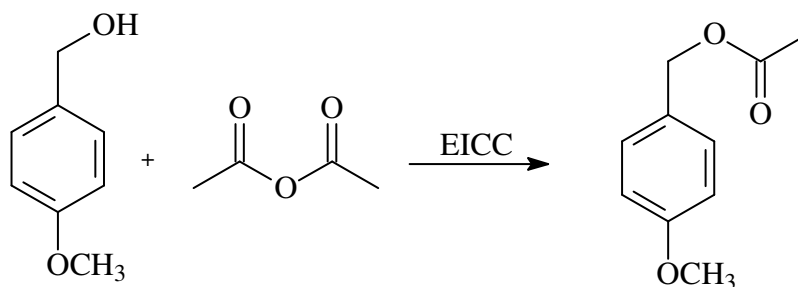
A **Tabela 53** apresenta todos os dados de RMN ^1H e ^{13}C do álcool anísico e do acetato de anisila (obtido por acetilação convencional).

Tabela 53: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o álcool anísico e acetato de anisila

Álcool anísico			Acetato de anisila		
	δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}
CH₃			CH₃		
8	55,14	3,76 (s)	2'	20,98	2,11 (s)
-	-	-	8	55,21	3,83 (s)
CH₂			CH₂		
7	64,34	4,50 (s)	7	66,08	5,08 (s)
CH			CH		
3 e 5	113,79	6,84 (d, J=8,5)	3 e 5	113,97	6,92 (d, J=8,5)
2 e 6	128,50	7,21 (d, J=8,5)	2 e 6	130,11	7,33 (d, J=8,5)
C			C		
1	133,27	-	1	128,16	-
4	158,94	-	4	159,70	-
-	-	-	1'	170,86	-

5.3.4. Acetilação Enzimática do Álcool Anísico

O potencial biocatalítico da enzima imobilizada (EICC) foi avaliado na reação de acetilação do álcool anísico (**Esq. 55, p. 144**). Numa primeira condição, foram utilizados 200 mg (1,45 mmol) do álcool, 148 mg (1,45 mmol) de anidrido acético (doador de grupo acila) em 20 mL de hexano PA, sob agitação mecânica com velocidade de 150 rotações por minuto (rpm) à temperatura de 30°C e tempo de reação de 72 horas. O rendimento (67,8%) reacional foi bastante satisfatório.

Esquema 55

Com base neste resultado inicial, foi realizado um estudo sistemático da influencia de vários parâmetros nos rendimentos reacionais, tais como: quantidade enzimática, tempo de reação, tipo de solvente, quantidade de substrato, velocidade de agitação, reutilização de enzima e temperatura de reação. Os produtos reacionais deste estudo preliminar foram analisados por CG-EM, e os resultados encontram-se descritos a seguir.

5.3.4.1. Influência da Quantidade Enzimática

Inicialmente foi realizada a otimização da quantidade de biocatalisador (EICC). Neste estudo, foram utilizados sempre 200 mg (1,45 mmol) de álcool anísico, 148 mg (1,45 mmol) de anidrido acético, 20 mL de hexano, sob agitação mecânica de 150 rpm, à temperatura de 30°C, durante 72 horas de reação. A quantidade enzimática foi variada de 50 a 400 mg fornecendo rendimentos de conversão na faixa 43,2 a 68,2%. Os resultados encontram-se expostos no **Gráfico 7 (p. 145)**.

De acordo com os resultados obtidos, foi observado que o rendimento reacional se eleva gradativamente quando a quantidade enzimática varia de 50 a 150 mg (variação de 25,0% na conversão). Entretanto, em quantidades acima de 150 mg de EICC o rendimento varia muito pouco, demonstrando que a melhor relação EICC/substrato, mantendo os demais parâmetros, foi de 150mg/200mg. Assim, 150 mg foram tomadas como quantidade padrão de EICC para os próximos testes.

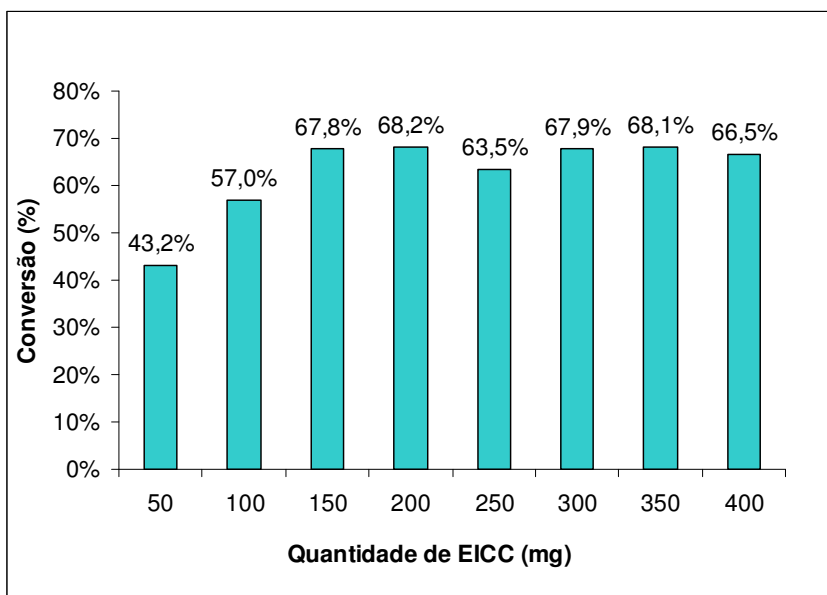


Gráfico 7: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico obtidos pela variação da quantidade de EICC

5.3.4.2. Influência do Tempo Reacional

Conhecida a quantidade ideal de EICC (150 mg), foram iniciados os testes para otimização do tempo de reação. Os rendimentos reacionais foram calculados entre 12 e 48 horas, em intervalos de 12 horas. As condições foram: 200 mg de álcool anísico, 148 mg de anidrido acético, 20 mL de hexano, velocidade de agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C. Os resultados deste estudo encontram-se listados no **Gráfico 8**, (p. 146).

Os resultados demonstraram que a conversão eleva-se gradativamente no início da reação (entre 12 e 48 horas) e se estabiliza após 60 horas. Este fato indicou que, possivelmente, o equilíbrio dinâmico é atingido com 60 horas reação (**Graf. 8**, p. 146) e, portanto, sendo este o tempo ideal.

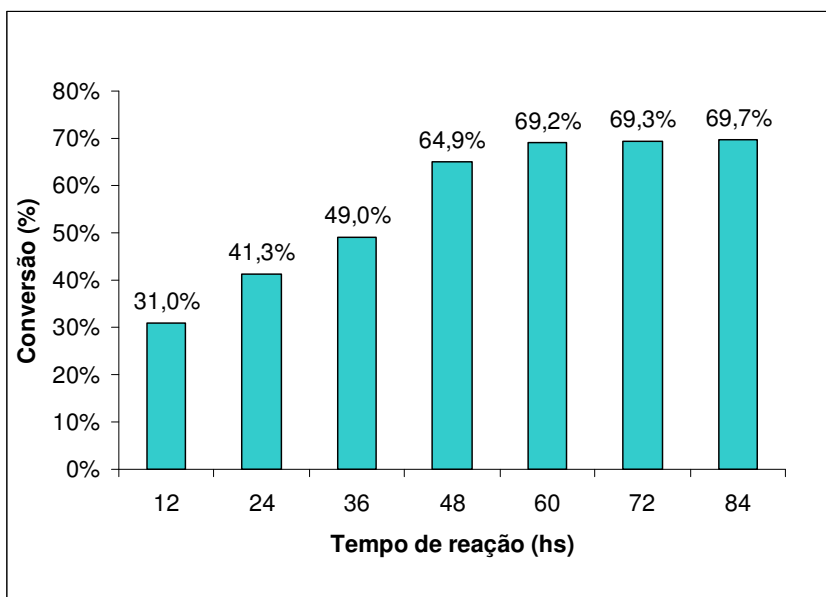


Gráfico 8: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos pela variação do tempo reacional

5.3.4.3. Influência do Solvente

O tipo de solvente é, provavelmente, o fator mais decisivo em reações catalisadas por enzimas, podendo causar a desnaturação ou desativação da enzima. Reações em meio orgânico são atrativas por melhorar a solubilidade do substrato e diminuir a possibilidade de reações laterais com a água.

A literatura relata que a quantidade de água é o componente mais relevante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para manter sua conformação tridimensional ativa, retendo a polaridade do sítio ativo e estabilizando a molécula da proteína (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004), sendo, contudo, a quantidade de água no meio orgânico dependente do tipo de solvente utilizado. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise, reação inversa da esterificação (acetilação, por exemplo).

O parâmetro mais utilizado para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações de biocatálise é o log P (logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema

octanol/água). Segundo dados da literatura (LIMA e ANGNES, 1999) o $\log P$ é utilizado para medir quantitativamente a polaridade de solventes. Assim, solventes que apresentam $\log P \leq 2$ são considerados hidrofílicos (polares), $\log P$ entre 2 e 4 moderadamente hidrofílicos e $\log P > 4$ hidrofóbicos (apolares).

Os solventes hidrofílicos (polares) são inadequados para o uso em biocatálise porque perturbam fortemente a interação água-biocatalisador (absorvem a camada de hidratação da enzima, desativando-a) (LIMA e ANGNES, 1999). Por isso, os solventes hidrofóbicos são mais eficientemente utilizados em biocatálise (PARIDA e DORDICK, 1991).

Uma série de solventes, com polaridades variadas, foram testados na acetilação enzimática do álcool anísico utilizando a EICC como biocatalisador. Nesses experimentos foram utilizados 200 mg de substrato, 148 mg de anidrido acético, agitação mecânica de 150 rpm, temperatura de 30°C, tempo reacional de 60 horas e 20 mL do solvente. O **Gráfico 9** ilustra os resultados obtidos.

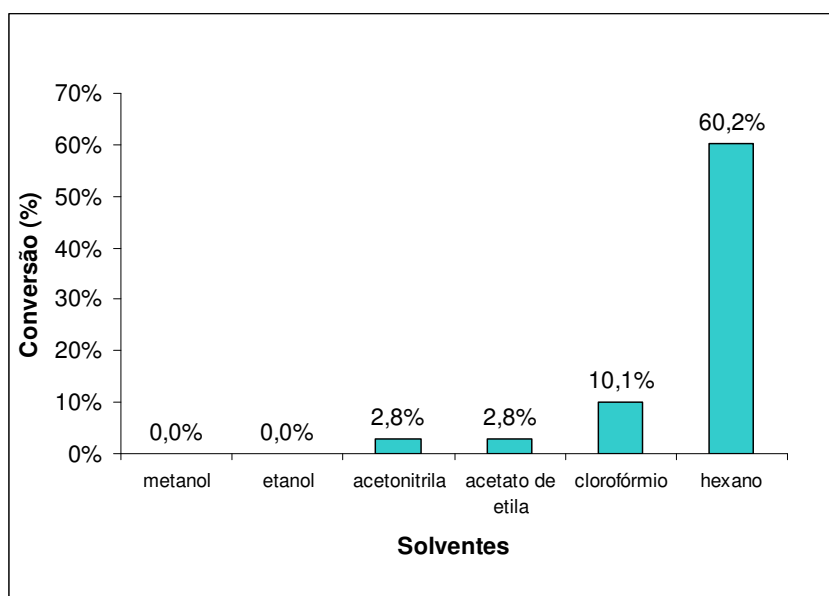


Gráfico 9: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos pela variação do solvente

Os resultados observados neste estudo corroboram com aqueles reportados na literatura (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; LIMA e ANGNES, 1999), onde os solventes hidrofóbicos, clorofórmio e hexano, foram os que apresentaram os melhores

rendimentos de conversão, 10,1% e 60,2%, respectivamente. Com os solventes mais hidrofílicos, metanol e etanol, não foram observadas nenhuma reatividade. Já naqueles de polaridade moderada, acetonitrila e acetato de etila, houve uma pequena reatividade, 2,8%. De acordo com os valores de log P registrados na literatura (LIMA e ANGNES, 1999) para esses solventes [metanol (-0,76), etanol (-0,24), acetonitrila (-,033), acetato de metila (0,16, semelhante ao acetato de etila), clorofórmio (2,00) e hexano (3,50)], os resultados obtidos para acetilação enzimática com EICC podem ser explicados com base neste parâmetro.

5.3.4.4. Influência da Quantidade de Substrato

A quantidade do substrato (álcool anísico) utilizado foi variada com o objetivo de verificar a melhor relação substrato/enzima. Quantidades de 50 a 300 mg do álcool foram submetidas à acetilação, fornecendo rendimentos de conversão entre 18,8 e 52,7%. As condições reacionais foram: agitação mecânica (150 rpm), temperatura (30°C), tempo reacional (60 horas), solvente (20 mL) e quantidade equimolar de anidrido acético. Os resultados encontram-se descritos no **Gráfico 10 (p. 149)**. Examinando-os pôde-se concluir que 200 mg (52,7% de conversão) é realmente a quantidade ideal quando são utilizados 150 mg de EICC, ou seja, 200 mg/150 mg é a melhor relação enzima/substrato.

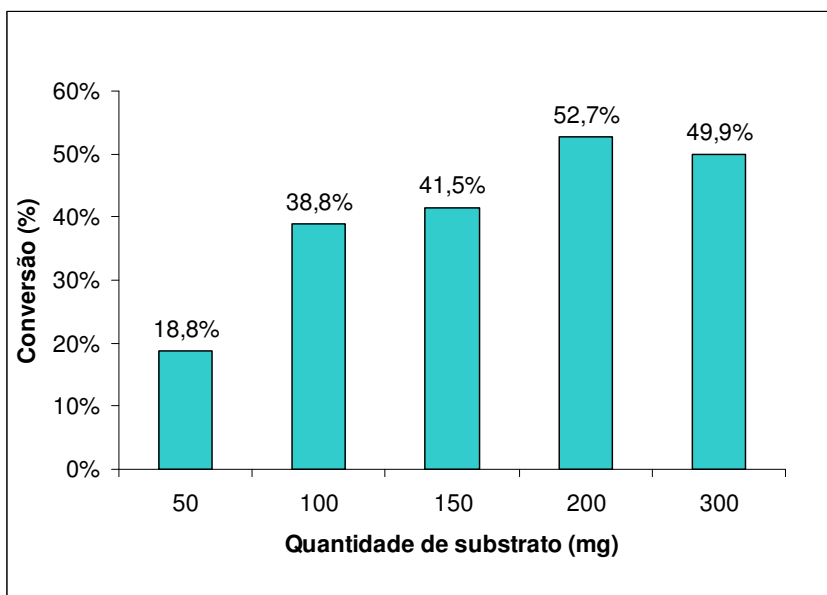


Gráfico 10: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos pela variação da quantidade do substrato (álcool anísico)

5.3.4.5. Influência da Velocidade de Agitação

A velocidade de agitação do sistema também teve influência no rendimento reacional na acetilação do álcool anísico, sendo constatado um aumento na conversão à medida que variou-se a velocidade de agitação de 50 a 150 rpm (**Graf. 11, p. 150**). As condições reacionais, foram: álcool anísico (200 mg), anidrido acético (148 mg), hexano (20 mL), temperatura (30°C) e tempo de reação (60 horas). Analisando os resultados expostos no **Gráfico 11**, pode-se constatar um aumento linear na conversão com a elevação da velocidade de agitação, que pode ser justificado por uma melhor transferência de massa no sistema enzima/substrato.

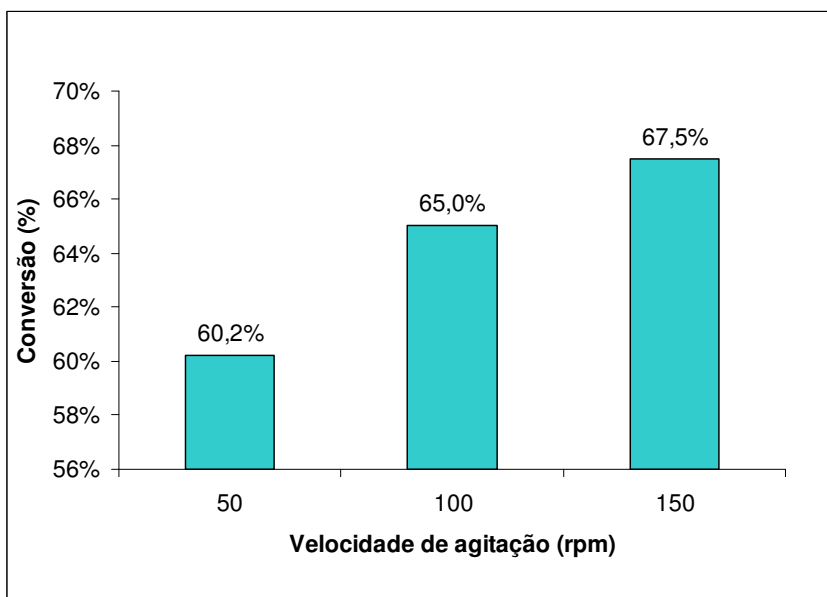


Gráfico 11: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos pela variação da velocidade de agitação

5.3.4.6. Influência da Temperatura

As moléculas de água que se encontram em torno da molécula enzimática, exercem um importante papel na estabilidade térmica da proteína. Entretanto, a água livre é a principal responsável pelas reações que provocam termo-inativação irreversível de enzimas (AHM e KLIBANOV, 1985; ZALE e KLIBANOV, 1986).

Ao serem submetidas por um longo período de tempo a temperaturas elevadas, as enzimas sofrem um desenrolamento, expondo seus grupos reativos e áreas hidrofóbicas mais internas. Todo esse processo acarreta modificações químicas irreversíveis, conduzindo a um estado de desordenamento molecular da enzima (LIMA e ANGNES, 1999), podendo ocorrer deaminação dos resíduos de aspargina e glutamina, hidrólise de ligações peptídicas nos resíduos de ácido aspártico, permuta dissulfeto-tiol, destruição de ligações dissulfeto, oxidação de cisteína, isomerização de proteínas e outros processos, que conduzem à inativação da enzima (VOLKIN e KLIBANOV, 1989). Esses processos exigem a participação de moléculas de água e, portanto, não devem ocorrer em ambientes livres de água como em solventes orgânicos anidros. Diversos trabalhos demonstraram a termoestabilidade de suspensões enzimáticas em solventes orgânicos, muito superior, que em soluções aquosas. Zaks e Klibanov (1984) demonstraram que a lipase

pancreática de suínos em soluções aquosas a 100°C foi completamente inativada em menos de dois minutos, ao passo que nesta mesma temperatura, mantém elevada atividade por várias horas, se o percentual de água não superar 0,4%.

Visando otimizar o rendimento da reação de bioacetilação do álcool anísico, bem como avaliar a termoestabilidade de EICC, foram realizados experimentos em outras temperaturas (50 e 70°C). As condições reacionais utilizadas nestes testes foram: 150 mg de EICC, 200 mg do álcool anísico, 148 mg de anidrido acético e 20 mL de hexano. Para cada temperatura os rendimentos foram monitorados em entre 1 e 24 horas de reação. Os resultados obtidos nas temperaturas de 50°C e 70°C encontram nos **Gráficos 12 (p. 151)** e **13 (p. 152)**, respectivamente.

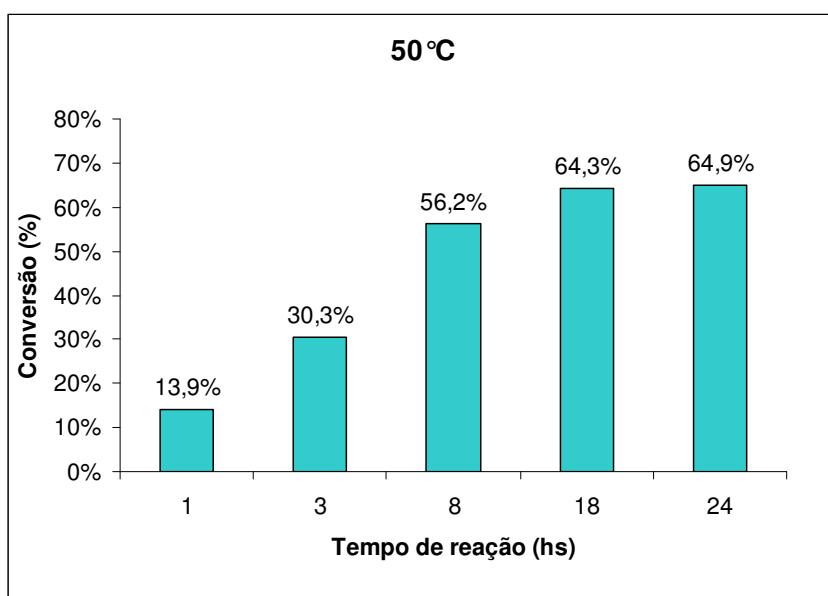


Gráfico 12: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos a 50°C

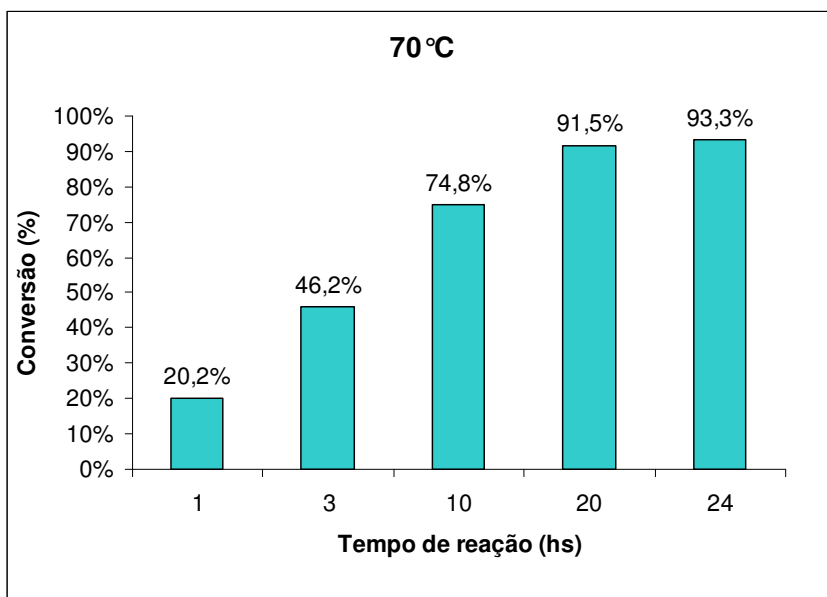


Gráfico 13: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos a 70°C

Observou-se um aumento considerável na conversão com a elevação da temperatura. A 50°C (**Graf. 12, p. 151**), foi detectado uma conversão de 13,9% com apenas 1 hora de reação. O valor (64,3%) obtido em somente 18 horas de reação a 50°C foi próximo daquele (67,8%) obtido em 72 horas de reação a 30°C. Com 24 horas de reação a 50°C verificou-se um aumento de apenas 0,6% no rendimento (64,9%), indicando que o equilíbrio químico e, conseqüentemente, o rendimento máximo para essa temperatura, foram alcançados. O rendimento reacional máximo (93,3%) a 70°C (**Graf. 13, p. 152**) também foi observado após 24 horas de reação, mostrando-se muito superior a aquele obtido a 50°C (64,9%), um aumento percentual de 28,4%. Através dos referidos resultados foi concluído que rendimentos excelentes (93,3%) podem ser obtidos, em menor tempo, quando a reação de bioacetilação do álcool anísico com EICC se processa a 70°C, indicando, também, uma boa termoestabilidade do complexo enzimático imobilizado.

5.3.4.7. Reutilização das Enzimas Imobilizadas (EICC)

Uma das principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas em reações de biocatálise é a possibilidade de reutilização (SOARES et al., 1999), atrelando ao processo

reacional uma maior economia. Objetivando avaliar o potencial de reuso de EICC, a reação de acetilação do álcool anísico foi repetida cinco vezes consecutivas com o mesmo material enzimático, a 30°C. Neste estudo foram utilizadas as condições otimizadas (150 mg de EICC, 200 mg de substrato, 148 mg de anidrido acético, 20 mL de hexano, 150 rpm de agitação e tempo de reação de 72 horas). O intervalo entre uma reação e outra foi de aproximadamente 2 horas. Os resultados encontram-se no **Gráfico 14**.

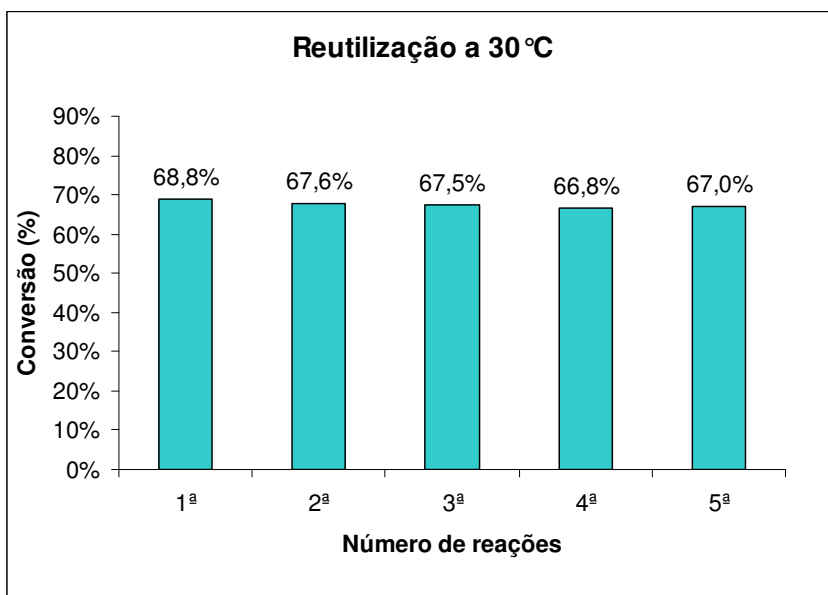


Gráfico 14: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos após cinco reações com o mesmo material enzimático a 30°C

Foi concluído a partir desses resultados que o rendimento de conversão das reações variou muito pouco (2,0%) entre a 1ª e 5ª reações, comprovando que a EICC podem ser reutilizada várias vezes sem modificação acentuada no rendimento.

Também foi testada a reutilização de EICC a 70°C (temperatura que apresentou maior conversão), e os resultados encontram-se no **Gráfico 15 (p. 154)**. Foi observado que nesta temperatura o número de ciclos de reuso é inferior ao apresentado a 30°C, visto que, após a 3ª reação o rendimento já demonstra um decréscimo considerável (7,5%) em relação à 1ª reação.

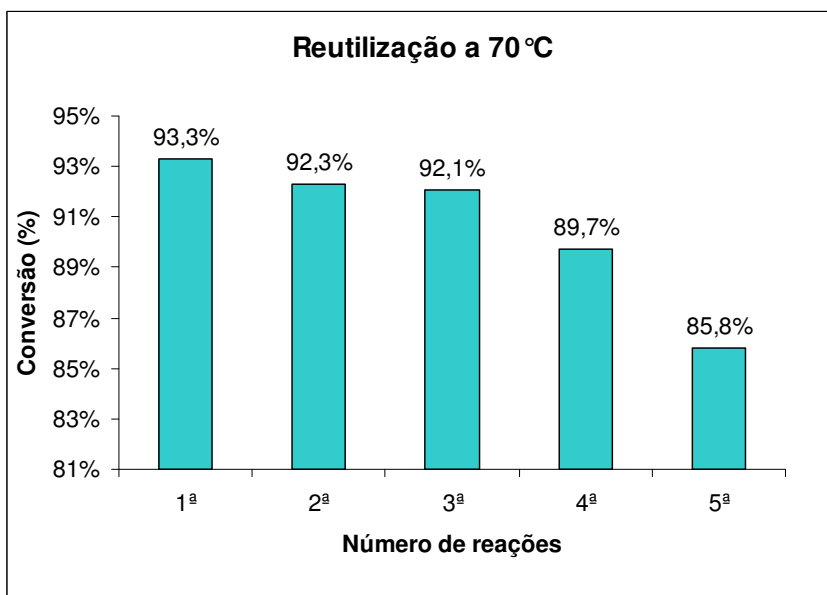


Gráfico 15: Rendimentos reacionais das acetilações do álcool anísico com EICC obtidos após cinco reações com o mesmo material enzimático a 70°C

A seguir são mostrados os espectros de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135° do produto de acetilação do álcool anísico com EICC a 70°C.

A acetilação do álcool anísico catalisada por EICC foi comprovada através dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Assim, os sinais [δ_{H} 7,34 (d) e 6,92 (d); 5,08 (s); 3,83 (s) e 2,11 (s)] registrados no espectro de RMN ^1H (**Fig. 127, p. 141**) do acetato de anisila obtido por via usual, foram observados no correspondente espectro (**Fig. 130, p. 155**) [δ_{H} 7,31 (d) e 6,91 (d); 5,05 (s); 3,81 (s) e 2,09 (s)] do acetato obtido em presença de EICC. A mesma observação foi feita nos espectros de RMN ^{13}C com relação aos sinais [δ_{C} 170,86 (C=O); 159,70 (C); 128,86 (C); 130,11 (CH); 113,97 (CH); 66,08 (OCH₂); 55,21 (OCH₃) e 20,98 (CH₃)] do produto via reação usual e, aos sinais [δ_{C} 171,20,86 (C=O); 159,84 (C); 130,29 (C); 129,59 (CH); 114,14 (CH); 66,32 (OCH₂); 55,46 (OCH₃) e 21,28 (CH₃)] do produto via reação biocatalítica.

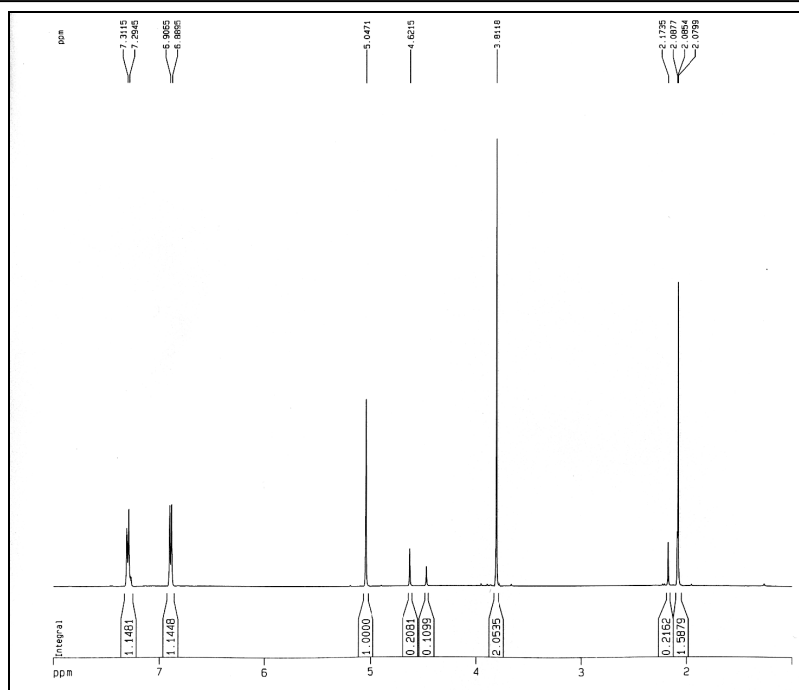


Figura 130: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool anísico com EICC a 70°C

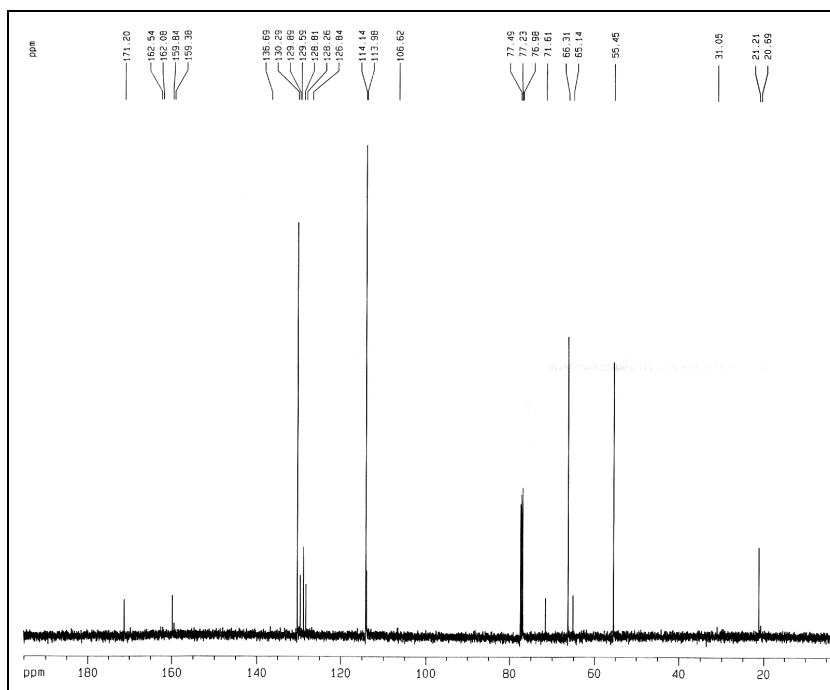


Figura 131: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool anísico com EICC a 70°C

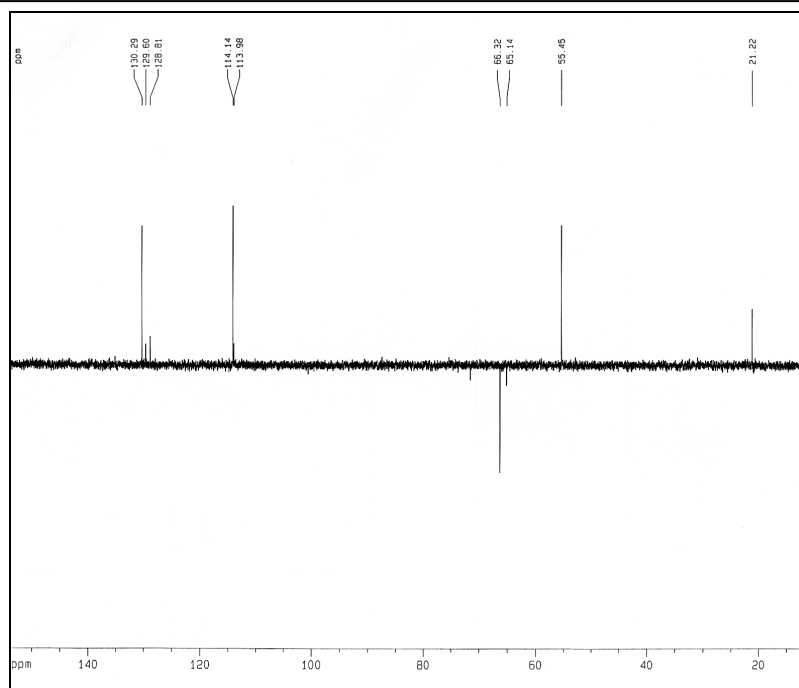


Figura 132: Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool anísico com EICC a 70°C

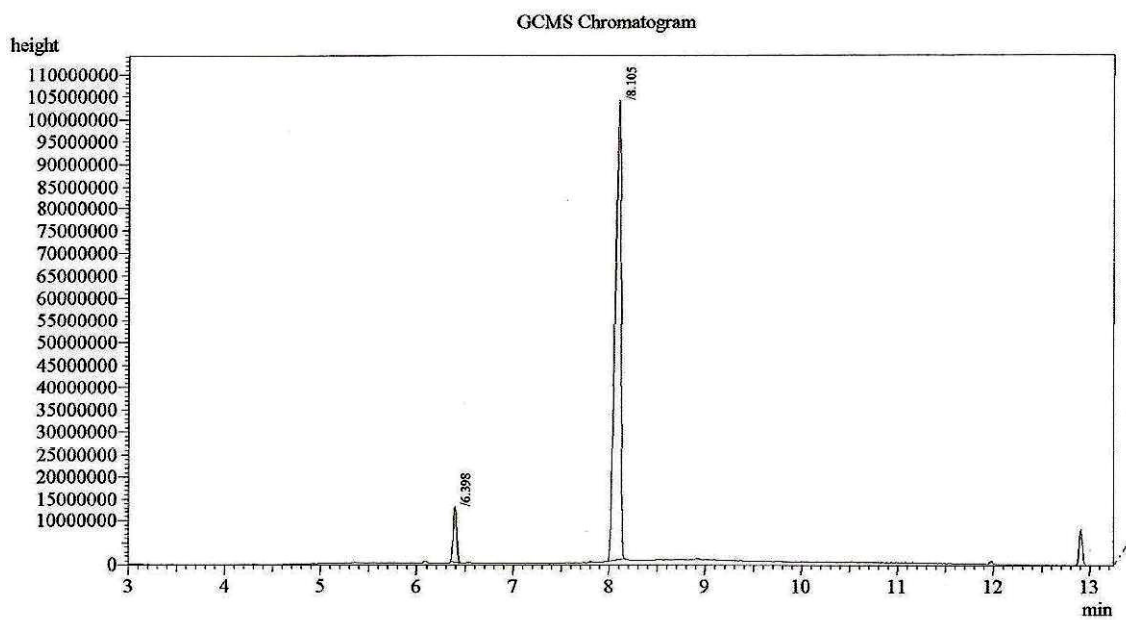


Figura 133: Cromatograma da mistura obtida na bioacetilação do álcool anísico com EICC a 70°C

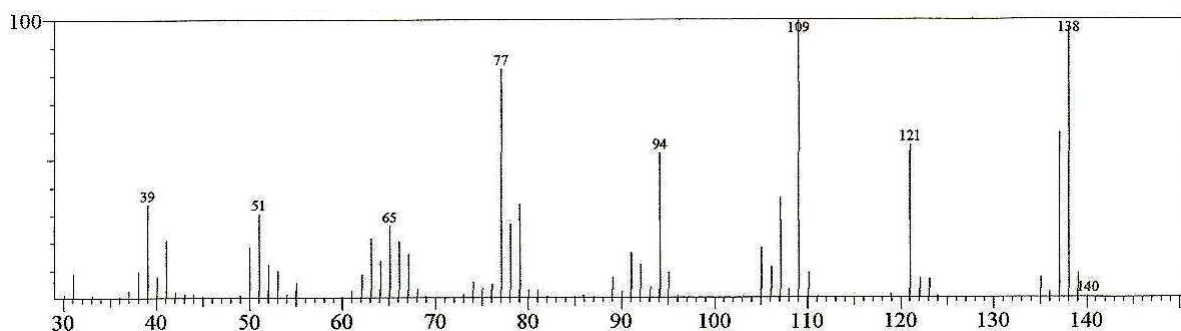


Figura 134: Espectro de massa do álcool anísico, $t_r=6,40$ min (**Fig. 133**)

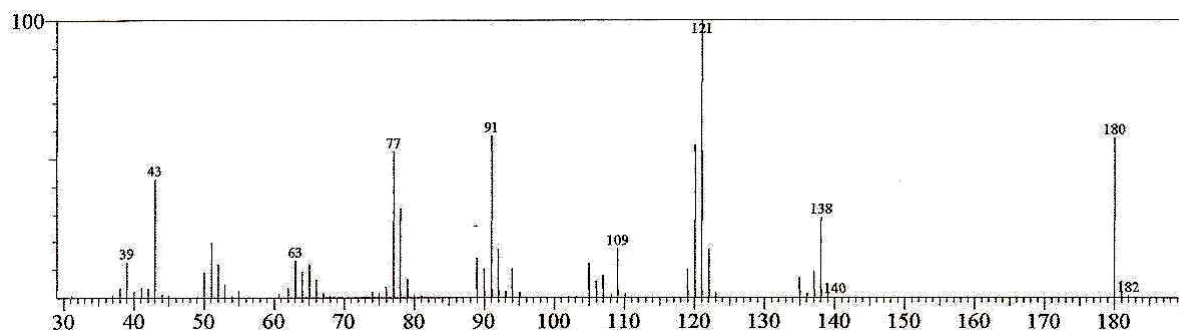


Figura 135: Espectro de massa do acetato de anisila, $t_r=8,10$ (**Fig. 133**)

5.3.5. Acetilação Enzimática de outros Álcoois

Motivados pelos resultados obtidos com a bioacetilação do álcool anísico, estas reações foram estendidas a outros tipos de álcoois (primários, secundários e terciários) e fenóis, utilizando EICC como biocatalisador. Grande parte dos compostos selecionados foram álcoois obtidos a partir da biorredução de substratos carbonilados com o caldo de cana de açúcar bruto (CC) (**Cap. 5, sub-item 5.2, p. 77**). Neste estudo utilizou-se, sempre, as condições otimizadas para EICC na bioacetilação do álcool anísico (**Cap. 5, sub-item 5.3.4, p. 143**), sendo: 200 mg do substrato (álcool ou fenol), 1 equivalente de anidrido acético, 150 mg de EICC, 30°C de temperatura, 72 horas e agitação de 150 rpm. Em alguns casos avaliou-se, ainda, a influencia da temperatura nos rendimentos de conversão, efetuando as reações também a temperatura de 70°C por 24 horas (condição otimizada com o álcool anísico para a temperatura e o tempo). Os produtos reacionais foram analisados e tiveram seus rendimentos de conversão calculados por RMN ^1H e CG-EM. As conversões obtidas por RMN ^1H foram determinados através da

comparação da integração dos sinais referentes ao(s) hidrogênio(s) carbinólico(s) do álcool com o(s) correspondente(s) hidrogênio(s) do acetato (**Tab. 59, p. 203**).

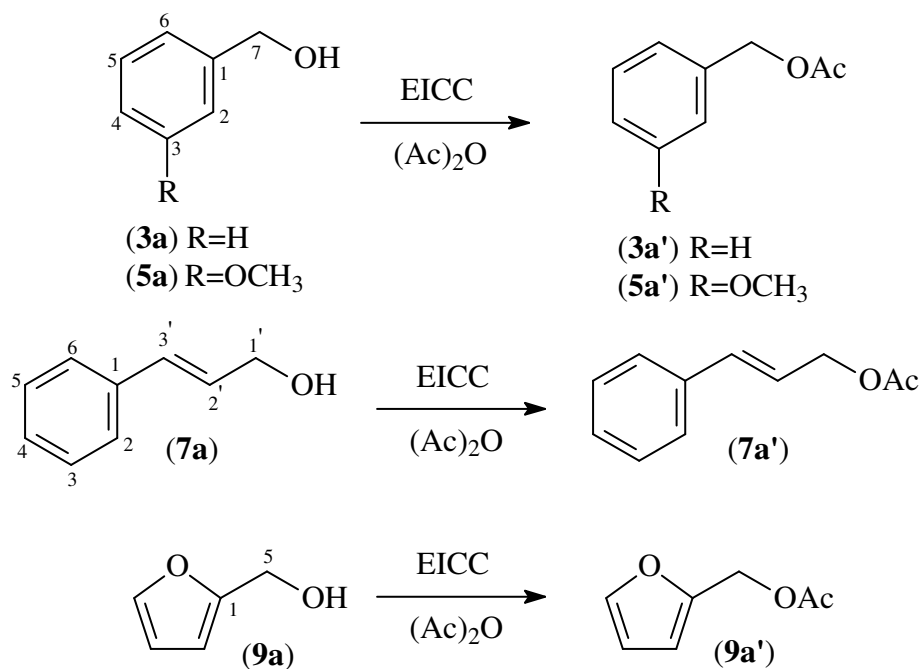
5.3.5.1. Acetilação Enzimática de Álcoois Primários

A bioacetilação foi efetuada com a utilização de dois grupos de alcoóis: aromáticos e alifáticos.

❖ Aromáticos

Os álcoois aromáticos primários submetidos à acetilação enzimática com EICC foram: benzílico (**3a**), 3-metoxibenzílico (**5a**), cinâmico (**7a**) e furfúrico (**9a**) (**Esq. 4**).

Esquema 4



Os resultados foram descritos na **Tabela 54 (p. 159)**. Os álcoois benzílico (**3a**) e 3-metoxibenzílico (**5a**), análogos químicos do álcool anísico (padrão utilizado na determinação dos parâmetros ótimos de EICC) exibiram conversões (42,3% e 46,2%, respectivamente) a 30°C, inferiores aos do álcool anísico (>60%) nesta mesma temperatura. Constatação semelhante ocorreu quando a reação foi realizada a 70°C, onde o rendimento de conversão (93,3%) obtido

para o álcool anísico foi superior a aqueles obtidos para os álcoois benzílico e 3-metoxibenzílico (77,7% e 68,1%, respectivamente).

Tabela 54: Rendimentos de conversão da bioacetilação dos álcoois aromáticos primários

álcool	RMN ¹ H (%)		CG-EM (%)	
	30°C	70°C	30°C	70°C
3a	35,0	80,2	42,3	77,7
5a	26,8	68,3	46,2	68,9
7a	36,6	74,2	41,4	71,6
9a	39,0	-	49,7	-

A reação de acetilação do álcool cinâmico (**7a**) apresentou conversões de 41,4% e 71,6%, a 30°C e 70°C, respectivamente, semelhantes aos álcoois **3a** e **5a**. A bioacetilação do álcool furfurílico (**9a**) foi realizada somente a 30°C, contudo, houve também uma semelhança em termos de resultados (49,7%) em relação aos outros álcoois aromáticos.

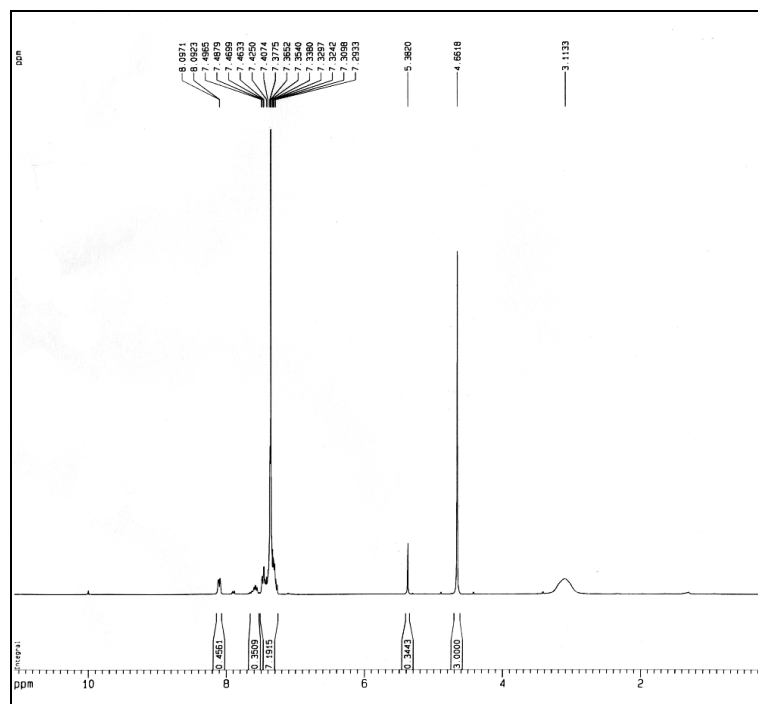


Figura 136: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do padrão álcool benzílico (**3a**)

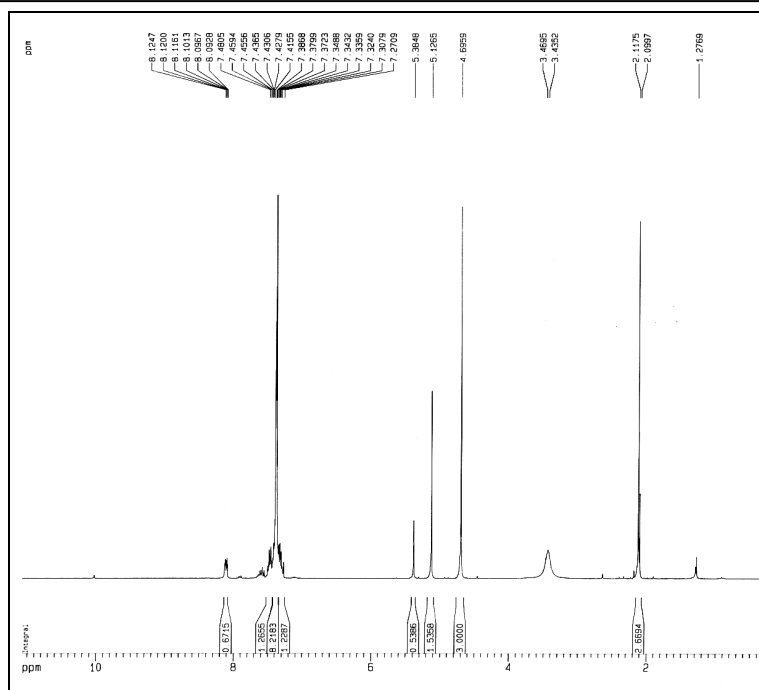


Figura 137: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool benzílico (**3a**) com EICC a 30°C

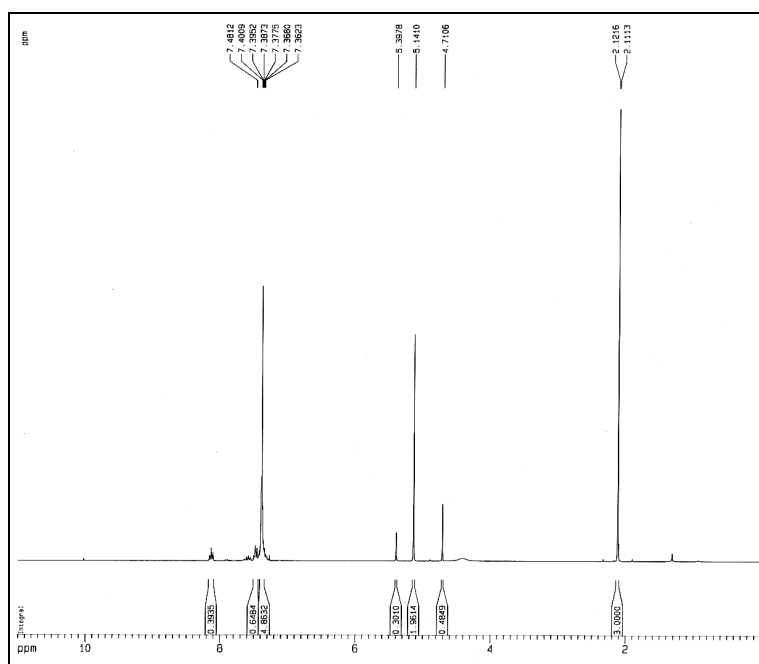


Figura 138: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool benzílico (**3a**) com EICC a 70°C

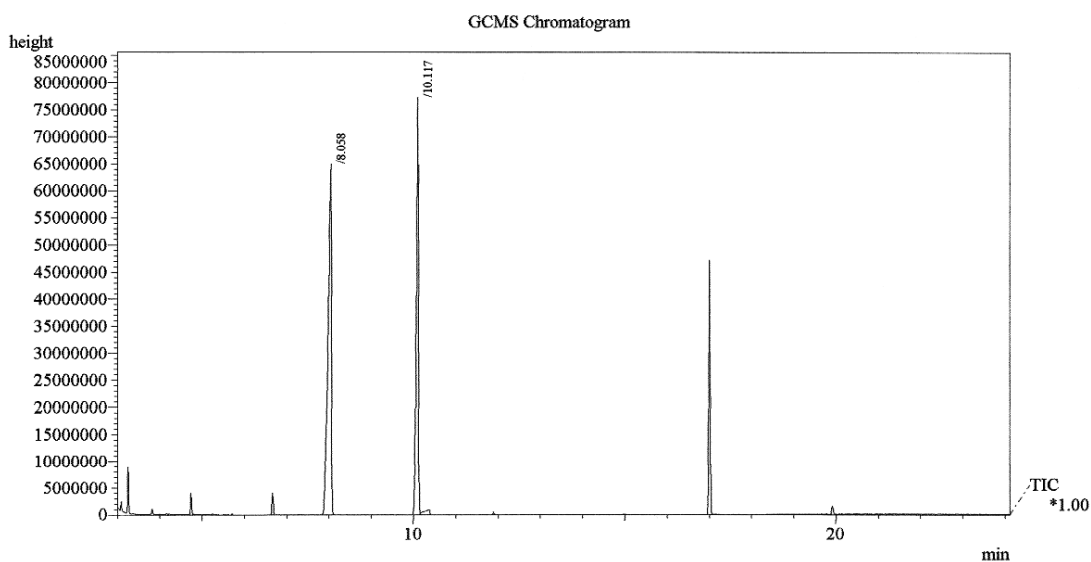


Figura 139: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool benzílico (**3a**) com EICC a 30°C

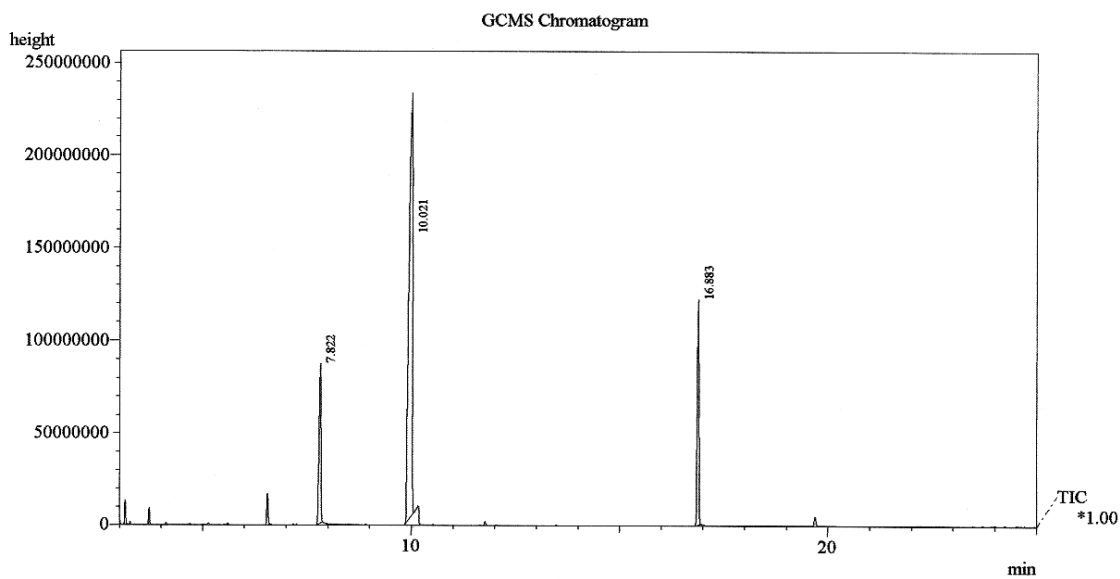


Figura 140: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool benzílico (**3a**) com EICC a 70°C

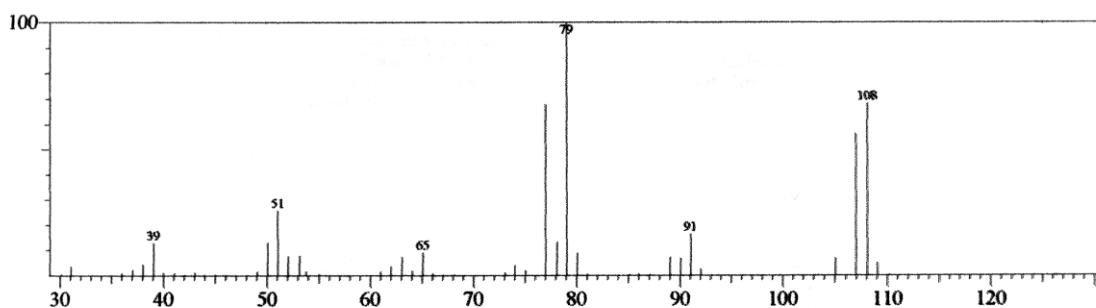


Figura 141: Espectro de massa do álcool benzílico (**3a**), tr: 8,06 min (**Fig. 141**)

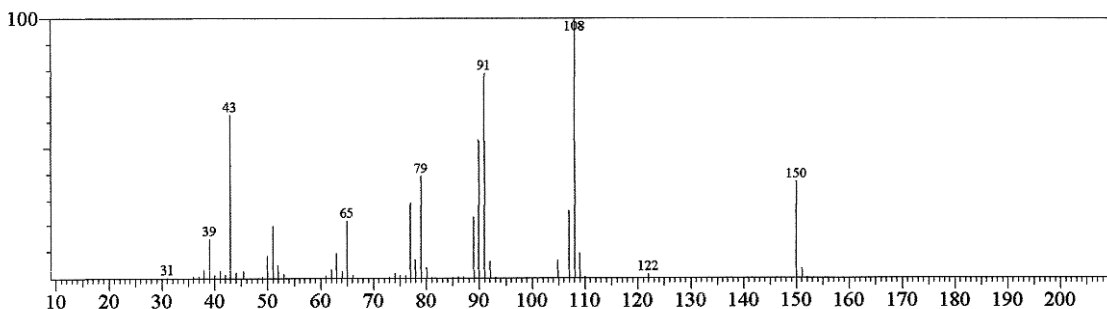
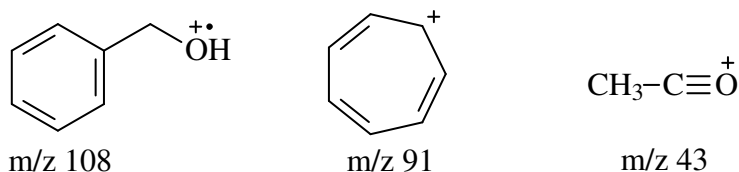


Figura 142: Espectro de massa do acetato de benzila (**3a'**), tr: 10,12 min (**Fig. 141**)

Na maior parte dos casos, os rendimentos de conversão obtidos por RMN ^1H foram determinados através da comparação da integração dos sinais referentes ao(s) hidrogênio(s) carbinólico(s) do álcool com o(s) correspondente(s) hidrogênio(s) do acetato. Os resultados da **Tabela 59** (p. 203) demonstraram, claramente, a evolução das reações em diferentes temperaturas, através da comparação dos espectros de RMN ^1H . Por exemplo, no caso do álcool benzílico (**3a**), na reação a 30 °C, o espectro (**Fig. 137, p. 160**) registrou a presença da mistura binária de **3a** e **3a'**, porém, a integração da área do sinal em δ_{H} 4,69 dos hidrogênios do álcool tem quase o dobro da integração do sinal em δ_{H} 5,12 dos correspondentes hidrogênios do acetato. Por outro lado, na reação a 70 °C (**Fig. 138, p. 160**), o sinal em δ_{H} 4,71 dos hidrogênios carbinólicos tem, aproximadamente, apenas $\frac{1}{4}$ da integração do sinal em δ_{H} 5,14, dos correspondentes hidrogênios do acetato, em acordo com o maior rendimento do acetato na reação a 70 °C e conforme expresso na **Tabela 54** (p. 159). Em adição, o sinal simples em δ_{H} 2,10 dos hidrogênios do grupo metila no espectro do acetato obtido na reação a 70 °C, tem área maior que o mesmo sinal no acetato obtido a 30 °C. A acetilação foi corroborada também pela comparação dos espectros de massa do álcool e do acetato, onde foram observados picos correspondentes aos

íons moleculares em m/z 108 e 150, respectivamente. No espectro de massa do produto, os principais picos em m/z 108 (100%), 91 (80%) e 43 (63%), ratificaram a estrutura do acetato de benzila (**3a'**).



Praticamente, as mesmas observações e conclusões em relação aos espectros de RMN ^1H e de massa, puderam ser feitas para os produtos das reações efetuadas com os substratos **3a**, **5a**, **7a**, **9a**, **23**, **24**, **25**, **10a**, **1a**, **2a** e **13a**. As reações com os álcoois furfurílico (**9a**), amílico (**23**), feniletan-1-ol (**1a**), 3-metoxi-feniletan-1-ol (**2a**) foram efetuadas somente na temperatura de 30 $^\circ\text{C}$.

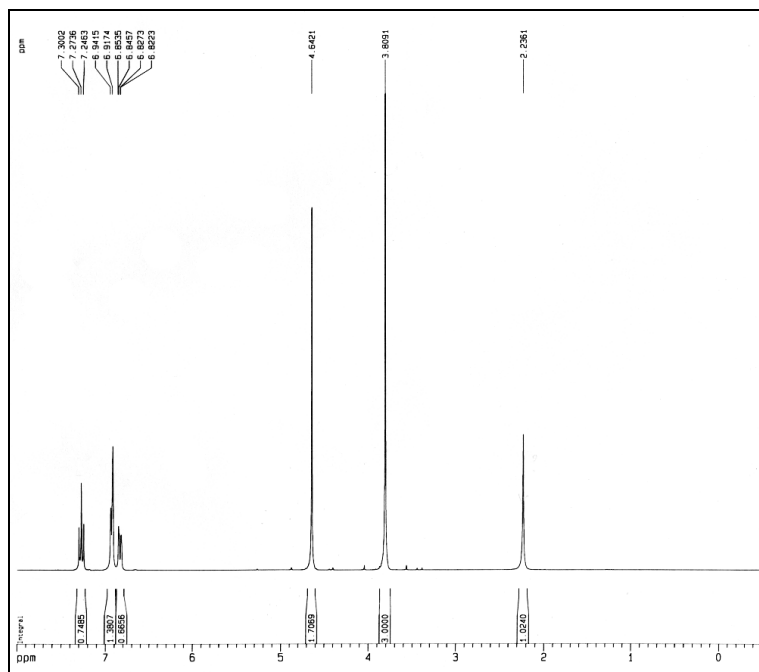


Figura 143: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão álcool 3-metoxibenzílico (**5a**)

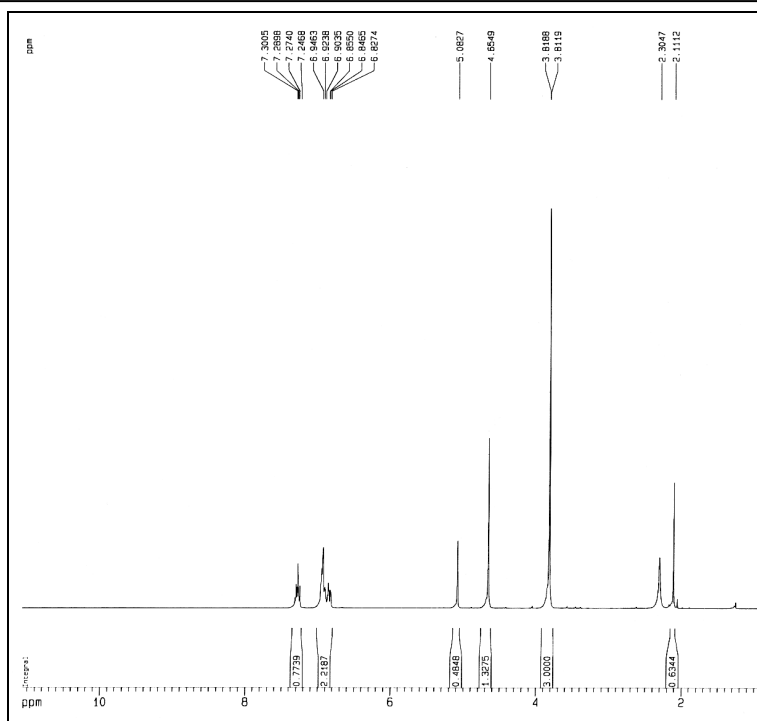


Figura 144: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool 3-metoxibenzílico (**5a**) com EICC a 30°C

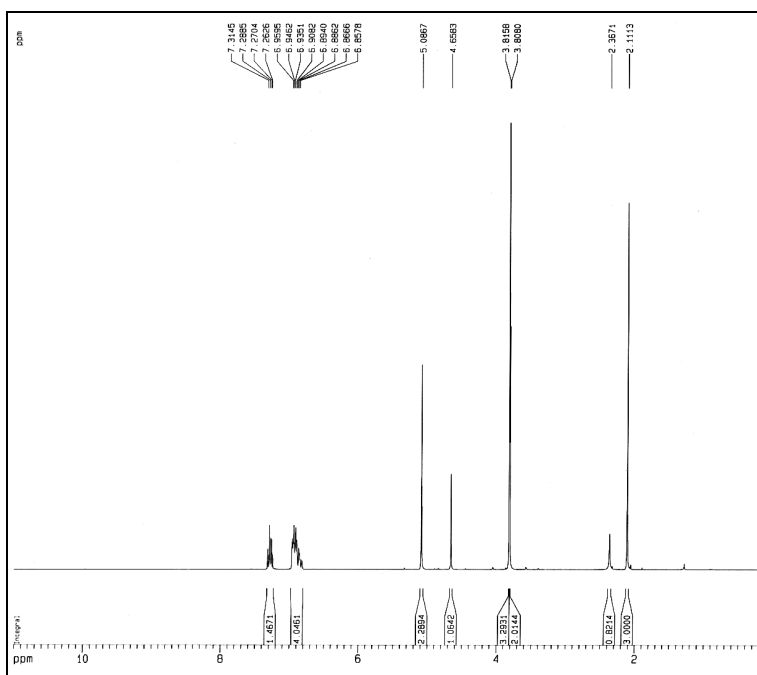


Figura 145: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool 3-metoxibenzílico (**5a**) com EICC a 70°C

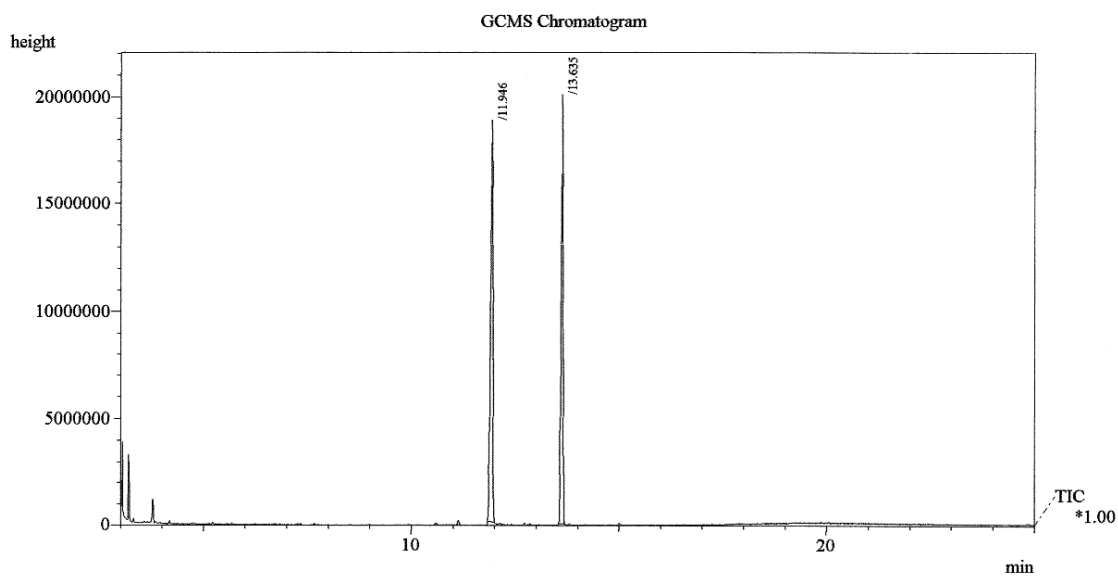


Figura 146: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool 3-metoxibenzílico (**5a**) com EICC a 30°C

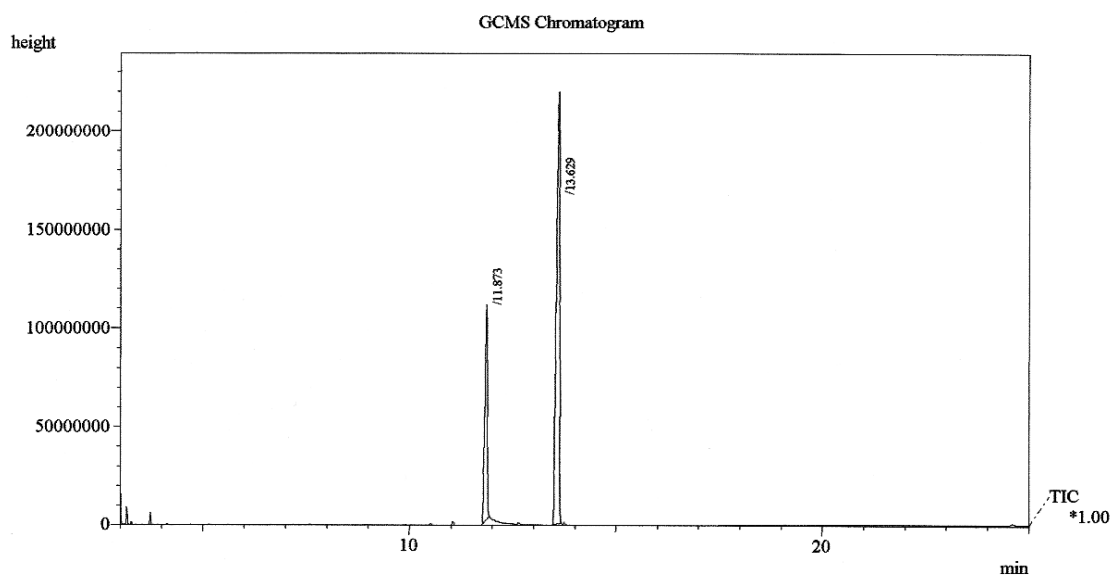


Figura 147: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool 3-metoxibenzílico (**5a**) com EICC a 70°C

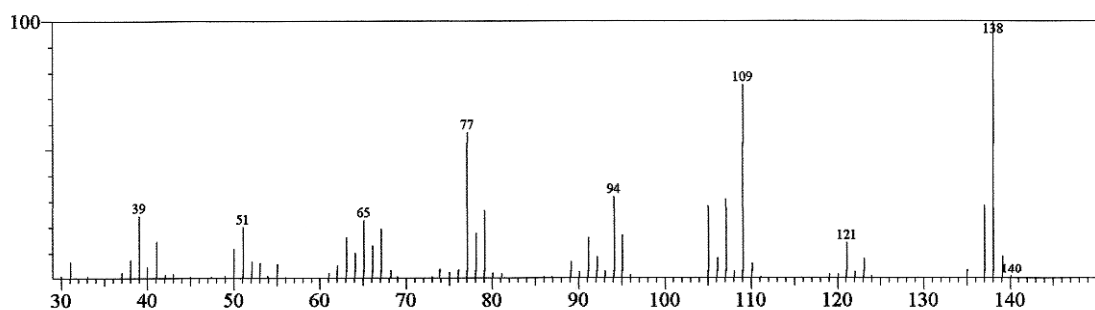


Figura 148: Espectro de massa do álcool 3-metoxibenzílico (**5a**), tr: 11,95 min (Fig. 146)

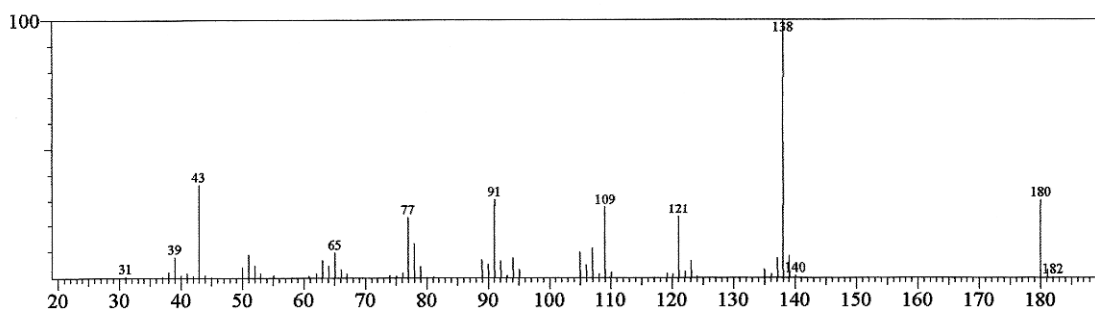


Figura 149: Espectro de massa do acetato de 3-metoxibenzila (**5a'**), tr: 13,63 min (Fig. 146)

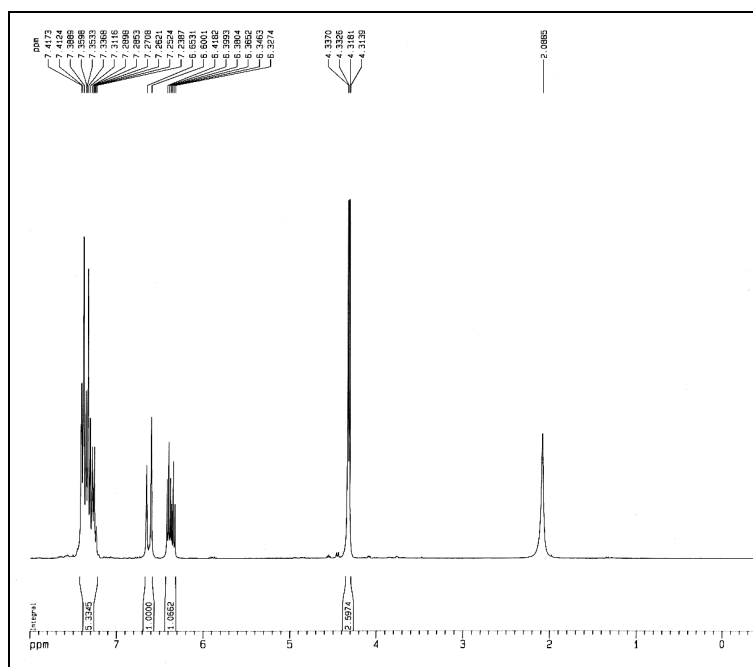


Figura 150: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão álcool cinâmico (**7a**)

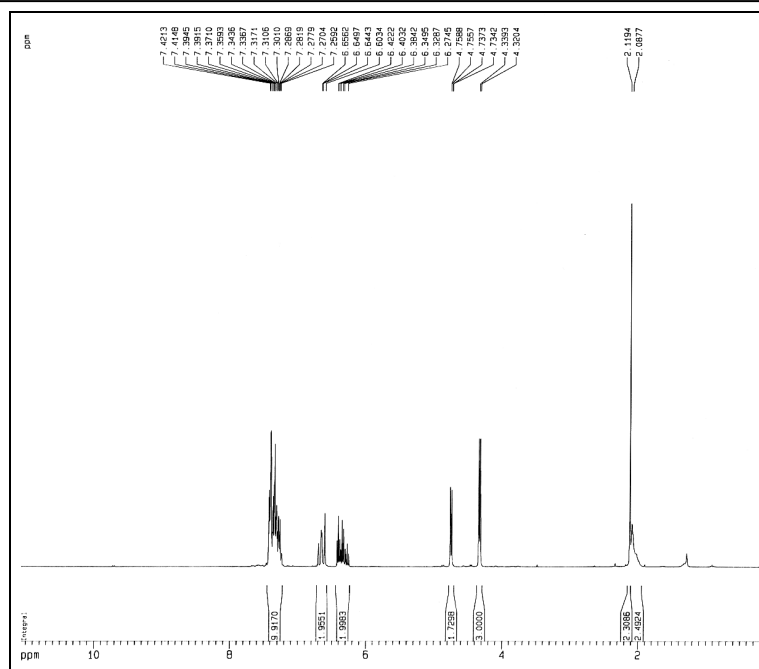


Figura 151: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool cinâmico (**7a**) com EICC a 30°C

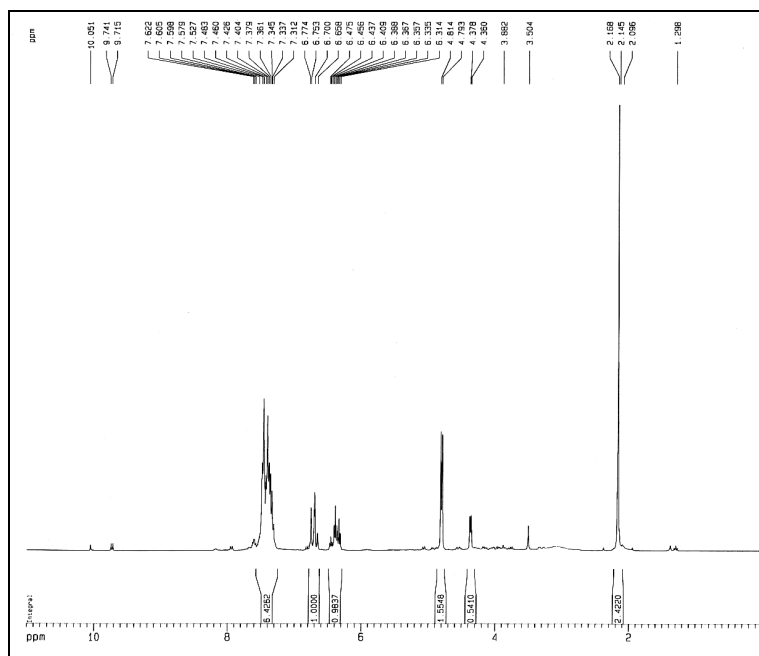


Figura 152: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool cinâmico (**7a**) com EICC a 70°C

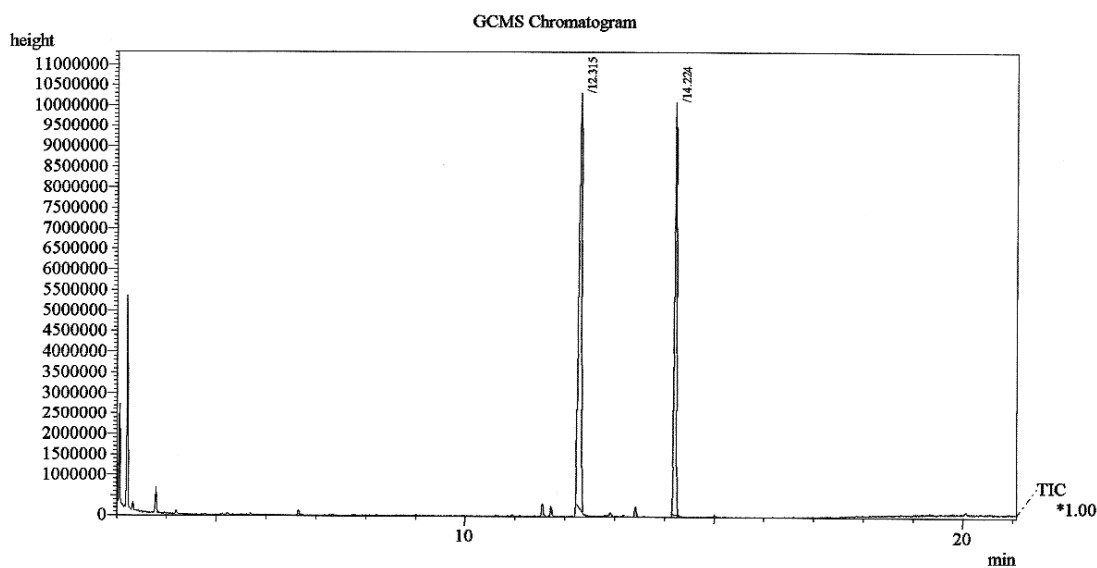


Figura 153: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool cinâmico (**7a**) com EICC a 30°C

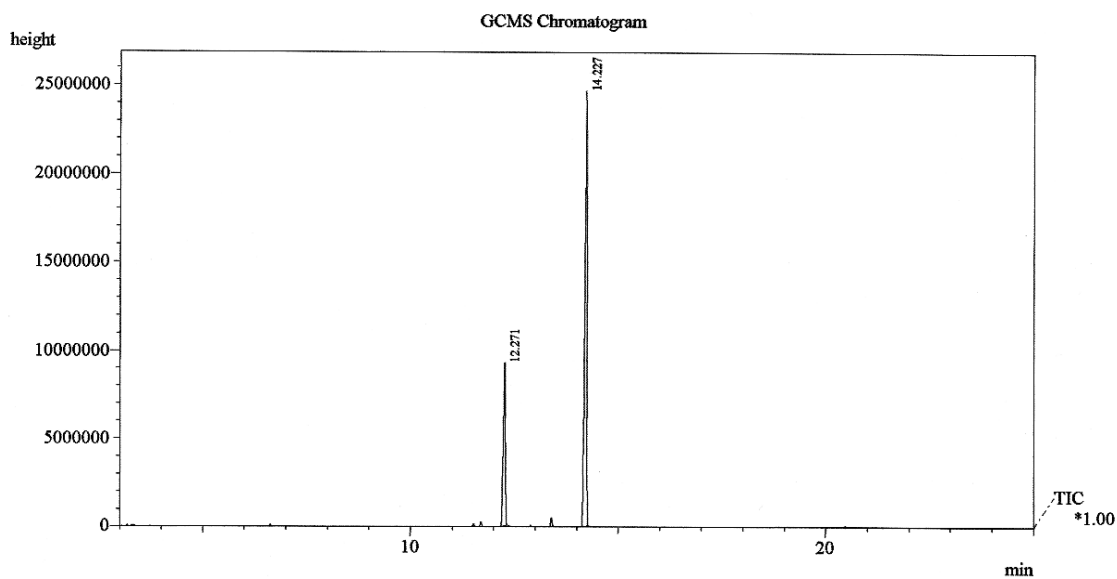


Figura 154: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool cinâmico (**7a**) com EICC a 70°C

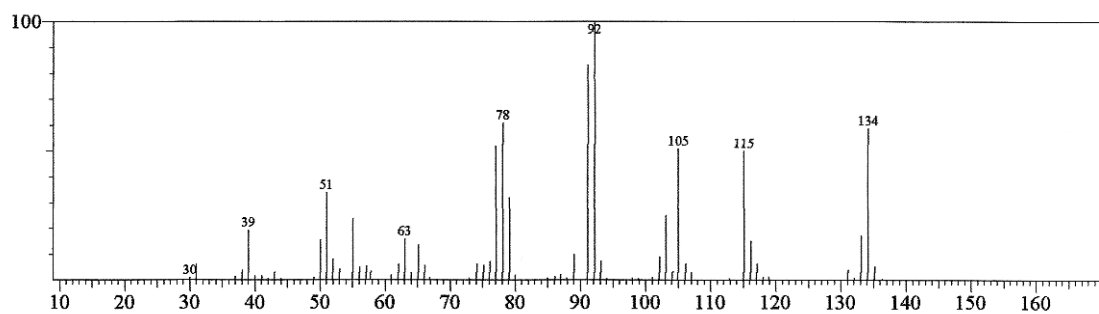


Figura 155: Espectro de massa do álcool cinâmico (7a), tr: 12,31 min (Fig. 153)

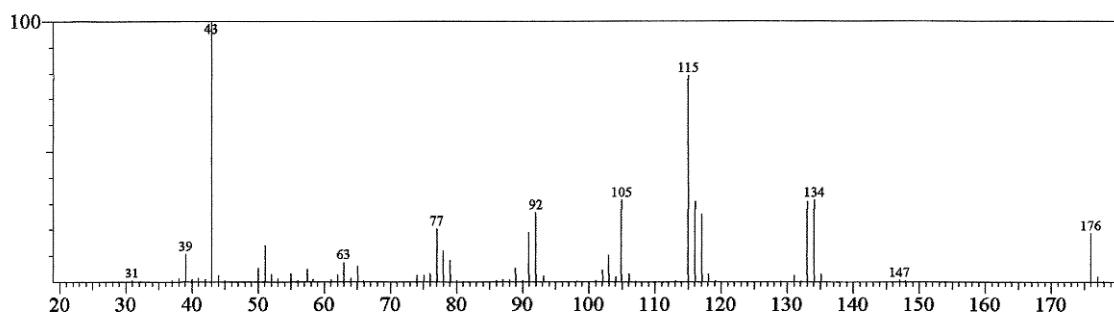


Figura 156: Espectro de massa do acetato de cinamila (7a'), tr: 14,23 min (Fig. 153)

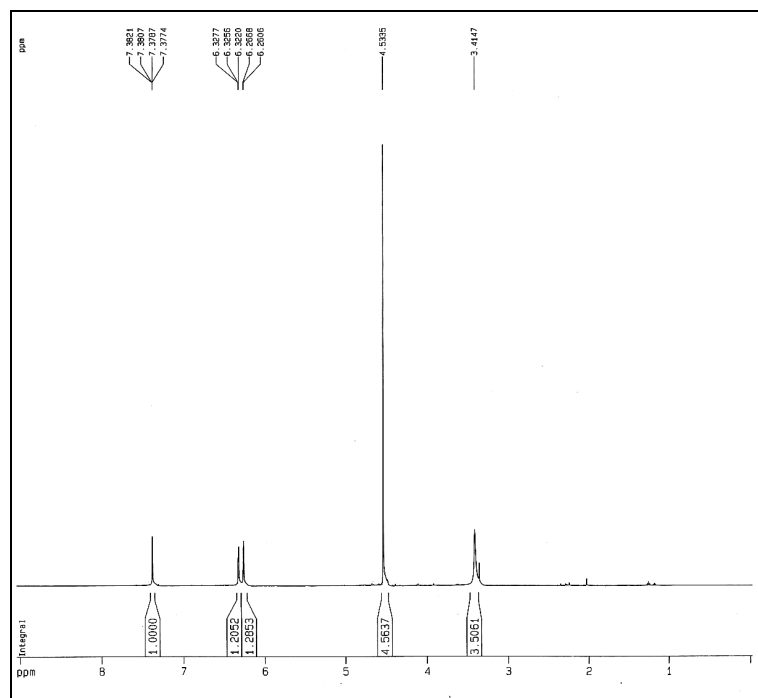


Figura 157: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do padrão álcool furfurfílico (9a)

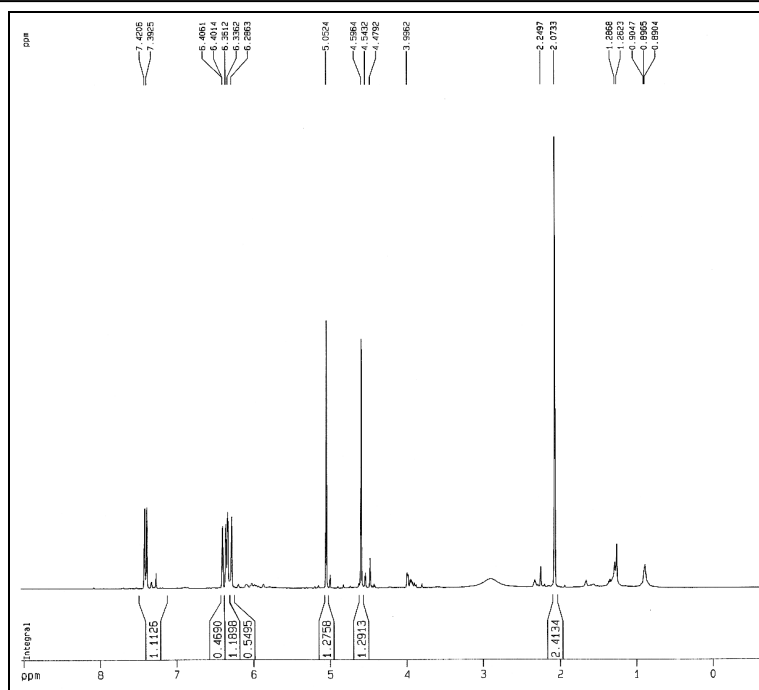


Figura 158: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool furfurílico (**9a**) com EICC a 30°C

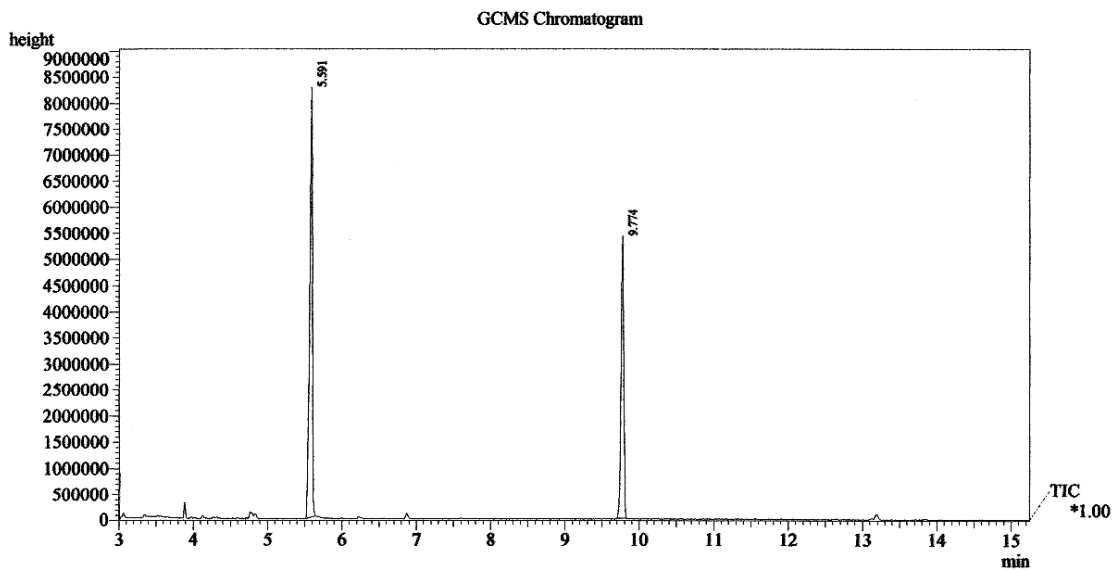


Figura 159: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool furfurílico (**9a**) com EICC a 30°C

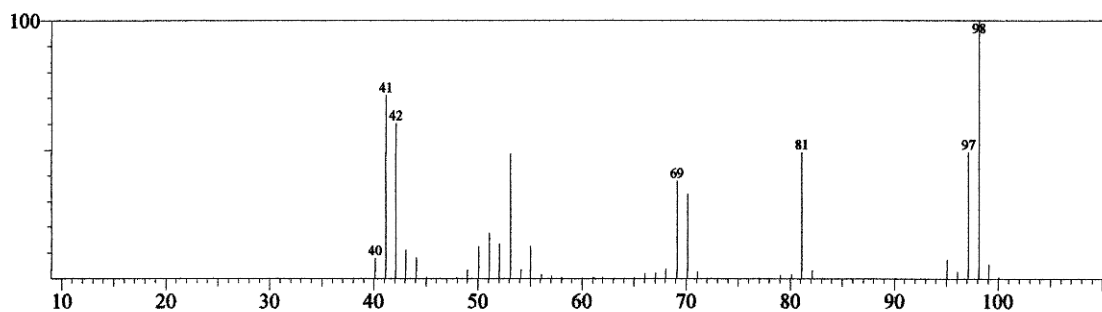


Figura 160: Espectro de massa do álcool furfurílico (**9a**), tr: 5,59 min (**Fig. 159**)

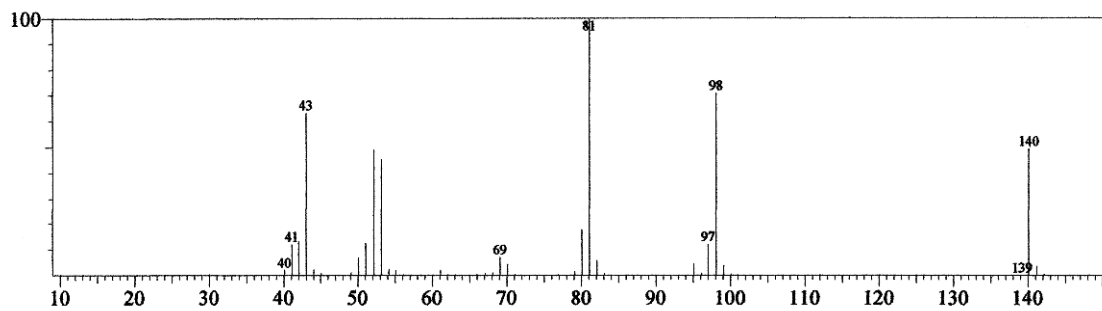
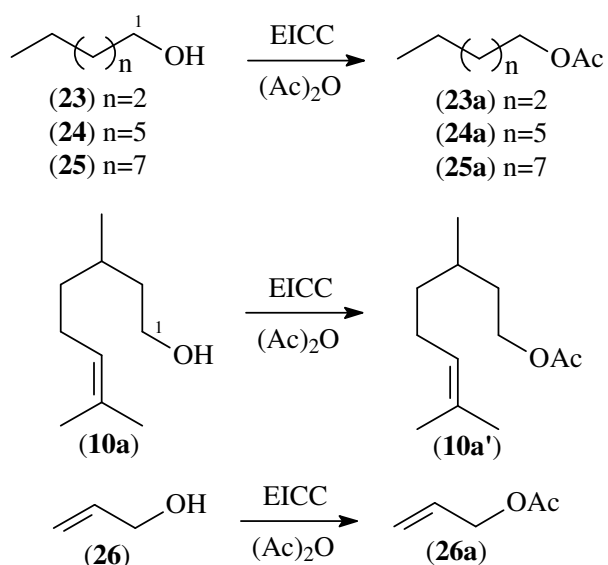


Figura 161: Espectro de massa do acetato de furfurila (**9a'**), tr: 9,77 min (**Fig. 159**)

❖ Alifáticos

Os álcoois alifáticos submetidos à bioacetilação foram: amílico (**23**), octílico (**24**), decanóico (**25**), citronelol (**10a**) e alílico (**26**) (**Esq. 5, p. 172**). Na **Tabela 55 (p. 172)** encontram-se registrados os resultados coletados neste estudo.

Esquema 5

**Tabela 55:** Rendimentos de conversão da bioacetilação dos álcoois alifáticos primários

álcool	RMN ¹ H (%)		CG-EM (%)	
	30°C	70°C	30°C	70°C
23	53,6	-	80,9	91,7
24	31,6	75,5	44,7	85,9
25	32,2	85,0	43,9	82,7
10a	44,3	79,6	33,0	73,0
26	-	-	7,7	-

As acetilações dos álcoois primários de cadeia aberta saturada normal **23** (C₅), **24** (C₈) e **25** (C₁₀) exibiram bons rendimentos de conversão (80,9%, 44,7% e 43,9%, respectivamente) reacionais a 30°C. Quando a reação foi realizada a 70°C os rendimentos de conversão (91,7%, 85,9% e 82,7%) dos produtos de **23**, **24** e **25**, respectivamente, elevaram-se consideravelmente, demonstrando a grande influencia térmica na atividade enzimática de EICC. Foi observado ainda, a grande susceptibilidade a bioacetilação do álcool **23** (C₅), comparado aos álcoois de cadeia homóloga **24** (C₈) e **25** (C₁₀). O monoterpene de cadeia aberta **10a**, citronelol, apresentou uma razoável conversão a 30°C (33,0%) e boa a 70°C (73,0%), com um aumento de 40% de rendimento sob um aumento de 40°C na temperatura. Já para o álcool alílico (**26**), uma baixa

reatividade foi observada, com uma conversão de apenas 7,7%, calculado somente por CG-EM. A alta volatilidade, da mistura álcool alílico/acetato de alila, impediu sua separação do solvente (hexano) por destilação. Porém, uma alíquota retirada diretamente da mistura reacional permitiu a obtenção do CG-EM.

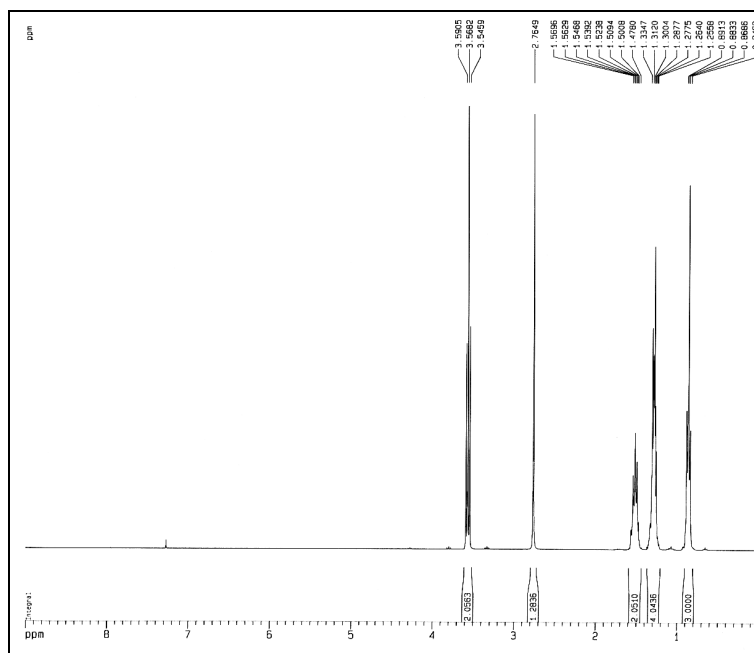


Figura 162: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão álcool amílico (27)

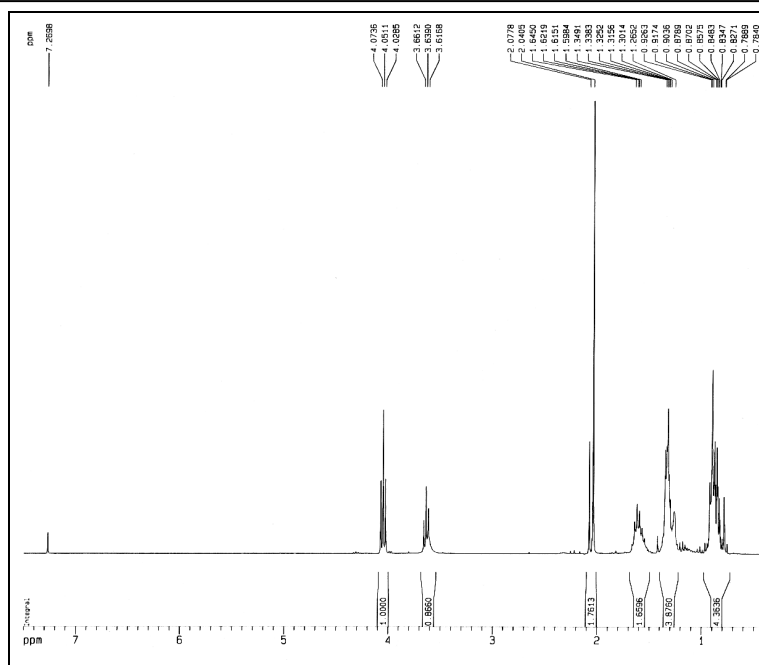


Figura 163: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool amílico (**23**) com EICC a 30°C

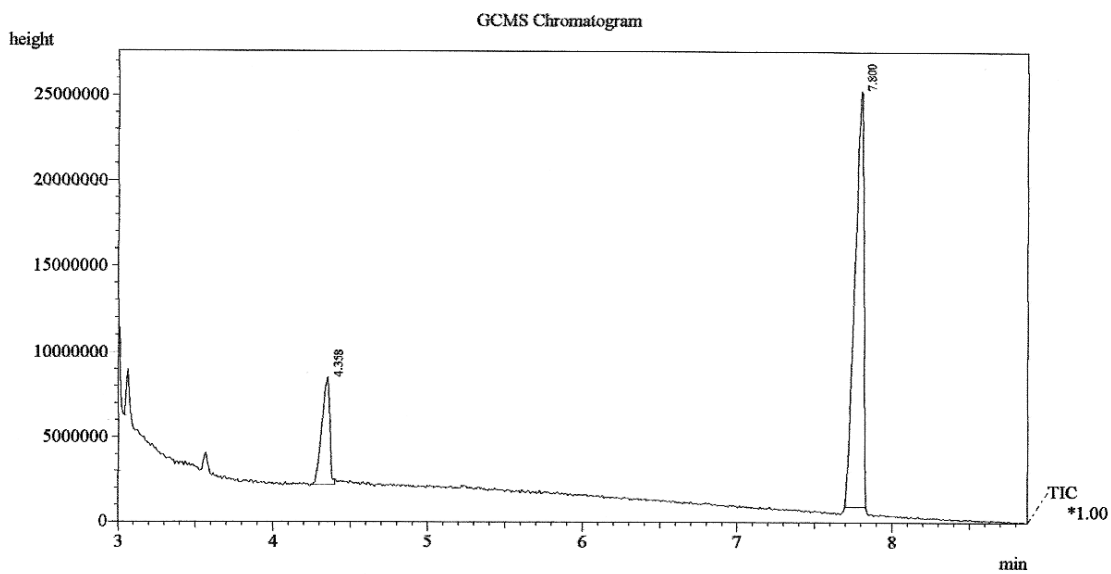


Figura 164: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool amílico (**23**) com EICC a 30°C

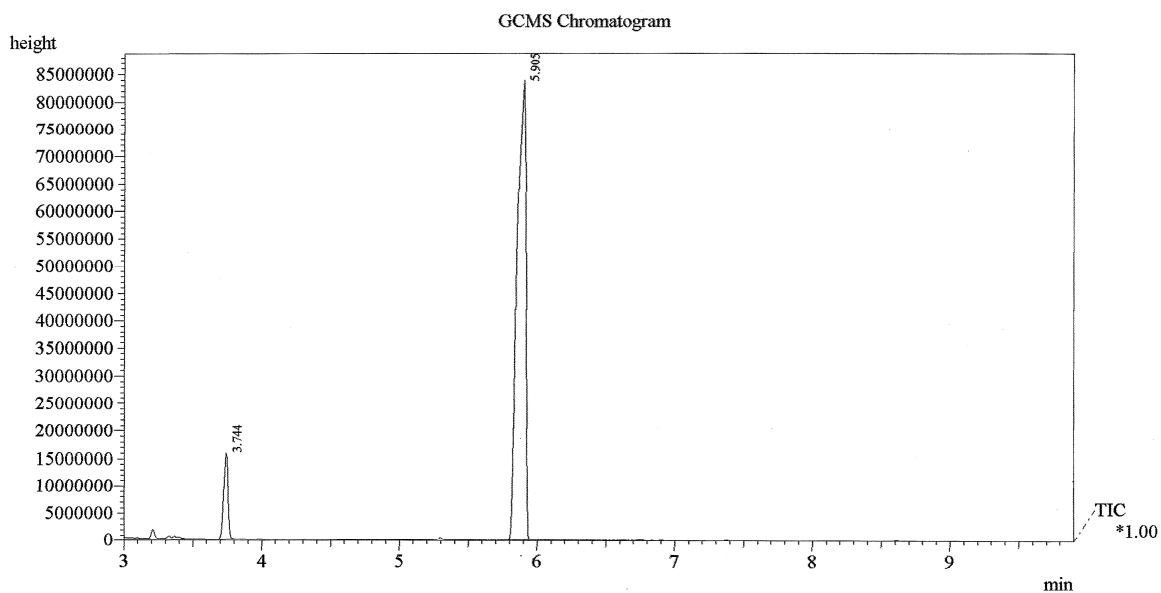


Figura 165: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool amílico (23) com EICC a 70°C

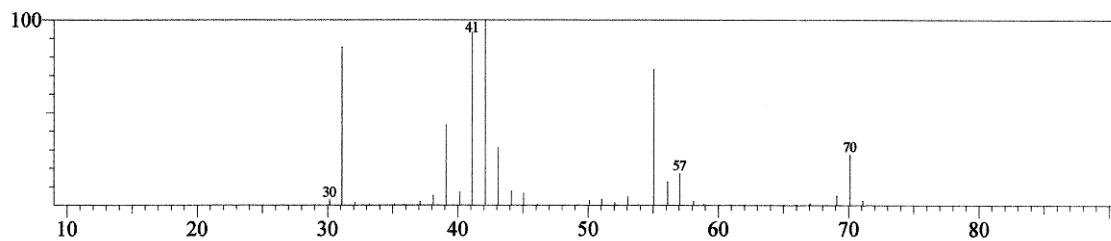


Figura 166: Espectro de massa do álcool amílico (23), tr: 4,36 min (Fig. 164)

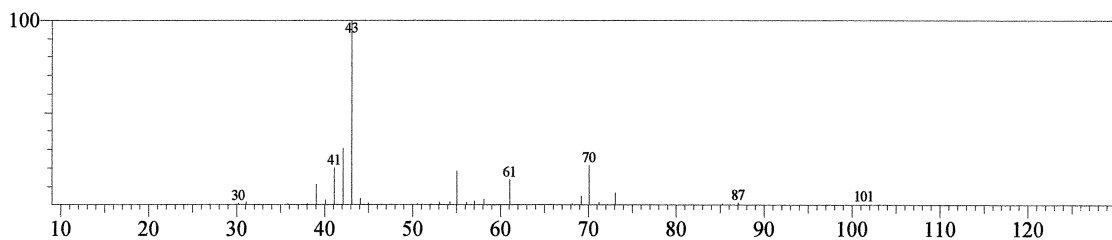


Figura 167: Espectro de massa do acetato de amilila (23a), tr: 7,80 min (Fig. 164)

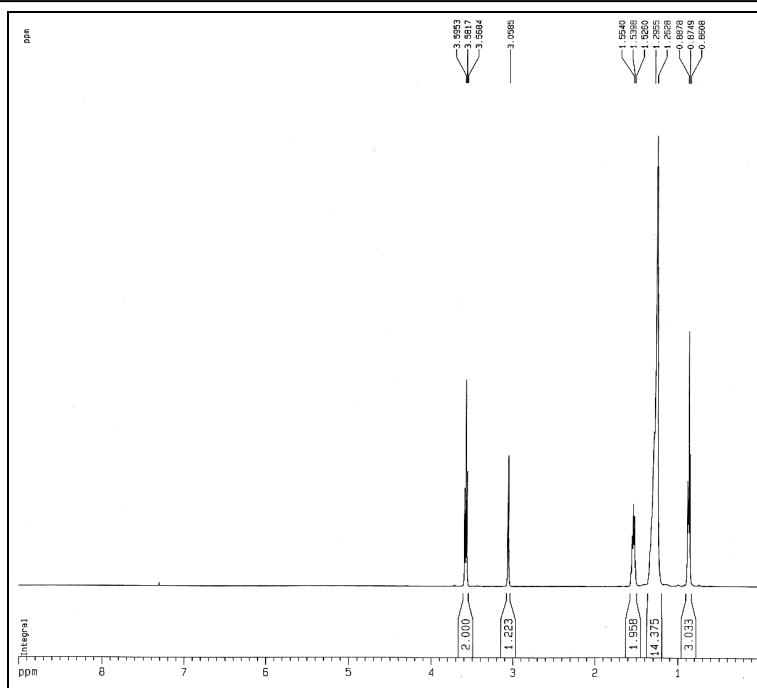


Figura 168: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do padrão álcool octílico (**24**)

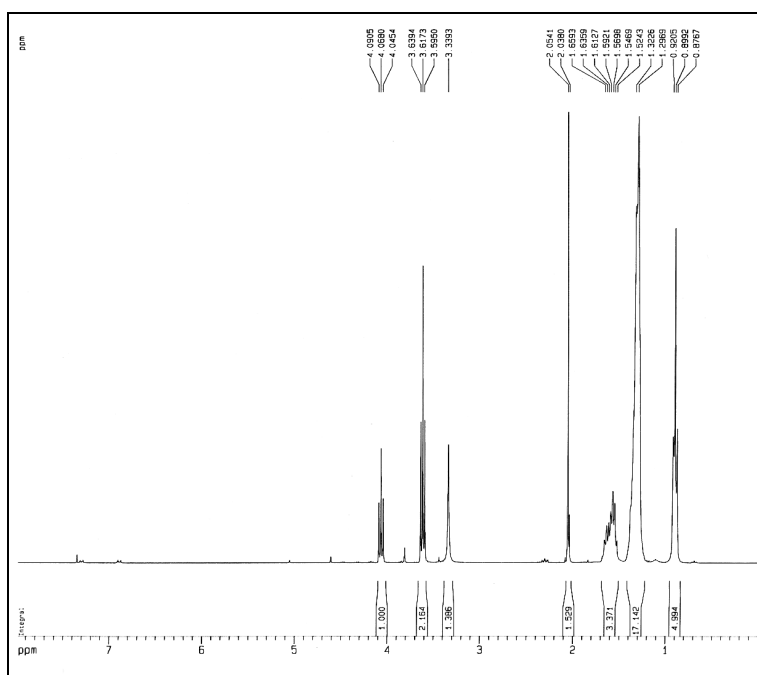


Figura 169: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool octílico (**24**) com EICC a 30°C

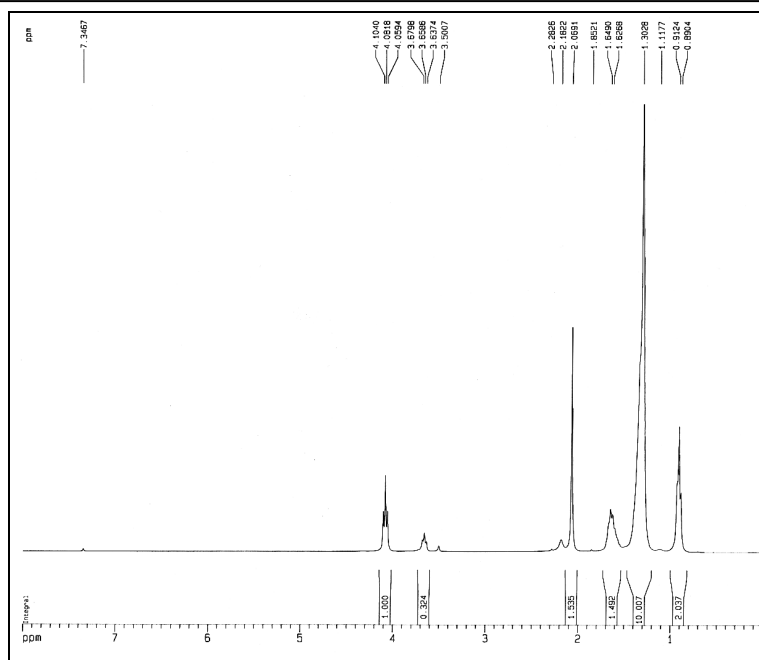


Figura 170: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool octílico (**24**) com EICC a 70°C

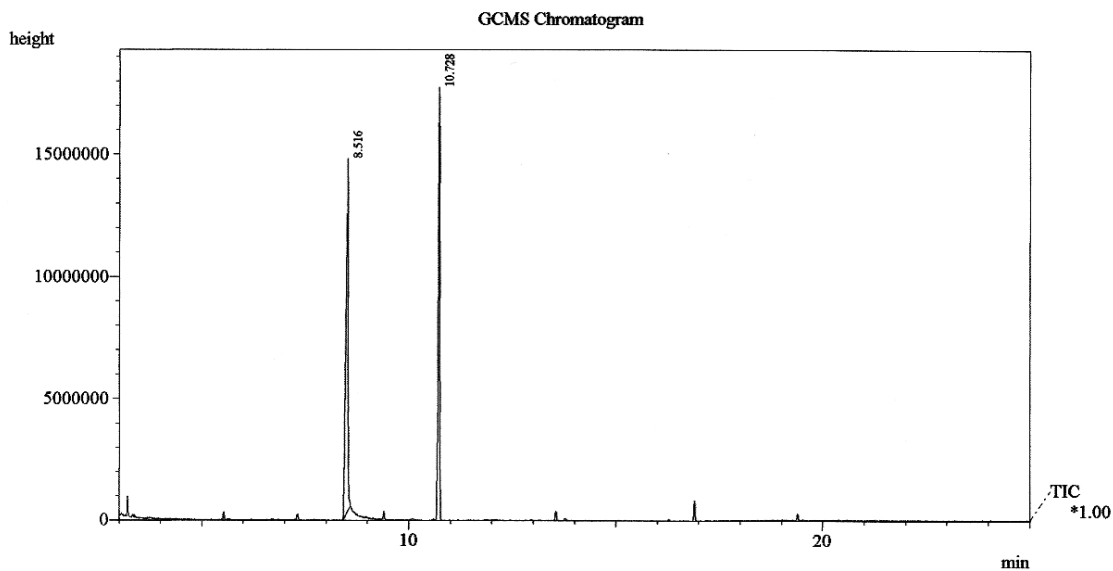


Figura 171: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool octílico (**24**) com EICC a 30°C

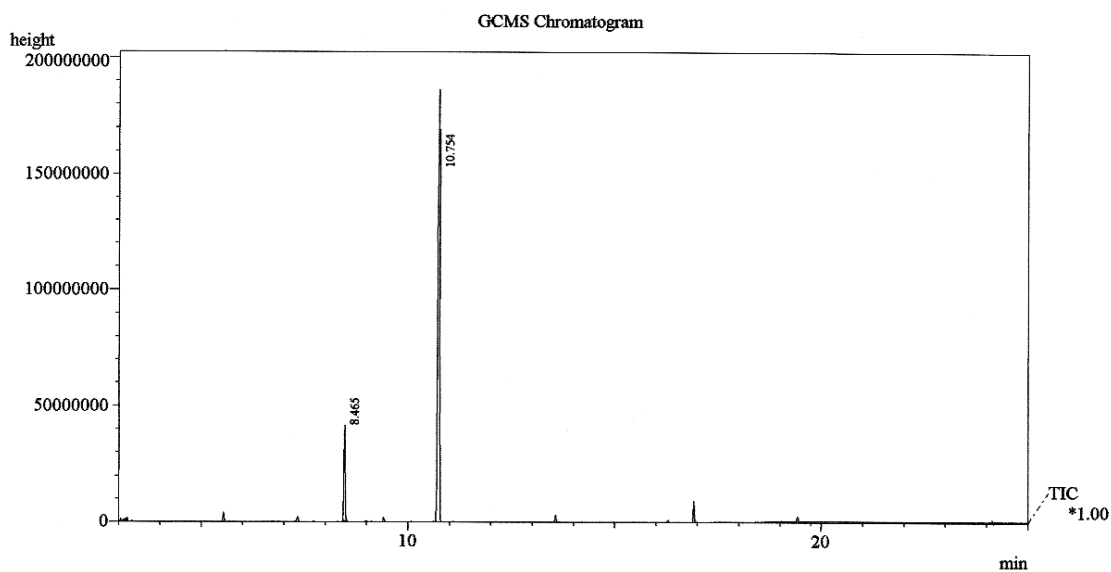


Figura 172: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool octílico (**24**) com EICC a 70°C

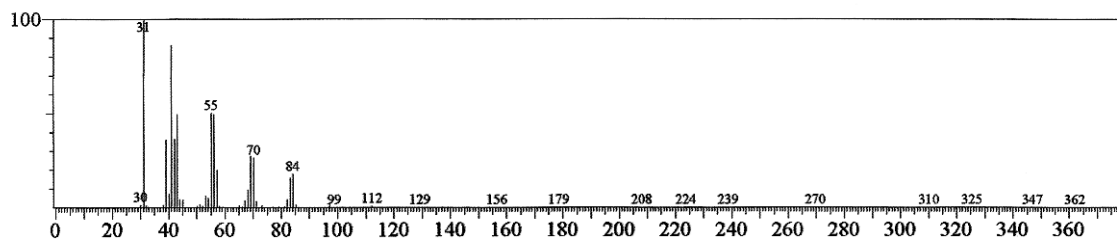


Figura 173: Espectro de massa do álcool octílico (**24**), tr 8,52 min (Fig. 171)

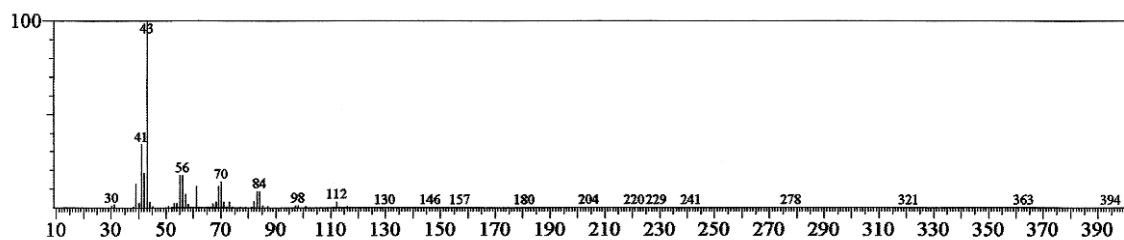


Figura 174: Espectro de massa do acetato de octila (**24a**), tr: 10,73 min (Fig. 171)

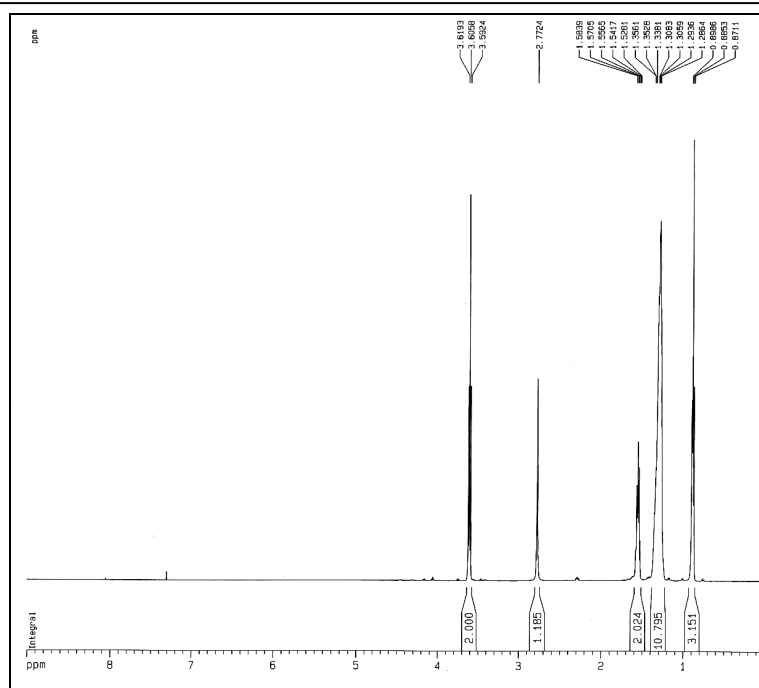


Figura 175: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do padrão álcool decânico (25)

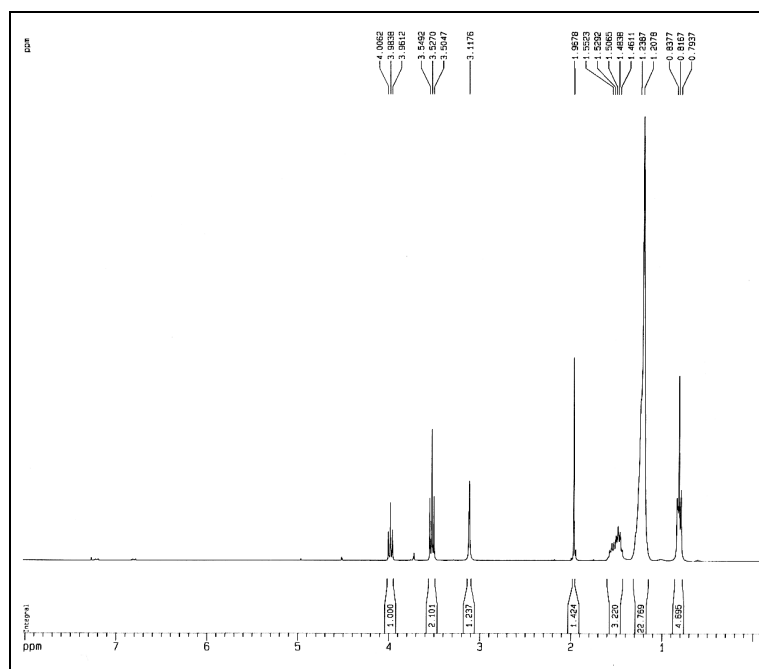


Figura 176: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do álcool decânico (25) com EICC a 30°C

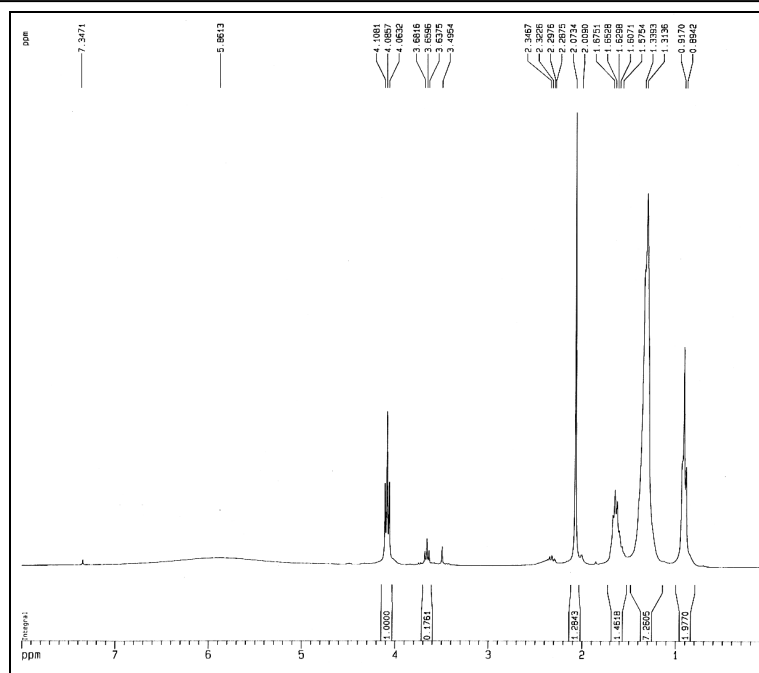


Figura 177: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da mistura obtida na bioacetilação do álcool decanóico (**25**) com EICC a 70°C

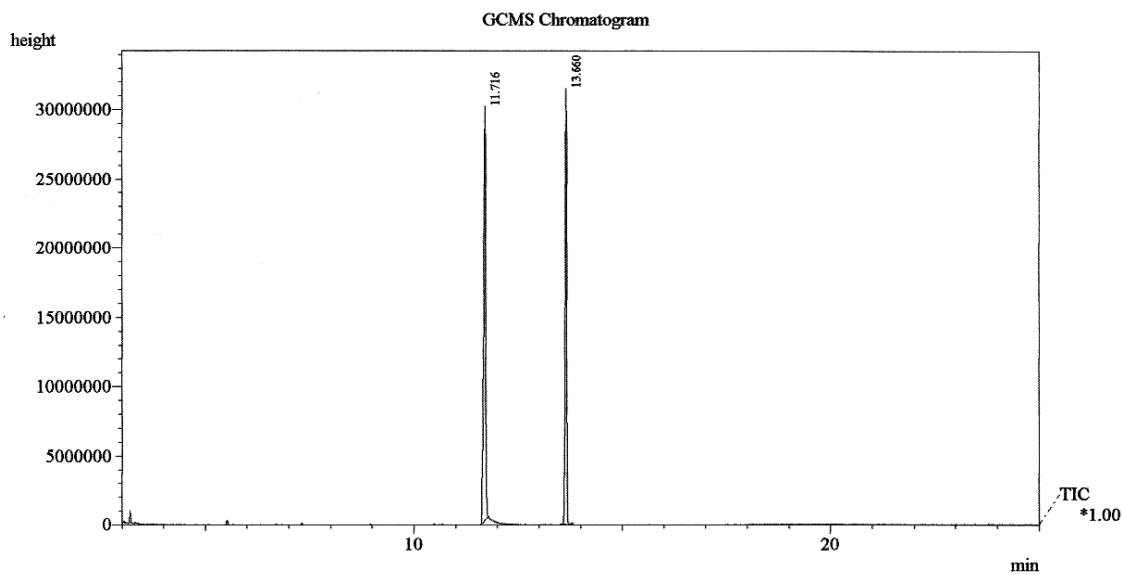


Figura 178: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool decanóico (**25**) com EICC a 30°C

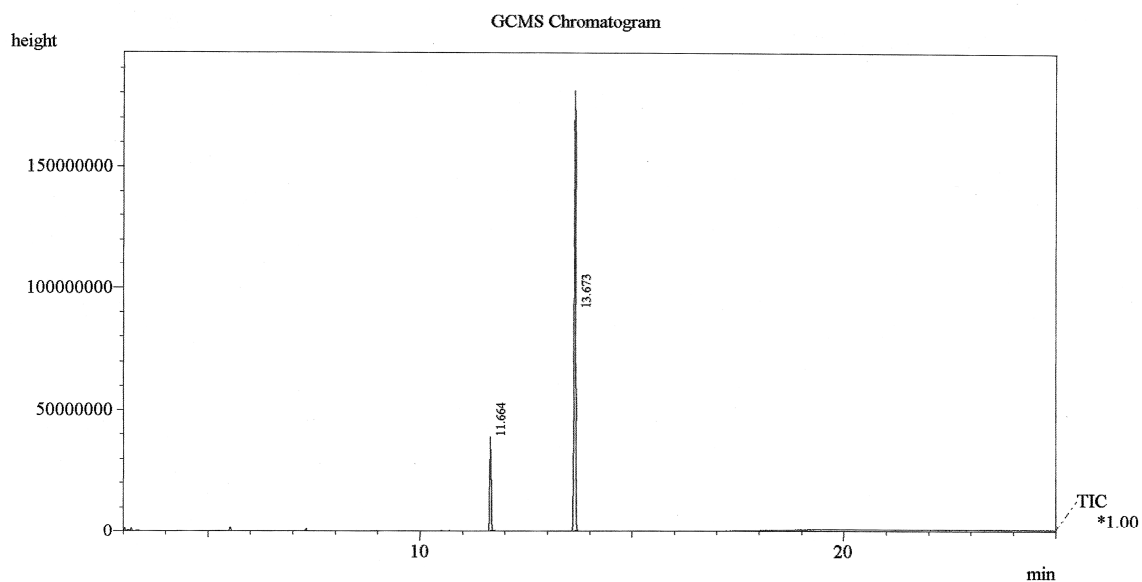


Figura 179: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool decanóico (25) com EICC a 70°C

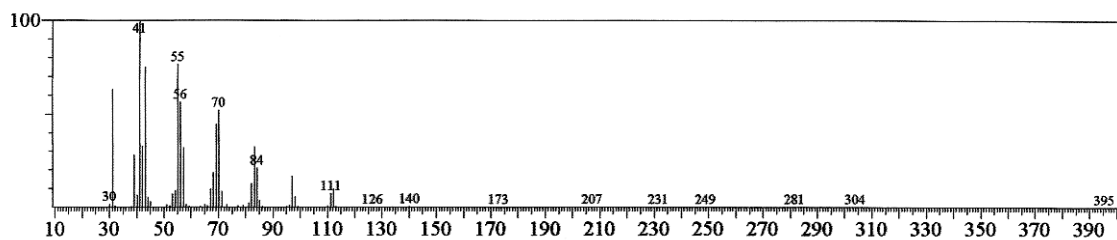


Figura 180: Espectro de massa do álcool decanóico (25), tr: 11,72 min (Fig. 178)

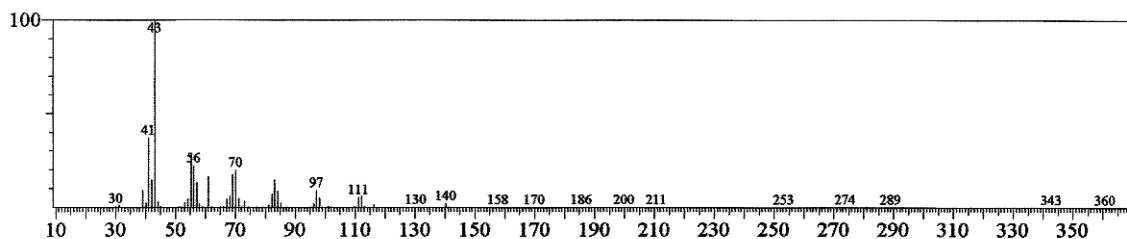


Figura 181: Espectro de massa do acetato de decanoíla (25a), tr: 13,66 min (Fig. 178)

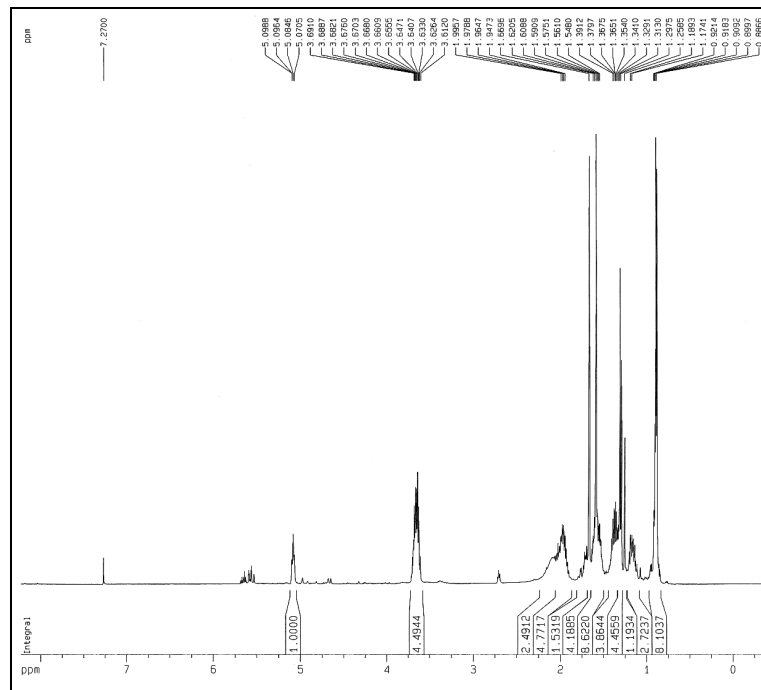


Figura 182: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do padrão citronelol (**10a**)

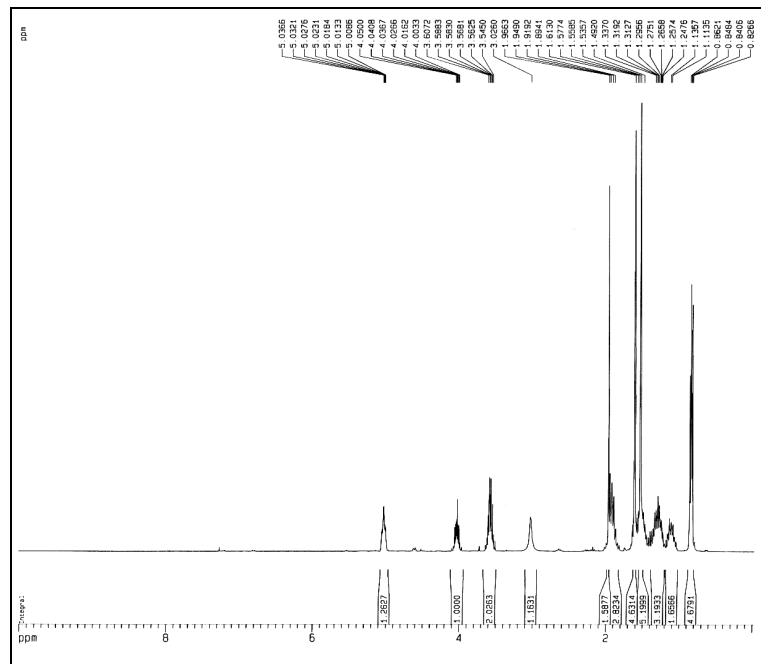


Figura 183: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do citronelol (**10a**) com EICC a 30°C

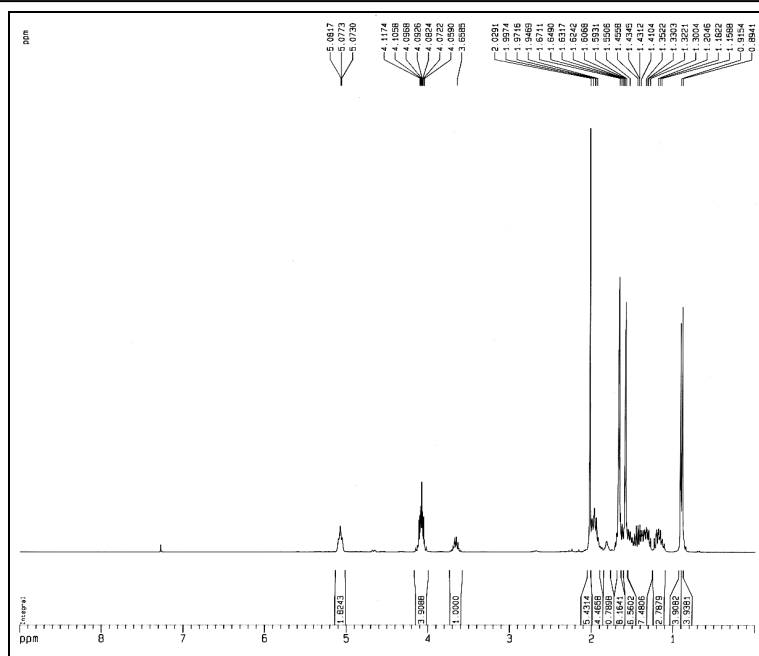


Figura 184: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do citronelol (**10a**) com EICC a 70°C

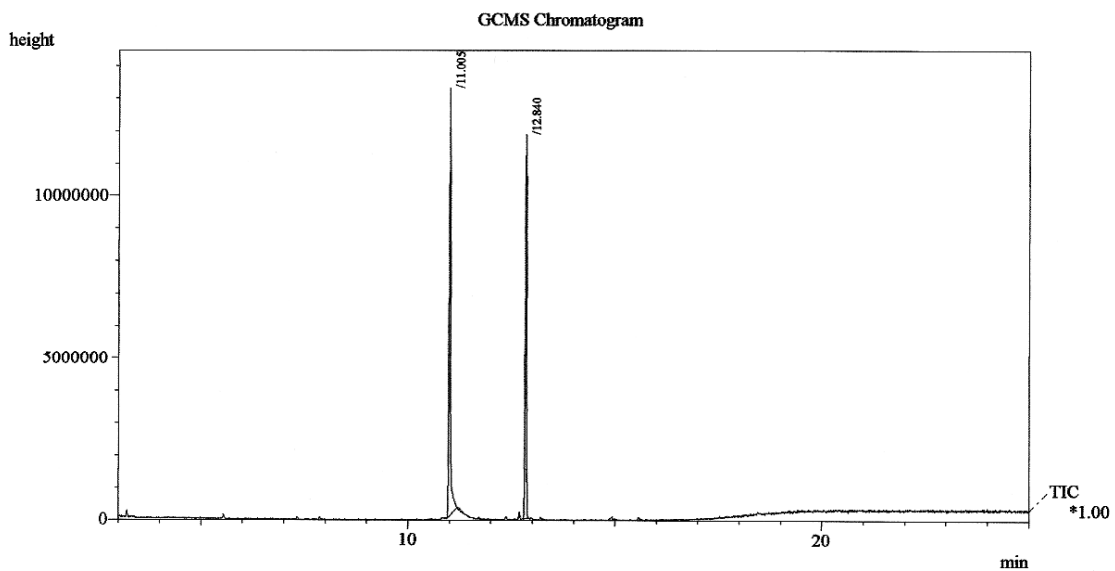


Figura 185: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do citronelol (**10a**) com EICC a 30°C

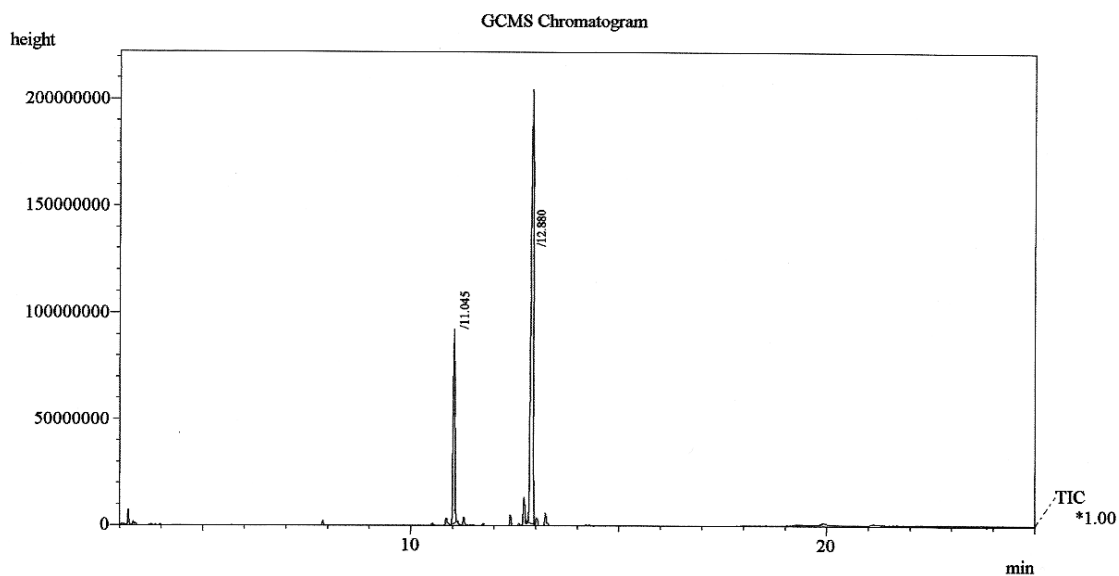


Figura 186: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do citrônol (10a) com EICC a 70°C

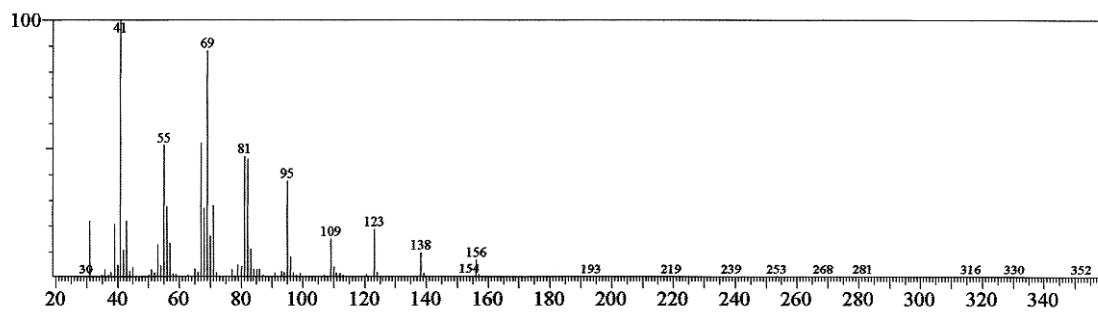


Figura 187: Espectro de massa do álcool citrônol (10a), tr: 11,00 min (Fig. 187)

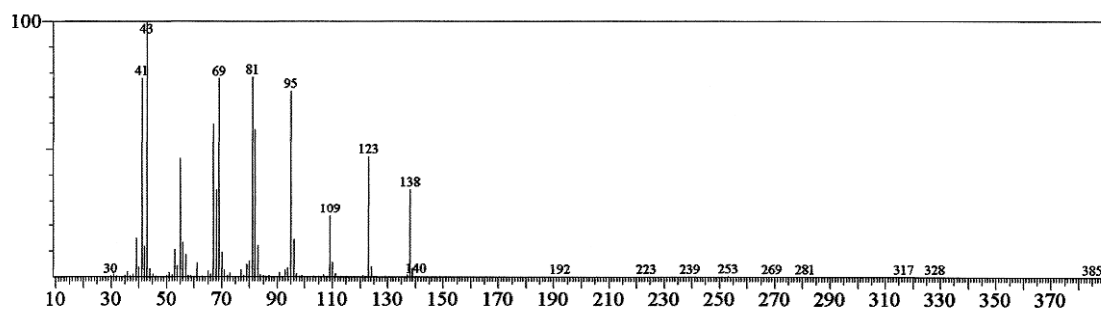


Figura 188: Espectro de massa do acetato de citrônol (10a'), tr: 12,84 min (Fig. 187)

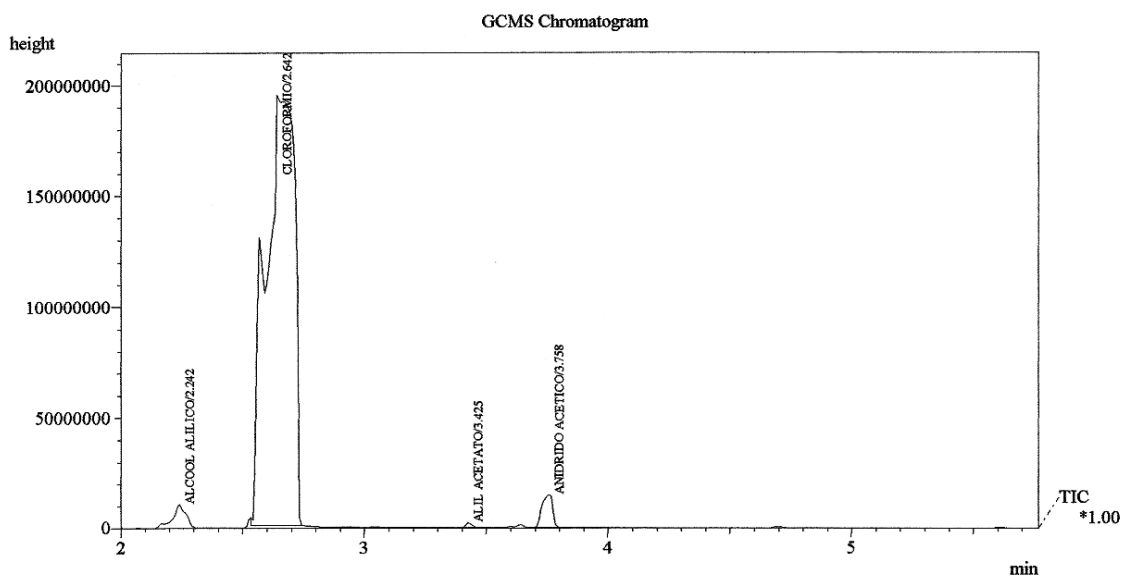


Figura 189: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do álcool alílico (**26**) com EICC a 30°C

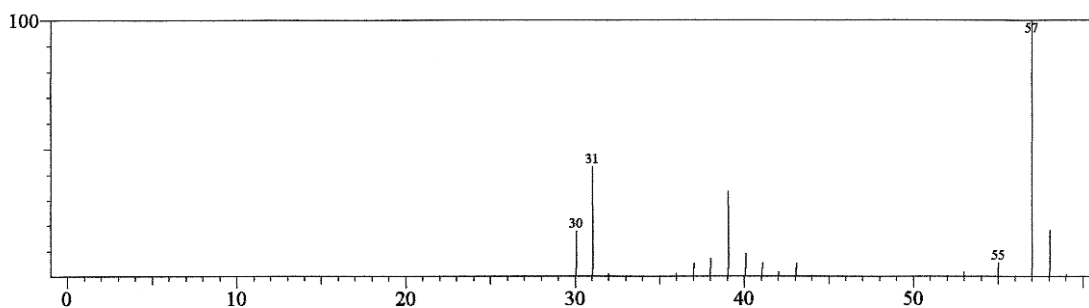


Figura 190: Espectro de massa do álcool alílico (**26**), tr: 2,24 min (**Fig. 189**)

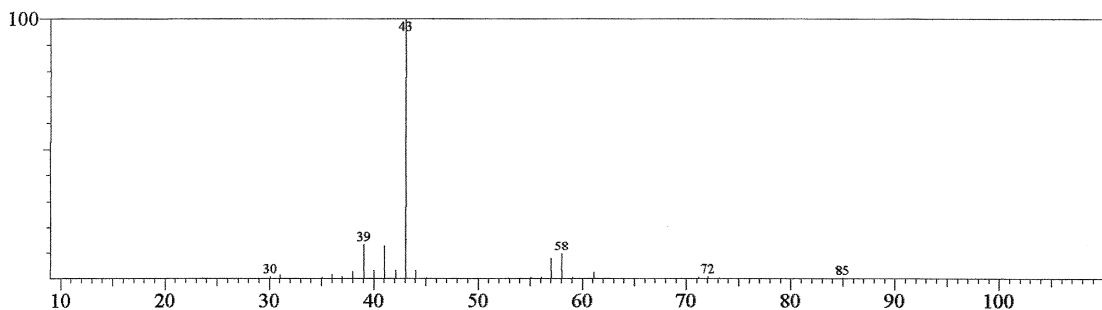


Figura 191: Espectro de massa do acetato de alila (**26a**), tr: 3,42 min (**Fig. 189**)

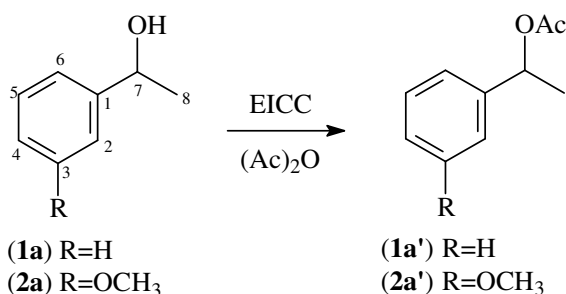
5.3.5.2. Acetilação Enzimática de Álcoois Secundários

De modo semelhante aos álcoois primários, a bioacetilação dos álcoois secundários foi realizada utilizando dois tipos: aromáticos e alifáticos (cíclicos e acíclicos).

❖ Aromáticos

Os álcoois aromáticos secundários selecionados foram: feniletan-1-ol (**1a**) e 3-metóxi-feniletan-1-ol (**2a**) (Esq. 6, p. 186). Estes álcoois foram obtidos a partir da biorredução da acetofenona e 3-metoxi-acetofenona, respectivamente, utilizando o CC como biocatalisador.

Esquema 6

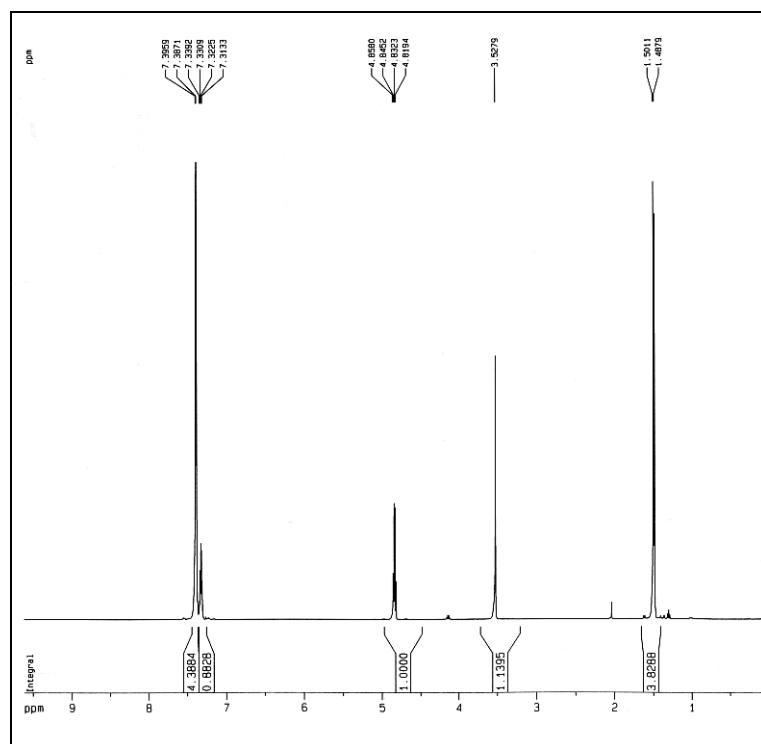


Os álcoois aromáticos secundários exibiram rendimentos de conversão bem inferiores, 12,6% (**1a**) e 18,3% (**2a**) (Tab. 56, p. 187), aos apresentados pelos álcoois aromáticos primários (>40%), a 30°C de temperatura. O álcool **2a** apresentou uma conversão (~6%) levemente superior ao álcool **1a**, revelando uma pequena influencia do grupo metoxila. Vale observar que, a 3-metoxiacetofenona é reduzida em menor extensão (~20%) que a acetofenona.

Em termos de dados espectrométricos, por exemplo, a acetilação do álcool **1a** por via biocatalítica foi demonstrada pelo espectro de RMN ¹H (Fig. 193, p. 188) através do quarteto (J = 6,57 Hz) em δ_H 5,90 devido ao hidrogênio H-1, vicinal ao grupo metila e ligado ao carbono que sustenta o grupo acetoxila. Observações semelhantes foram detectadas com relação aos outros álcoois secundários.

Tabela 56: Rendimentos de conversão da bioacetilação dos álcoois aromáticos secundários

álcool	RMN ^1H (%)	CG-EM (%)
	30°C	30°C
1a	16,1	12,6
2a	14,9	18,3

**Figura 192:** Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do padrão 1-fenil-etan-1-ol (**1a**)

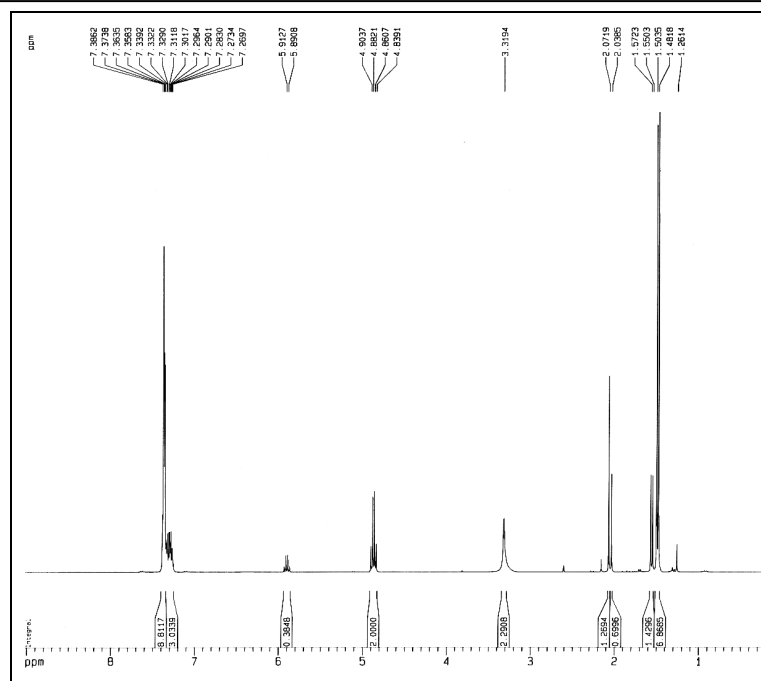


Figura 193: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do 1-fenil-etan-1-ol (**1a**) com EICC a 30°C

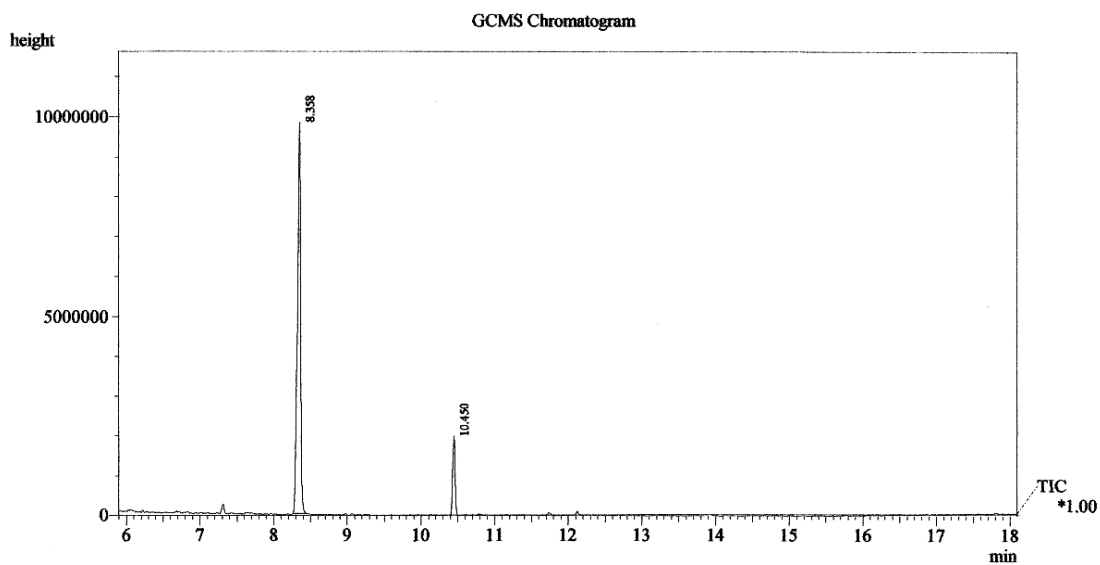


Figura 194: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do 1-fenil-etan-1-ol (**1a**) com EICC a 30°C

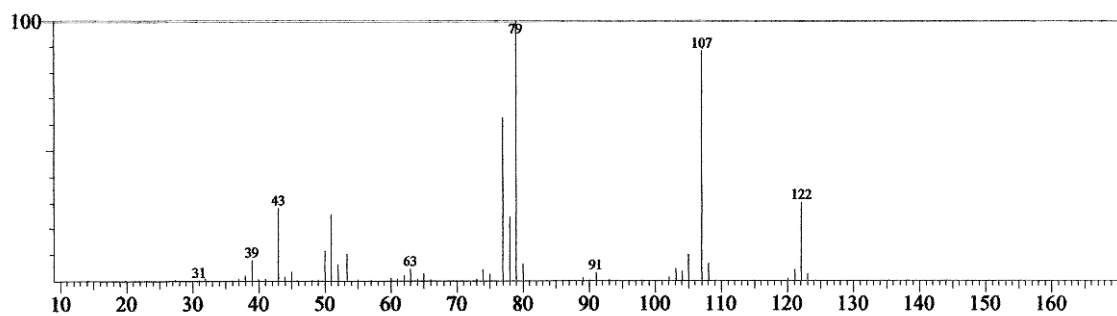


Figura 195: Espectro de massa do 1-fenil-etan-1-ol (**1a**), tr: 8,36 min (Fig. 194)

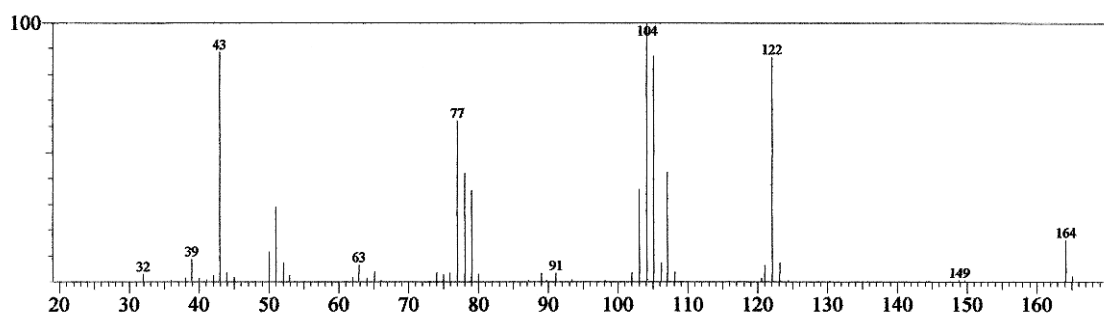


Figura 196: Espectro de massa do acetato de 1-fenil-etan-1-ila (**1a'**), tr: 10,45 min (Fig. 194)

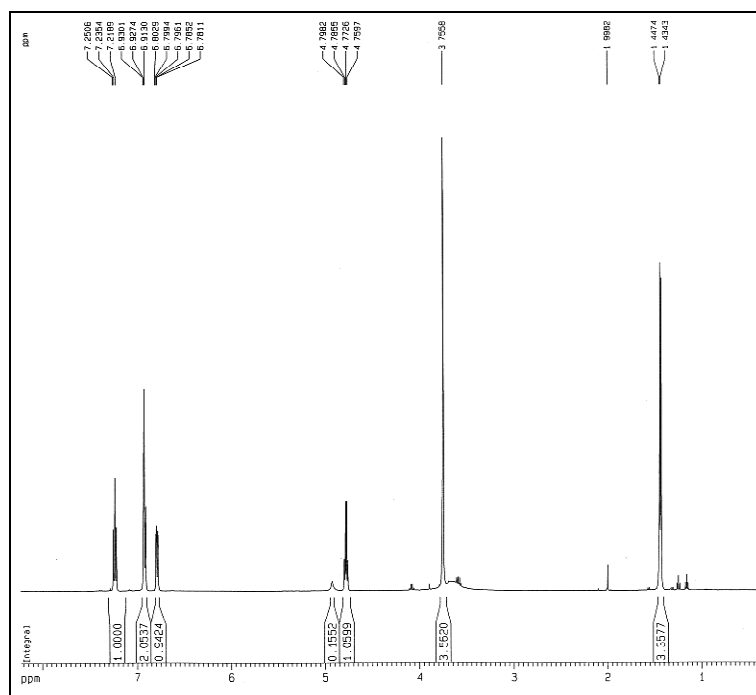


Figura 197: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do padrão 3-metoxi-1-fenil-etan-1-ol (**2a**)

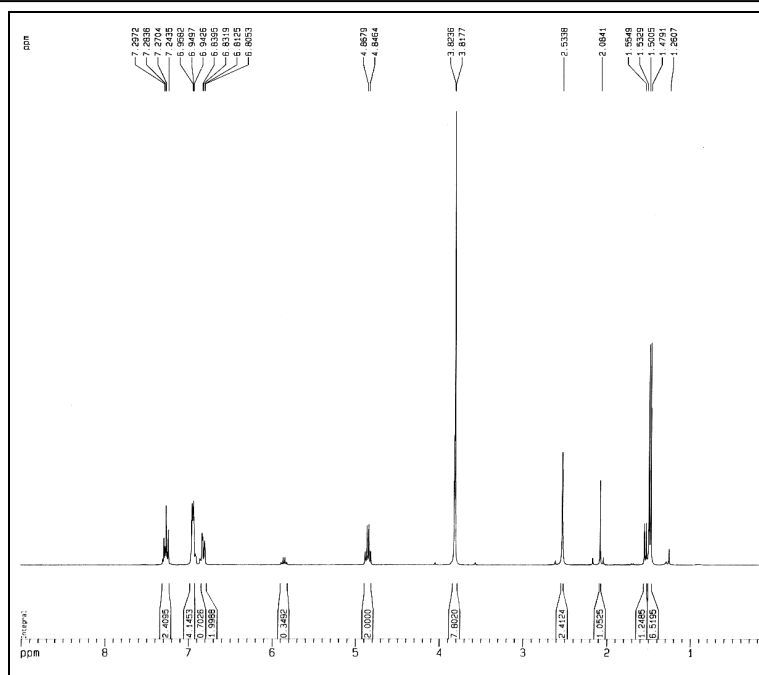


Figura 198: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do 3-metoxi-1-fenil-etanol (**2a**) com EICC a 30°C

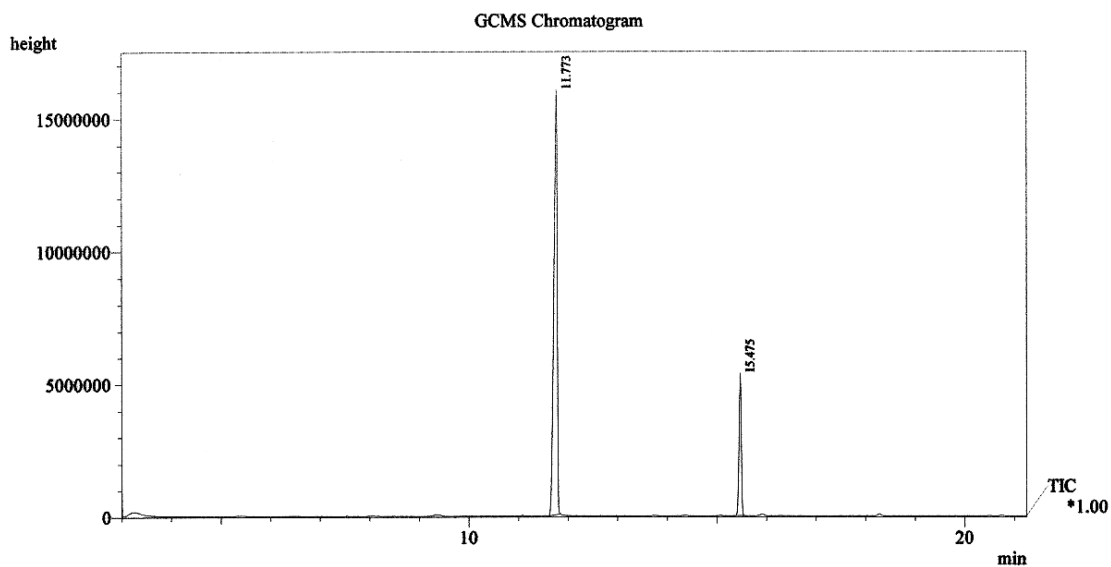


Figura 199: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do 3-metoxi-1-fenil-etanol (**2a**) com EICC a 30°C

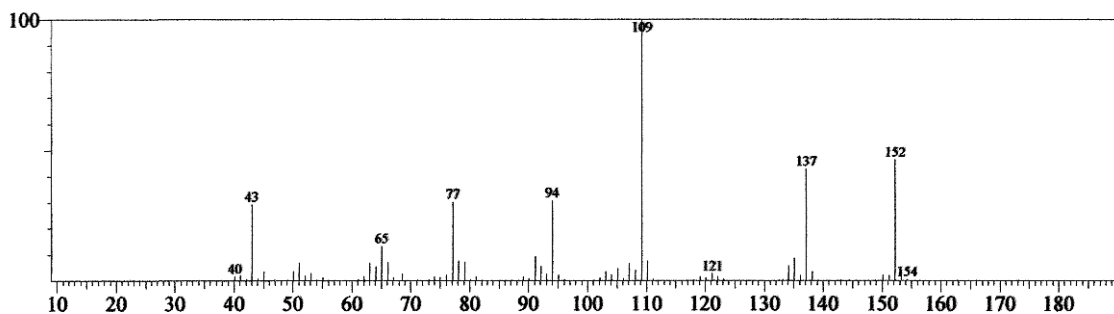


Figura 200: Espectro de massa do 3-metoxi-1-fenil-etan-1-ol (**2a**), tr: 11,77 min (Fig. 199)

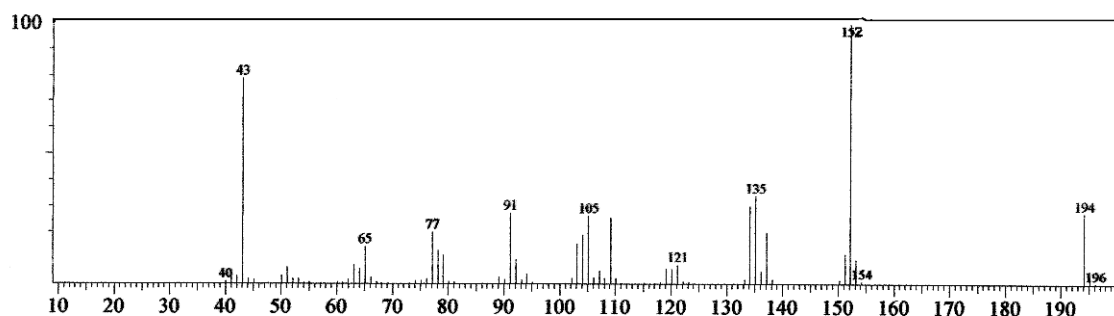
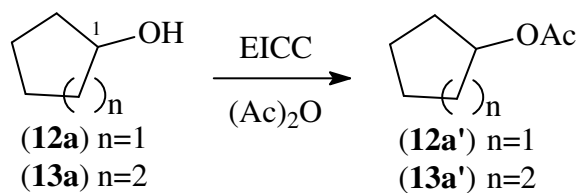


Figura 201: Espectro de massa do acetato de 3-metoxi-1-fenil-etan-1-ila (**2a'**), tr: 15,47 min (Fig. 199)

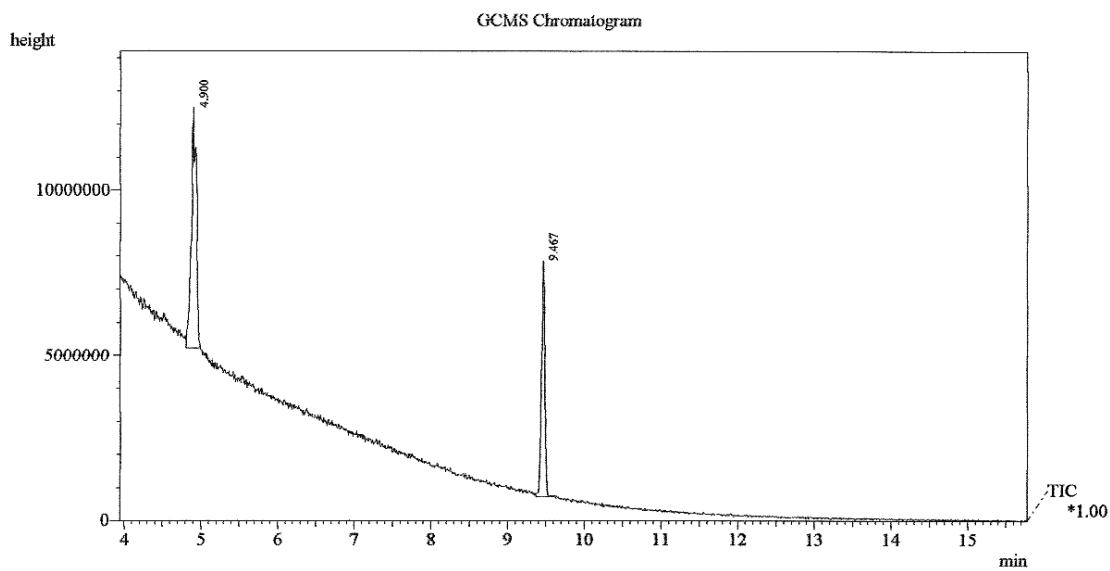
❖ Alifáticos Cíclicos

As bioacetilações enzimáticas de álcoois cíclicos saturados, ciclopentanol (**12a**) e ciclohexanol (**13a**) (Esq. 7, p. 192), apresentaram rendimentos de conversão (40,5% e 23,3%, respectivamente) (Tab. 57, p. 192), superiores aos dos álcoois aromáticos secundários **1a** e **2a**, na mesma temperatura (30°C). Novamente, as conversões mostraram-se inferiores aos dos álcoois primários testados, exceto para o álcool alílico (**26**). A acetilação enzimática do ciclohexanol (**13a**) foi realizada, adicionalmente, a 70°C, e foi observada uma variação de 50,8% no rendimento, isto é, passou de 23,3% (30°C) para 74,1% (70°C) (Tab. 57, p. 192).

Esquema 7

**Tabela 57:** Rendimentos de conversão da bioacetilação dos álcoois alifáticos cíclicos secundários

álcool	RMN ¹ H (%)		CG-EM (%)	
	30°C	70°C	30°C	70°C
12a	-	-	40,5	-
13a	10,7	56,8	23,3	74,1

**Figura 202:** Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do ciclopentanol (**12a**) com EICC a 30°C

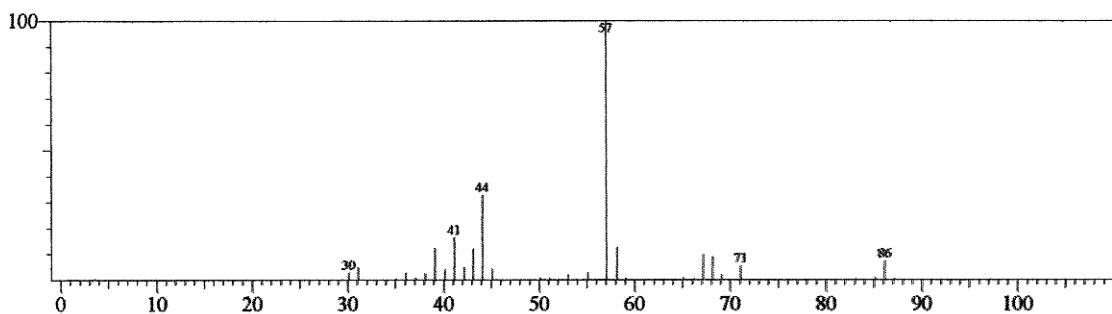


Figura 203: Espectro de massa do ciclopentanol (**12a**), tr: 4,90 min (**Fig. 203**)

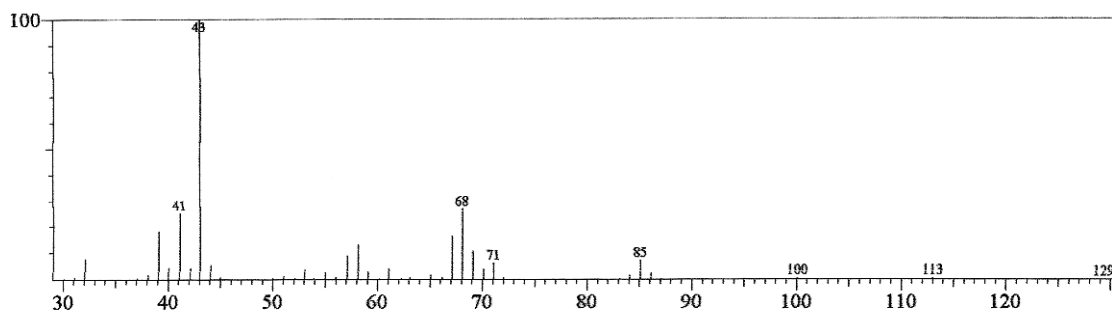


Figura 204: Espectro de massa do acetato de ciclopentila (**12a'**), tr: 9,47 min (**Fig. 203**)

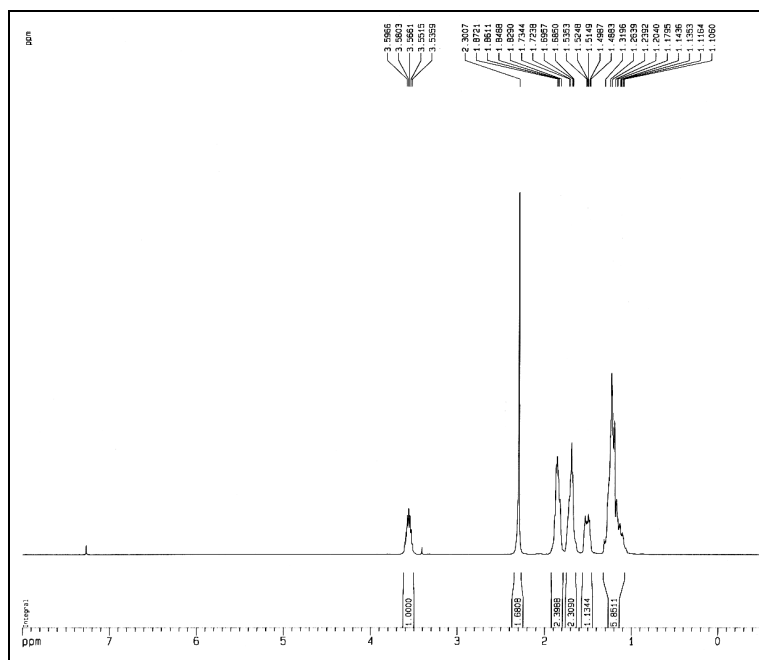


Figura 205: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão ciclohexanol (**13a**)

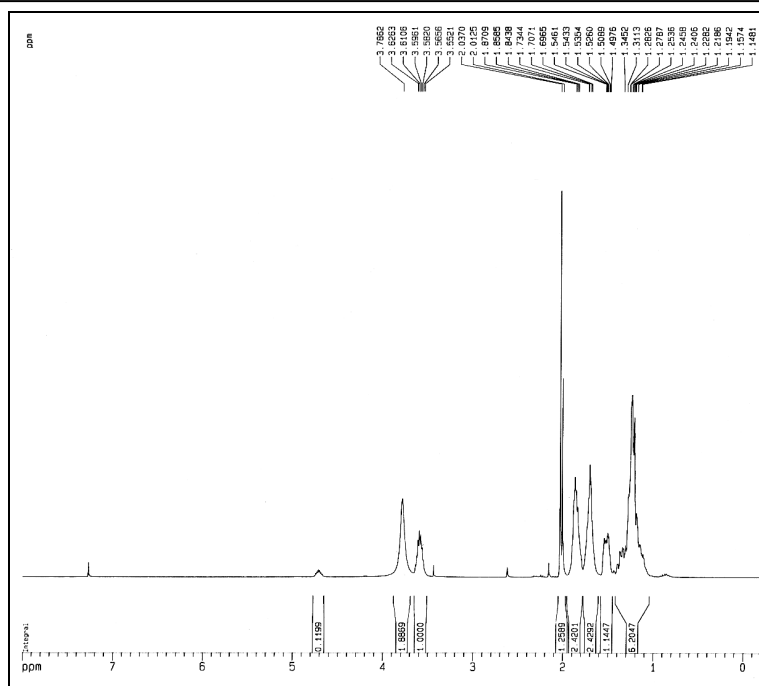


Figura 206: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetylação do ciclohexanol (**13a**) com EICC a 30°C

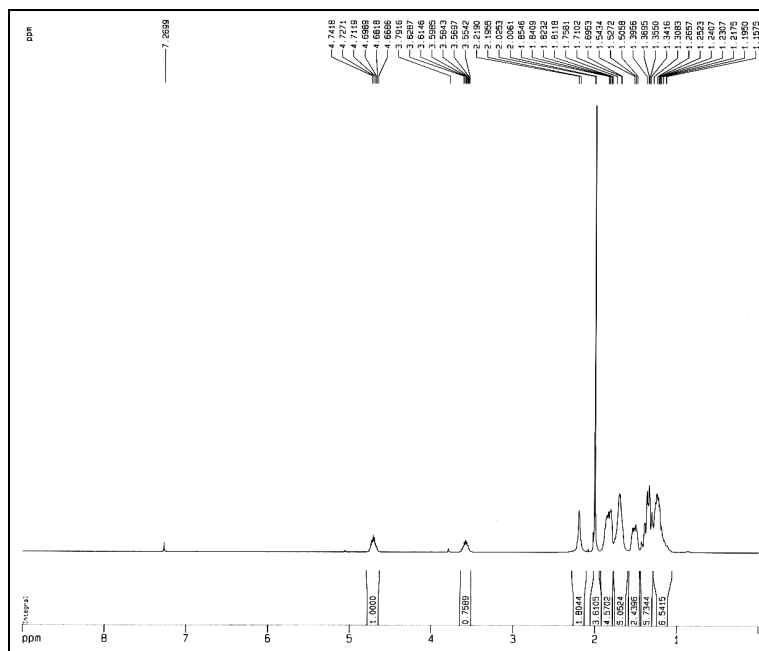


Figura 207: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetylação do ciclohexanol (**13a**) com EICC a 70°C

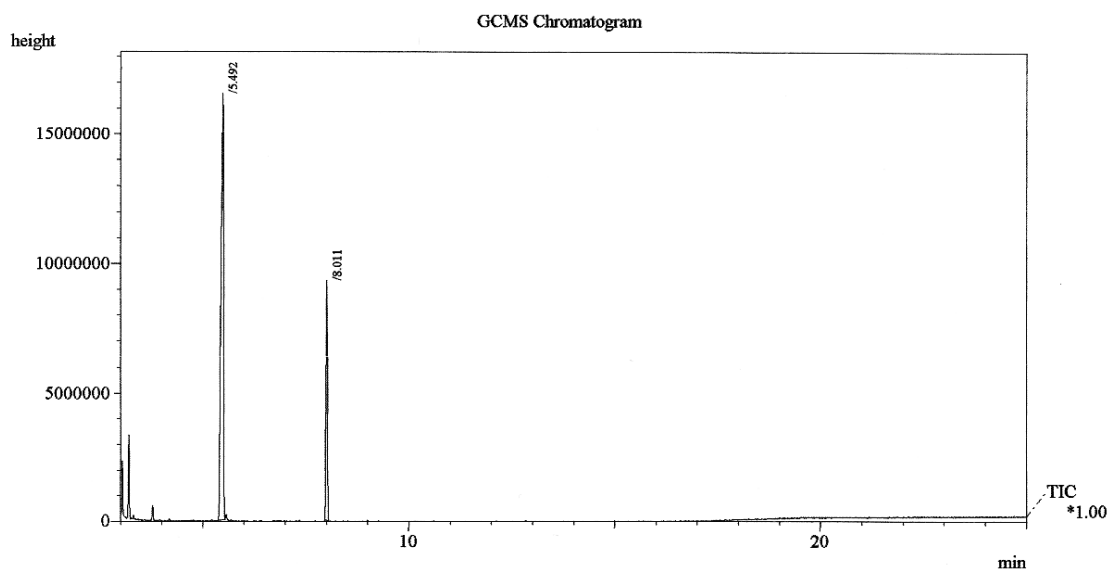


Figura 208: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do ciclohexanol (**13a**) com EICC a 30°C

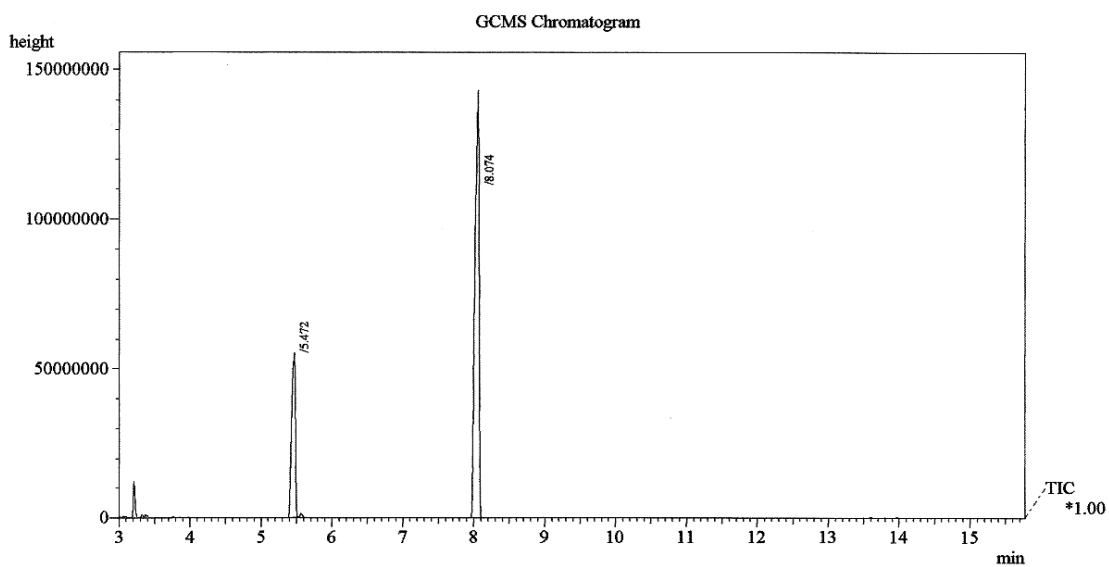


Figura 209: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do ciclohexanol (**13a**) com EICC a 70°C

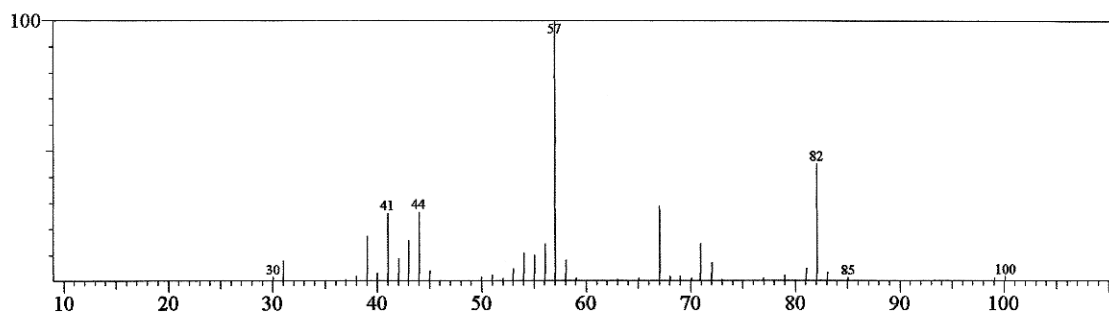


Figura 210: Espectro de massa do ciclohexanol (**13a**), tr: 5,49 min (**Fig. 208**)

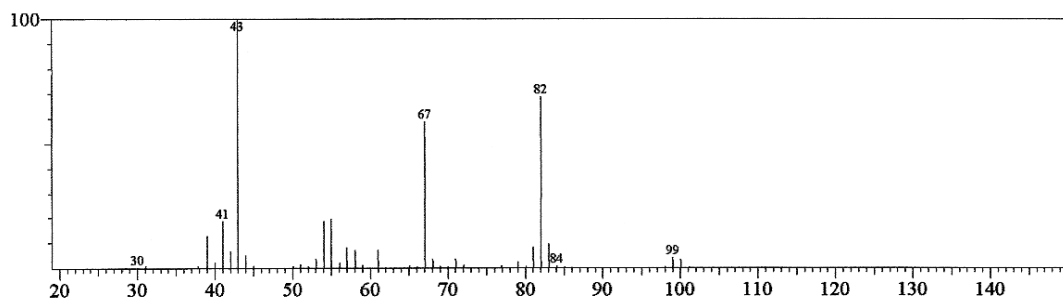
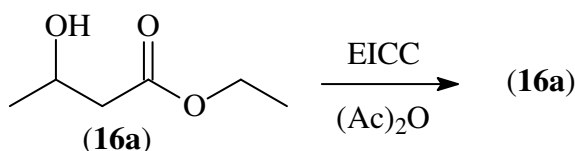


Figura 211: Espectro de massa do acetato de ciclohexila (**13a'**), tr: 8,01 min (**Fig. 208**)

❖ Alifáticos Acíclicos

O álcool secundário 3-hidroxi-butirato de etila (**16a**), obtido por redução do acetoacetato de etila, um β -cetoéster, com NaBH_4 , também foi submetido à bioacetilação com EICC (**Esq. 8**). Entretanto, diferentemente dos outros álcoois testados, **16a** não demonstrou nenhum indício de reatividade. Análise do meio reacional após reação não demonstrou formação de produtos.

Esquema 8



5.3.5.3. Acetilação Enzimática de Álcoois Terciários

Segundo a literatura (ALLINGER, 1978) os álcoois terciários são bem menos susceptíveis a acetilação do que os álcoois primários e secundários. Tendo em vista esta observação, foi testada a reação de acetilação enzimática álcool terciário α -terpineol (**27**) (Esq. 9) com EICC. Como esperado, os rendimentos de conversão 0,4% e 0,7% nas reações a 30°C e 70°C, respectivamente, calculados somente por CG-EM, foram extremamente reduzidos, demonstrando o elevado desfavorecimento de acetilação de álcoois terciários.

Esquema 9

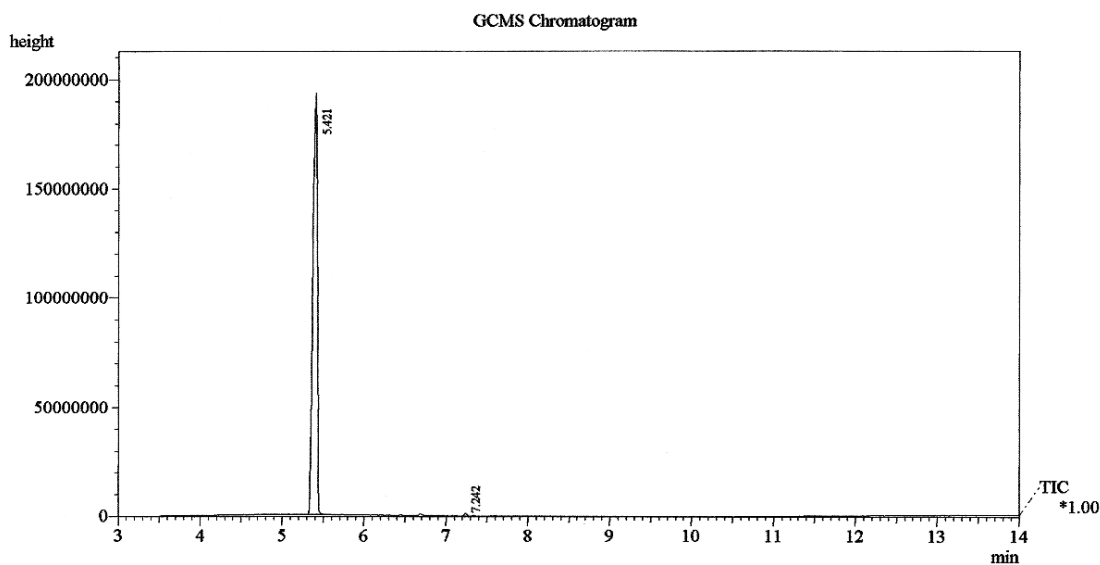
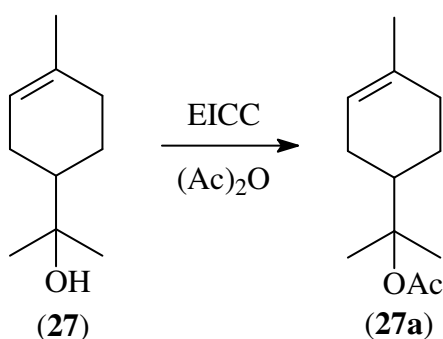


Figura 212: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do α -terpineol (**27**) com EICC a 30°C

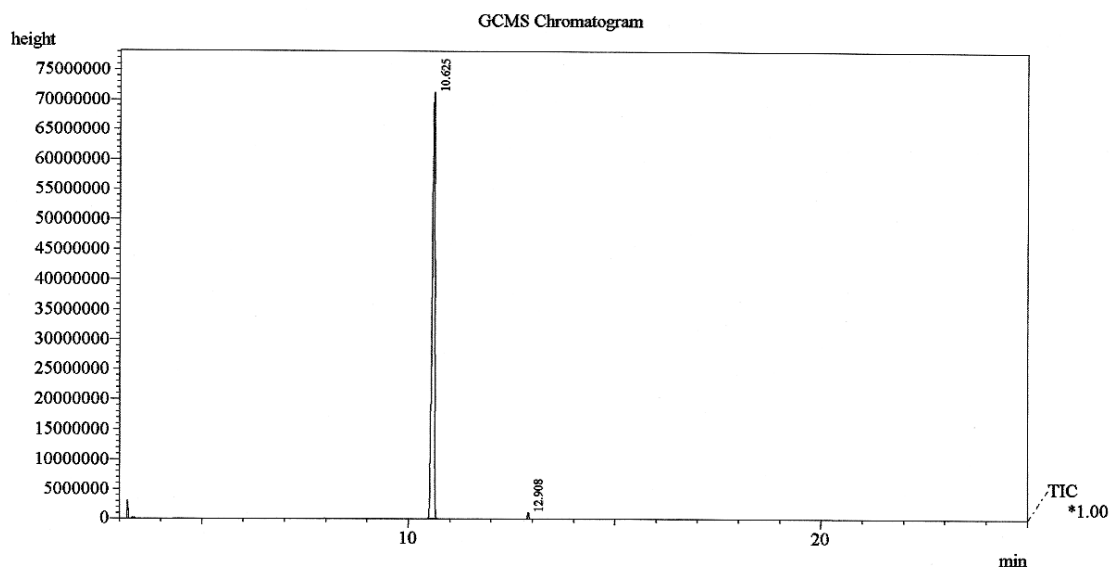


Figura 213: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do α -terpineol (**27**) com EICC a 70°C

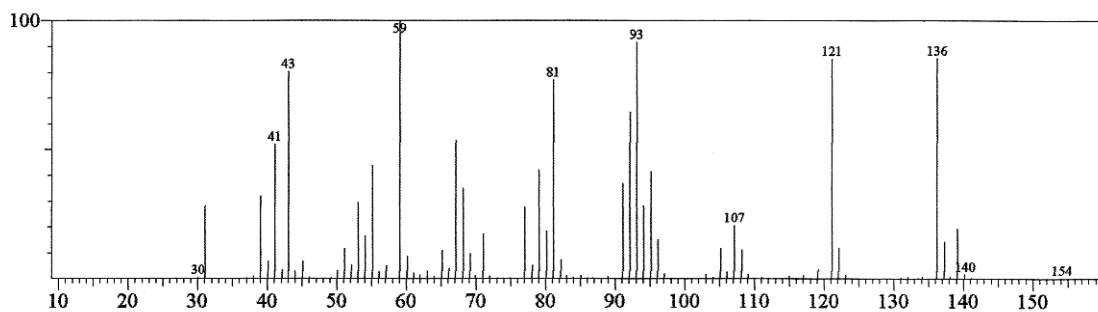


Figura 214: Espectro de massa do α -terpineol (**27**), tr: 5,42 min (**Fig. 212**)

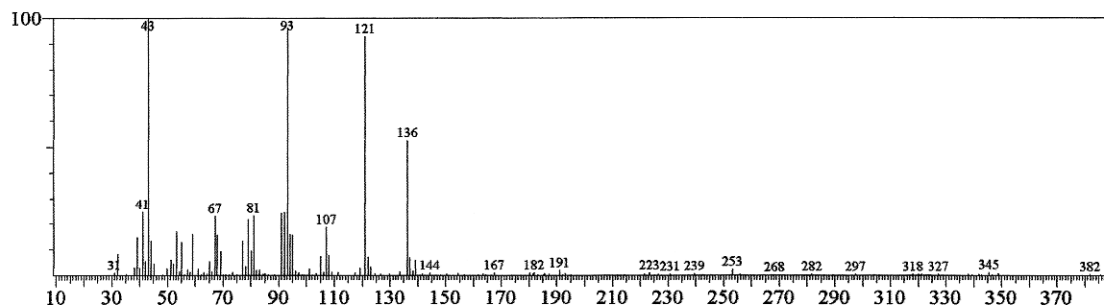


Figura 215: Espectro de massa do acetato de α -terpinila (**27a**), tr: 7,24 min (**Fig. 212**)

5.3.5.4. Acetilação Enzimática de Fenóis

De acordo com a literatura, a acetilação de fenóis é menos favorecida que a de álcoois primários e secundários. Tendo em vista este dado, o composto fenólico carvacrol (**28**) foi submetido à bioacetilação com EICC (**Esq. 10, p. 199**). Reações foram conduzidas a 30°C e 70°C, e foram obtidos baixos rendimentos de conversão (2,1% e 13,2%, respectivamente) (**Tab. 58, p. 199**), porém, muito superiores aos obtidos com o álcool terciário (**37**).

Esquema 10

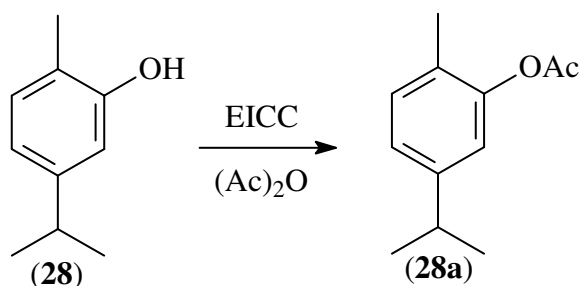


Tabela 58: Rendimentos reacionais da bioacetilação do carvacrol

álcool	RMN ¹ H (%)		CG-EM (%)	
	30°C	70°C	30°C	70°C
28	-	8,2	2,1	13,2

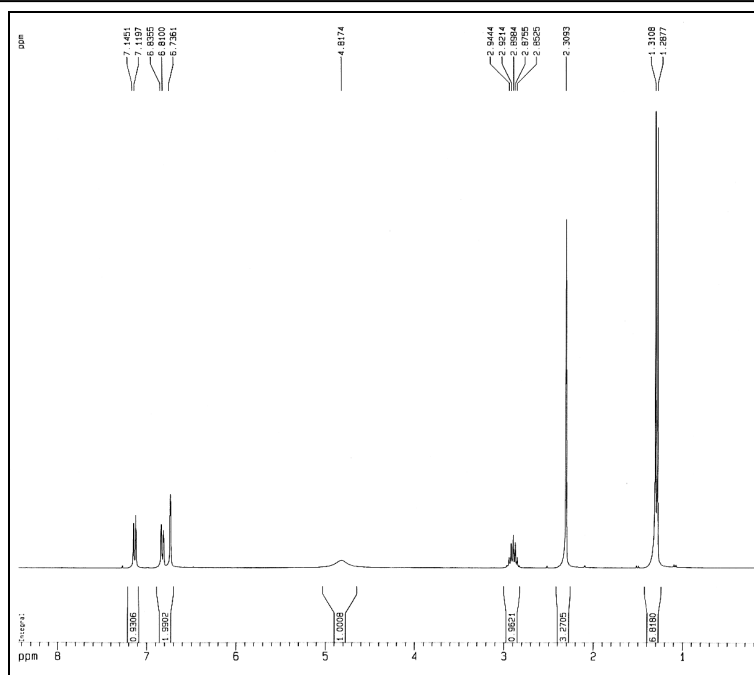


Figura 216: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do padrão carvacrol (**28**)

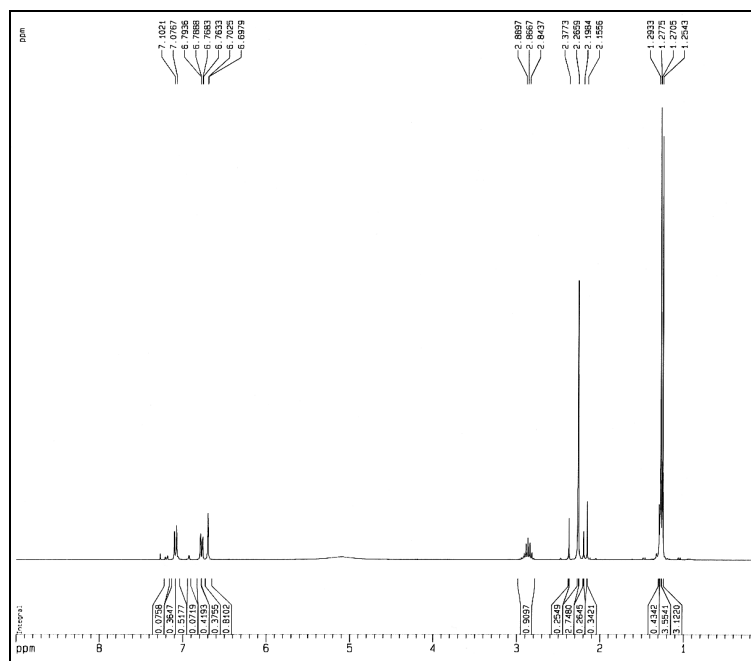


Figura 217: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura obtida na bioacetilação do carvacrol (**28**) com EICC a 70°C

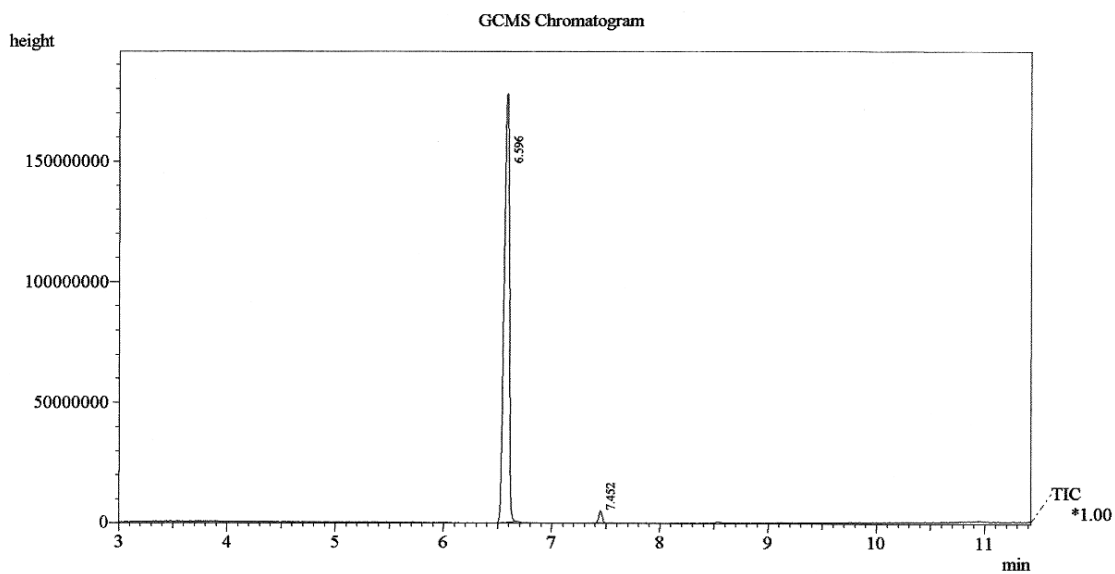


Figura 218: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do carvacrol (**28**) com EICC a 30°C

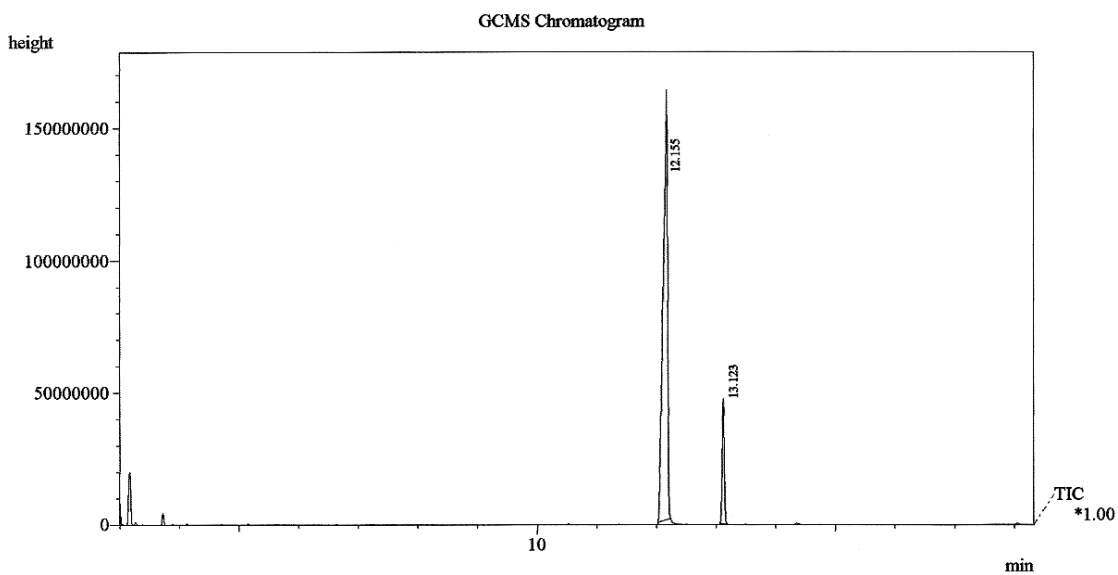


Figura 219: Cromatograma CG-EM da mistura obtida na bioacetilação do carvacrol (**28**) com EICC a 70°C

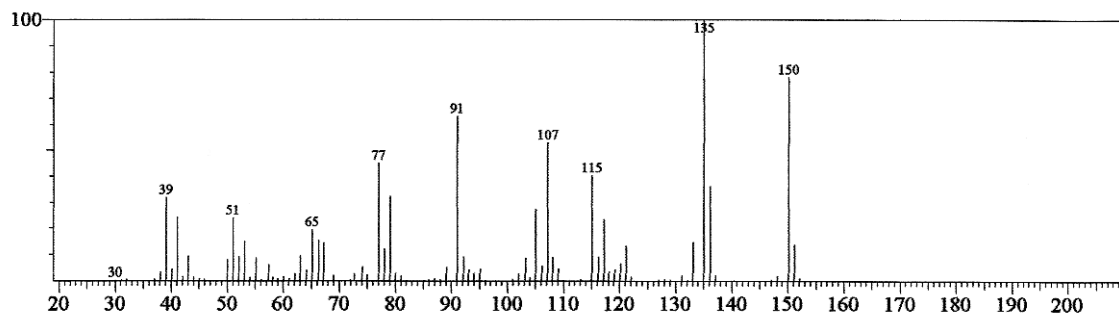


Figura 220: Espectro de massa do carvacrol (**28**), tr: 6,60 min (**Fig. 218**)

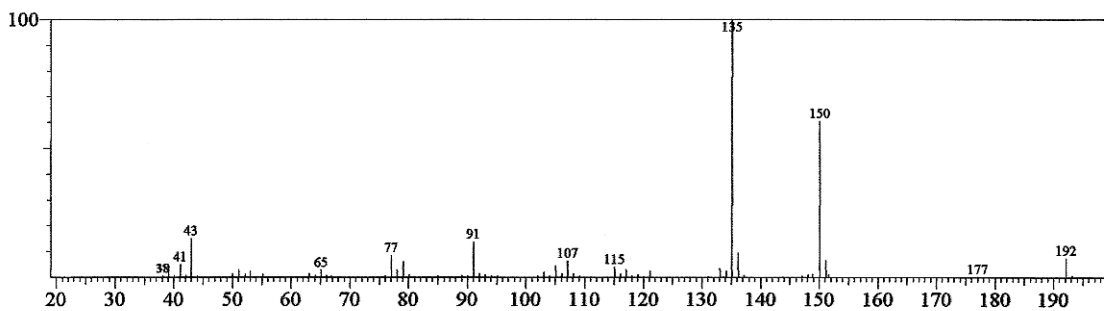


Figura 221: Espectro de massa do acetato de carvacrila (**28a**), tr: 7,45 min (**Fig. 218**)

Na **Tabela 59** (p. 203) são mostrados os deslocamentos químicos de hidrogênios selecionados para comparação dos substratos com seus respectivos produtos.

Para efeito de controle, os alcoóis 1-octanol, benzílico e anísico foram submetidos a reação com anidrido acético a temperatura de 30°C e foi observado em todos os casos produtos de acetilação com rendimentos menor que 4%. Por sua vez, o 1-fenil-etan-1-ol em presença de anidrido acético e de esferas de alginato de sódio, a temperatura de 45°C, originou o acetato com apenas 4% de rendimento.

Tabela 59: Sinais de RMN ^1H e integração dos hidrogênios selecionados dos álcoois primários e secundários comparados com a integração dos sinais dos produtos obtidos por bioacetilação com EICC

Substrato	Temp (°C)	H-observado	δ_{H}	Integração	Produto	δ_{H}	Integração
3a	30	2H-7	4,69 (s)	3,00	3a'	5,12 (s)	1,53
	70	2H-7	4,71 (s)	0,48		5,14 (s)	1,96
5a	30	2H-7	4,65 (s)	1,32	5a'	5,00 (s)	0,48
	70	2H-7	4,65 (s)	1,06		5,08 (s)	2,25
7a	30	2H-1'	4,32 (d)	3,00	7a'	4,74 (dd)	1,72
	70	2H-1'	4,36 (d)	0,54		4,80 (d)	1,55
9a	30	2H-5	4,59 (s)	1,29	9a'	5,02 (d)	1,28
23	30	2H-1	3,63 (t)	0,87	23a	4,05 (t)	1,00
24	30	2H-1	3,61 (t)	2,16	24a	4,06 (t)	1,00
	70	2H-1	3,65 (t)	0,32		4,08 (t)	1,00
25	30	2H-1	3,53 (t)	2,10	25a	3,98 (t)	1,00
	70	2H-1	3,66 (t)	0,18		4,08 (t)	1,00
10a	30	2H-1	3,58 (m)	2,03	10a'	4,03 (m)	1,00
	70	2H-1	3,63 (m)	1,00		4,09 (m)	3,91
1a	30	2H-7	4,87 (q)	2,00	1a'	5,90 (q)	0,38
2a	30	2H-7	4,85 (q)	2,00	2a'	5,85 (q)	0,35
13a	30	H-1	3,58 (m)	1,00	13a'	4,72 (m)	0,12
	70	H-1	3,58 (m)	0,76		4,70 (m)	1,00

CAPÍTULO 6

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.1. Material Utilizado

Todos os reagentes utilizados nos ensaios de biotransformação foram de procedência MERCK ou SYNTH, e o biocatalisador, caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), foi comprado em um local específico (Maranguape-Ceará).

O reagente de Folin-Ciocalteu foi da marca QEEL (Química Especializada Erich LTDA). 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 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), cloreto de cálcio (CaCl_2), alginato de sódio e anidrido acético utilizados, são todos de qualidade P.A. de procedência VETEC.

As reações enzimáticas foram realizadas em uma mesa agitadora modelo CT-165 da fabricante CIENTEC. Os solventes utilizados nas reações são de qualidade P.A. da Synth.

Para as reações de bioacetilação foram utilizadas enzimas imobilizadas do caldo de cana. Para tal, usou-se 300,0 mL do caldo de cana obtendo-se um rendimento de enzima imobilizada de 4,0 g. Para as reações de biorredução foram utilizados 200 mL do caldo de cana bruto e 200 mg dos substratos.

6.2. Métodos Cromatográficos

6.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As cromatografias de adsorção em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas de vidro recoberta com sílica gel 60 ($\Phi = 0,004\text{-}0,005$ mm) com 0,5 mm de espessura da marca VETEC na dimensão de 10 x 5 cm. Também foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 ($\Phi = 2\text{-}25$ μm) sobre poliéster T-6145 da SIGMA CHEMICAL CO, com camada de 250 μm de espessura e dimensões de 20 x 20 cm.

A revelação das substâncias nas cromatoplasmas foi realizada através de pulverização com solução de vanilina ($C_8H_8O_3$) e ácido perclórico 0,75 M ($HClO_4$) em etanol (C_2H_6O), seguida de aquecimento em estufa a $100^\circ C$ por aproximadamente 3 minutos.

6.2.2. Cromatografia em Coluna por Adsorção

Nas colunas cromatográficas por adsorção foi utilizado como adsorvente gel de sílica 60 ($\Phi = 0,025-0,020$ mm), código 45.337, de procedência VETEC. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as massas das amostras e de sílica utilizadas.

6.3. Métodos Espectrométricos

Os espectros foram registrados em aparelhos pertencentes a Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

6.3.1. Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As leituras das absorções na região do ultravioleta-visível foram realizadas utilizando espectrofotômetro modelo Carey 50 Conc da Varian. Todas as leituras foram realizadas em comprimentos de onda adequados aos métodos, sendo sempre obtidas medidas em triplicatas.

6.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H) e de Carbono-13 (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN 1H e ^{13}C foram realizados no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) desta Universidade, utilizando-se Espectrômetros Bruker modelo Avance DPX-300 e modelo Avance modelo DRX-500, que operam na frequência de hidrogênio a 300 MHz e 500 MHz e na frequência do carbono a 75 MHz e 125 MHz respectivamente.

O solvente utilizado para dissolução da amostra na obtenção dos espectros foi clorofórmio deuterado (CDCl_3).

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

A quantificação dos rendimentos reacionais bem como os espectros de massa foram obtidos em um equipamento SHIMADZU CG/EM QP5050A equipado com coluna capilar dimetilpolisiloxano OV-5 (30,0 m x 0,25 mm x 0,25 μm) utilizando hélio a 1,0 mL/min como gás carreador no modo split, operando com gradientes de temperatura que variavam dependendo da natureza química dos compostos analisados. Para os compostos de baixa Massa Molecular utilizou-se um gradiente de 10°C/min (40-180°C) e de 40°C/min (180°-300°C) e para os de Massa Molecular mais elevada um gradiente de 10°C/min (100-180°C) e de 40°C/min (180-300°C), com a temperatura de injetor de 250°C e detector de 280°C.

6.3.4. Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama (CG-DIC)

A determinação dos excessos enantioméricos (ee) foi obtida com um cromatógrafo gasoso da THERMO ELECTRON modelo Trace GC Ultra equipado com uma coluna capilar quiral da Varian Chirasil-Dex CB (β -ciclodextrina, 25,0 m x 0,25 mm x 0,25 μm), utilizando hélio como gás carreador com fluxo de 1,0 mL/min no modo split. Foram utilizados dois programas de temperatura: 2°C/min (100-180°C) e 2°C/min (130-160°C). A temperatura do injetor e detector foi 220°C.

6.4. Métodos para obtenção de dados físicos

6.4.1. Rotações ópticas

As rotações ópticas foram determinadas em polarímetro digital da PERKIN ELMER modelo 341 pertencente a Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica

da Universidade Federal do Ceará. As medidas foram feitas em um comprimento de onda de 589 nm a uma temperatura de 25 °C.

6.5. Determinação do Teor de Proteínas no Caldo de Cana

Foram utilizados dois processos de determinação de proteína: a metodologia de Lowry modificada por Hartree e metodologia de Bradford.

6.5.1. Método de Lowry

Para a realização da determinação de proteínas no caldo de cana, segundo Hartree (HARTREE, 1972) foi necessário o preparo dos seguintes reagentes:

- Solução A: 50,0 g de Na_2CO_3 dissolvido em 250,0 mL de NaOH 1,0 M, seguida da adição de 1,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio e dissolução em 500,0 mL de água destilada.

- Solução B: 1,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 0,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em 45,0 mL de água, seguido da adição de 5,0 mL de NaOH 1,0 M.

- Solução C: 0,5 mL do reagente de Folin-Cicateau (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) 2,0 M diluído em 7,5 mL de água. Esta solução deve ser preparada diariamente e sua concentração deve estar entre 0,15 e 0,18 M.

O procedimento ocorreu da seguinte maneira: 0,1 mL do caldo de cana foi diluído para 50 mL utilizando água destilada. A 1,0 mL desta solução amostra foi adicionada 0,9 mL do reagente A, seguido do aquecimento a 50°C por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado 0,1 mL do reagente B e deixado à temperatura ambiente por 10 minutos. Então, adiciona-se 3,0 mL do reagente C seguida de agitação, que logo após é posto outra vez em “banho Maria” a 50°C por mais 10 minutos, refria-se à temperatura ambiente e realiza-se a leitura

em 650 nm. Uma curva de calibração com soro albumina bovina (BSA) como padrão foi utilizada nas medidas.

O procedimento foi realizado em triplicata, tendo como controle em branco, um tubo de ensaio contendo apenas água destilada. Como resultado detectou-se a presença de 1,4% de proteínas presentes no caldo de cana.

6.5.2. Método de Bradford

O procedimento consistiu em adicionar 2,5 mL do reagente de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250) a 0,1 mL do caldo de cana, sendo a leitura da absorção realizada após 2 minutos em espectrofotômetro num comprimento de onda em 595 nm, usando BSA como padrão de calibração. Foi realizado um branco utilizando 0,1 mL de água destilada e 2,5 mL do reagente de Bradford. Este procedimento foi realizado em triplicata e permitiu detectar a presença de 0,5% de no caldo de cana.

6.6. Imobilização das Enzimas do Caldo de Cana de Açúcar (*Saccharum officinarum*)

Para o processo de imobilização das enzimas do caldo de cana, foi adotado o procedimento adaptado da metodologia de Kalogeris (KALOGERIS et al., 2006). Foram utilizados a 300,0 mL do caldo 3,0 g de alginato de sódio, que por sua vez foi submetido a processo de agitação constante à temperatura ambiente por 2 horas até a completa miscibilidade dos materiais.

A solução resultante foi então adicionada em 400,0 mL de solução de CaCl_2 5 %, utilizando uma seringa. Após o fim do gotejamento da mistura caldo de cana/alginato, esta foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 20 horas.

Ao fim deste período, a solução contendo as esferas foi submetida à filtração, e obtiveram-se então as enzimas imobilizadas, conforme mostra a **Figura 222 (p. 210)**. Após filtrações, seguiu-se o processo de lavagem das esferas com água destilada. Terminadas as

lavagens as esferas foram deixadas à secura a temperatura ambiente por dois dias, e apresentaram o aspecto conforme mostra a **Figura 223** (p. 210). Ao fim do processo as enzimas imobilizadas foram pesadas e apresentaram um total de 4,0 g.

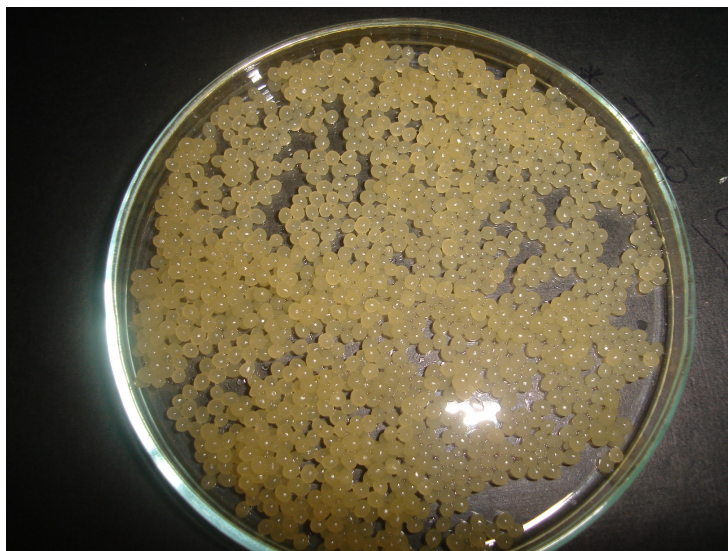


Figura 222: Fotografia das enzimas imobilizadas do caldo de cana (EICC) após filtração e lavagem

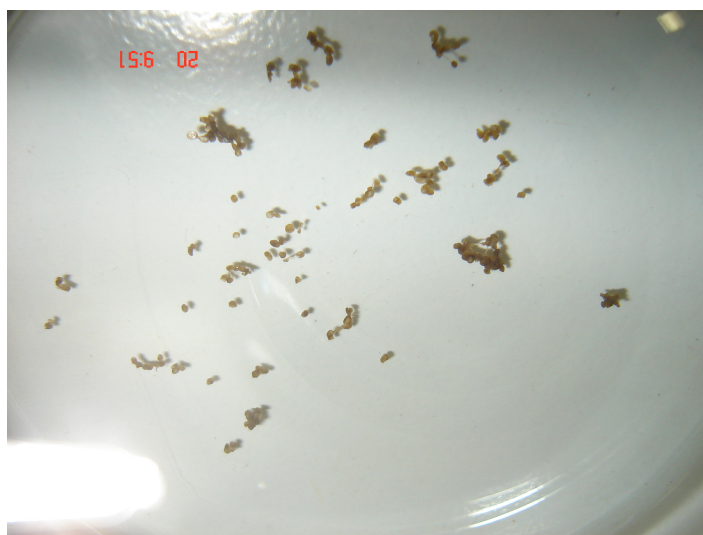


Figura 223: Fotografia das enzimas imobilizadas do caldo de cana (EICC) após secagem a temperatura ambiente

EICC também foi fotografada por Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) utilizando metalização em ouro, para determinação do diâmetro de suas partículas. A morfologia da amostra

foi analisada por aumentos de 65X (**Fig. 224, p. 211**), 125X (**Fig. 225, p. 211**), 250X (**Fig. 226, p. 212**) e 500X (**Fig. 227, p. 212**) e o diâmetro das partículas estimado em 0,73 mm. As MEVs foram obtidas no Laboratório de Caracterização de Materiais (LACAM) do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Ceará (UFC).

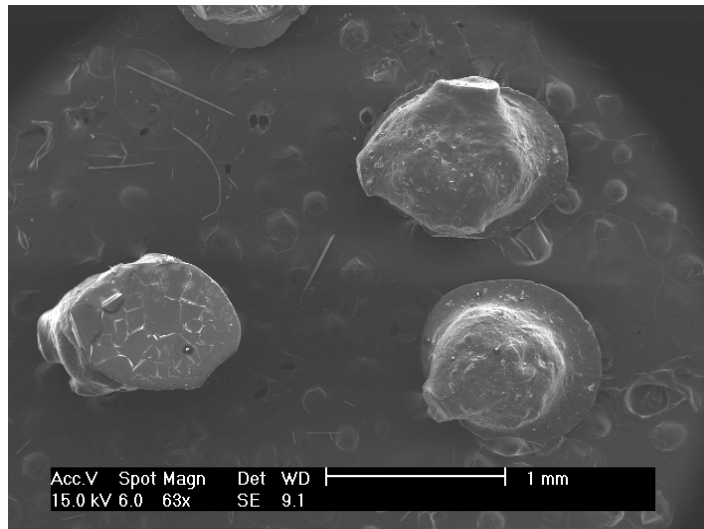


Figura 224: Fotografias MEV com 65X de aumento de três partículas de (EICC)

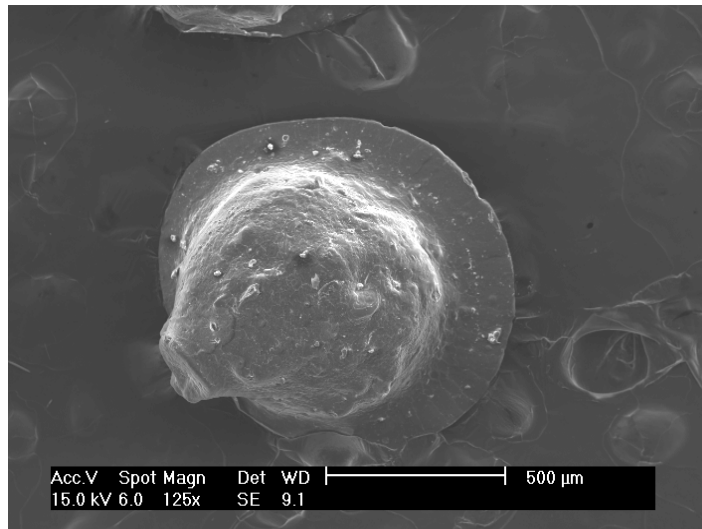


Figura 225: Fotografias MEV com 125X de aumento de uma partícula de (EICC)

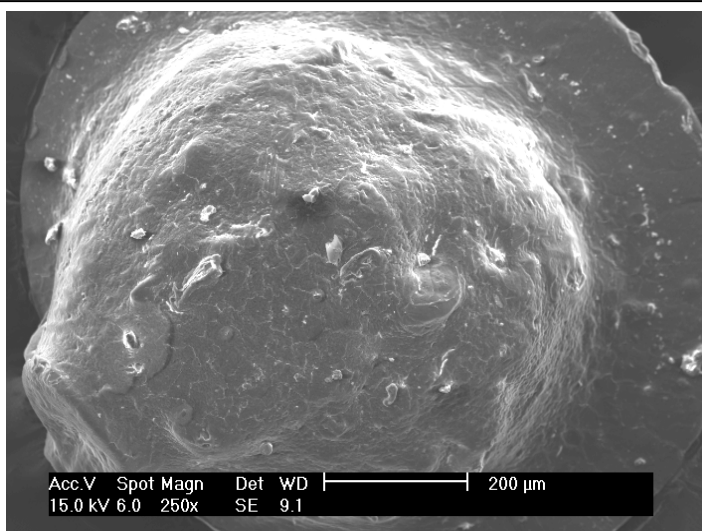


Figura 226: Fotografias MEV com 250X de aumento de uma partícula de (EICC)

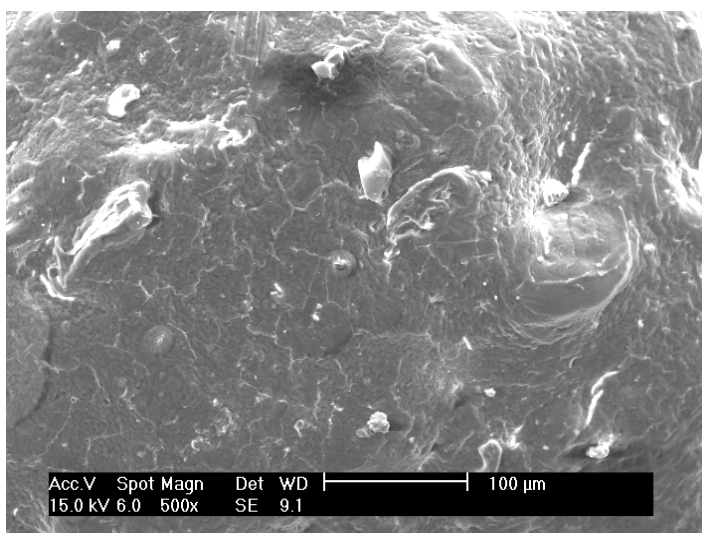


Figura 227: Fotografias MEV com 500X de aumento de uma partícula de (EICC)

6.7. Métodos Reacionais

6.7.1. Redução dos compostos carbonílicos com NaBH_4 (boridreto de sódio)

Utilizando metodologia adaptada de Machado et al. (2004) foram realizadas reações de redução química com NaBH_4 para a obtenção dos padrões dos álcoois. Em um balão de fundo redondo de 50,0 mL colocou-se 1,0 g do composto carbonílico, sendo em seguida adicionado uma solução contendo 1,0 g de NaBH_4 dissolvido em 20,0 mL de metanol, previamente

preparada em banho de gelo. A mistura foi submetida à agitação mecânica por 2 horas, sendo a mistura reacional analisada por CCD após este tempo, para confirmação do final da reação. Adição de 75 mL de água destilada, extração com acetato de etila (3 x 100 mL), evaporação do solvente sob vácuo e secagem com Na₂SO₄ anidro resultava no álcool desejado.

Quando necessário, realizava-se purificação dos produtos obtidos utilizando coluna cromatográfica de sílica gel. Os produtos das reduções do furfural, ciclopentanona, e β-cetoester não necessitaram de purificação. Já as reduções da acetofenona, 4-metoxiacetofenona, vanilina e carvona resultaram em produtos que foram purificados em coluna cromatográfica de sílica gel utilizando hexano/acetato de etila (50/50) como eluente.

Os álcoois obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C), para verificação da pureza dos produtos.

6.7.2. Acetilação Convencional do Álcool Anísico

Na acetilação convencional do álcool anísico foram utilizados 200mg do álcool dissolvidos na mistura anidrido acético/ piridina (4,0:2,0 mL), sendo a mistura reacional mantida sob agitação magnética por 24 horas. Em seguida adicionou-se solução de sulfato de cobre (CuSO₄) 5% e efetuou-se extrações com acetato de etila (2 x 12 mL). A fase orgânica foi lavada com água, e tratada com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), e em seguida concentrada à pressão reduzida obtendo-se 247 mg de material, com rendimento químico de 95,0%. Posteriormente, este foi purificado em coluna cromatográfica eluída com CHCl₃, e posteriormente analisado por métodos espectroscópicos RMN ¹H e ¹³C.

6.7.3. Biorreduções dos compostos carbonílicos utilizando caldo de cana

Utilizou-se metodologia adaptada de Yadav (2002). Em um erlenmeyer de 500,0 mL foram colocados 200,0 mL de caldo de cana de açúcar recém preparo (na sua forma bruta) juntamente com 200,0 mg do substrato carbonílico. Esta mistura foi então submetida à agitação mecânica em uma mesa agitadora modelo CT-165 da CIENTEC (160 rpm) por um período de 72

horas. As misturas reacionais foram extraídas com acetato de etila (3 x 100 mL), as fases orgânicas secas com Na₂SO₄ anidro e concentradas sob pressão reduzida. As misturas obtidas foram cromatografadas em coluna empacotada com sílica gel, para retirada parcial das impurezas do caldo de cana, utilizando clorofórmio como eluente.

Tabela 60: Massas recuperadas nas reações de biorredução

Substrato	Massa recuperada (mg)
acetofenona	128
4-metoxiacetofenona	135
benzaldeído	152
anisaldeído	162
m-anisaldeído	170
vanilina	120
cinamaldeído	159
α -metilcinamaldeído	147
furfural	128
citronelal	134
3-hexanona	120
ciclopentanona	135
ciclohexanona	152
pulegona	162
carvona	170
β -cetoester	147
ácido benzóico	120
butirato de etila	159
benzônitrila	170
benzamida	120
nitrobenzeno	159
isoniazida	147

6.7.4. Bioacetilações dos álcoois utilizando enzima imobilizada em alginato do caldo de cana

Primeiramente foram estabelecidas as condições ótimas de atuação da enzima do caldo de cana (utilizando o álcool anísico como substrato), sendo testados parâmetros como: quantidade de enzima imobilizada, tempo reacional, quantidade de substrato (álcool), solvente e temperatura reacional. Foi verificado que as melhores condições de ação da referida enzima são: 150 mg de enzima imobilizada, 60 horas de reação, 200 mg de substrato, hexano como solvente e 70°C de temperatura.

Anidrido acético foi utilizado como doador de grupo acetila, na proporção de 1 equivalente em relação ao álcool. O volume de solvente (hexano) foi sempre de 20 mL, e os experimentos à temperatura ambiente foram realizados em erlenmeyer de 125 mL submetidos à agitação magnética em mesa agitadora (150 rpm). Os experimentos com variações de temperatura foram realizados em balões de fundo redondo de 50 mL, sob agitação magnética e refluxo com controle de temperatura através de termômetro.

Tabela 61: Massas recuperadas nas reações de bioacetilações e quantidade de anidrido acético utilizado

Substrato (200 mg)	Anidrido acético (mg)	Massa recuperada (mg)
álcool anísico	148	232
álcool benzílico	189	231
álcool 3-metoxibenzílico	148	231
álcool cinâmico	152	235
ciclohexanol	204	180
ciclopentanol	237	156
citronelol	131	202
carvacrol	136	228
α -terpineol	132	212
álcool amílico	232	180
álcool octílico	157	195

álcool decanóico	129	201
álcool alílico	352	102
feniletan-1-ol	167	230
3-metoxi- feniletan-1-ol	134	223
álcool furfurílico	208	190

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Neste estudo foi observado que os métodos de Lowry e Bradford (modificado por Hartree), utilizados na determinação do teor de proteínas totais do CC, apresentaram resultados discrepantes, ou seja, 1,4% e 0,5%, respectivamente. Estes resultados permitiram concluir que, possivelmente, proteínas de baixo peso molecular predominam no CC, para o qual o método de Lowry é mais específico, segundo a literatura. Um bom teor protéico (1,4%) foi encontrado neste material, quando comparado com outros valores da literatura [NASSAR, 1986 (1%); MACHADO, 2004 (0,7%)], determinados através no método de Lowry. Em comparação, foi comprovado a versatilidade e eficiência do método de Lowry na determinação do teor protéico.

O CC, conforme os resultados obtidos apresentou um potencial biocatalítico muito eficiente para a redução de compostos carbonílicos aromáticos e alifáticos (cetonas e aldeídos). Contudo, seu sistema redutase como previsto, não revelou praticamente influência na redução de outros grupos, como ésteres, nitrilas e amidas. Como previsto, os aldeídos, como previsto, foram os compostos mais reativos (91,0% a 100% de rendimentos), enquanto, as cetonas apresentaram rendimentos que oscilaram entre baixos (2,5%) a elevados (100%). Em adição, vale destacar a ação quimio, regio e enantiosseletiva do biocatalisador, em relação a alguns dos compostos.

Os excessos enantioméricos apresentados pelos produtos obtidos nas reduções enzimáticas das cetonas pró-quirais foram de baixos (25,7%) a excelentes (100,0%). Isto, como acontece de modo geral, foi interpretado como resultante da afinidade enantiomérica entre as enzimas do CC e a estrutura química da cetona.

A metodologia de Kalogeris, utilizada no processo de imobilização das enzimas do caldo de cana (EICC), mostrou-se bastante eficiente, revelando um excelente percentual de imobilização enzimática (99,2%).

As EICC não demonstraram nenhum potencial biorredutor, possivelmente devido a perda de seus cofatores no processo de imobilização. Porém, EICC mostrou-se um excelente biocatalisador em reações de acetilação de álcoois.

A otimização dos parâmetros de ação de EICC nas reações de acetilação, utilizando o álcool anísico como substrato, permitiu estabelecer como melhores condições: 200 mg de substrato, 150 mg de EICC, solvente hexano, 70°C de temperatura, 24 horas de reação e velocidade de agitação de 150 rpm. Este mesmo estudo possibilitou determinar o potencial de reutilização de EICC, sendo observado uma possibilidade de reuso acima de cinco vezes quando a reação é processada a 30°C. Na temperatura de 70°C a possibilidade de reuso decresceu para três vezes.

As reações de bioacetilação foram estendidas a outros tipos de álcoois (primários, secundários e um terciário), e um fenol. Como esperado, os álcoois primários foram os mais reativos (7,7% a 93,3%), enquanto, o álcool terciário (0,4% a 30°C e 0,7% a 70°C) e o fenol (2,1% a 30°C e 13,2% a 70°C) apresentaram reatividade muito reduzida.

Os produtos obtidos nas reações de controle, cujos rendimentos foram na faixa de 0 a 4%, foram considerados desprezíveis e indicativos de que, EICC foram realmente responsáveis pela catálise nas reações de obtenção dos produtos com rendimentos importantes do ponto de vista prático.

CAPÍTULO 8

DADOS ESPECTROSCÓPICOS

8. DADOS ESPECTROSCÓPICOS

Álcoois

1-fenil-etan-1-ol (1a). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,39 (sl); 5,83 (q, $J = 6,45$ Hz); 3,53 (s); 1,49 (d, $J = 6,60$ Hz). EMEI (70 eV): m/z 122 (M^{+} ; 32); 107 (90); 79 (100); 77 (62); 43 (30).

3-metoxi-1-fenil-etan-1-ol (2a). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,23 (t, $J = 4,95$); 6,92 (m); 6,80 (m); 4,77 (q, $J = 6,48$ Hz); 3,76 (s); 2,08 (s); 1,43 (d, $J = 6,55$ Hz). EMEI (70 eV): m/z 152 (M^{+} ; 50); 137 (45); 109 (100); 94 (34); 77 (32); 43 (30).

Álcool benzílico (3a). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,35 (sl); 4,86 (sl). EMEI (70 eV): m/z 108 (M^{+} ; 74); 107 (55); 79 (100); 77 (70); 51 (25).

Álcool anísico (4a). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,22 (d, $J = 8,52$ Hz); 6,87 (d, $J = 8,52$ Hz); 4,50 (s); 3,76 (s). EMEI (70 eV): m/z 138 (M^{+} ; 65); 137 (60); 121 (50); 109 (90); 94 (70); 77 (100); 65 (40); 51 (65); 39 (68).

Álcool 3-metoxibenzílico (5a). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,27 (t, $J = 8,16$ Hz); 6,92 (m); 6,83 (m); 4,64 (s); 3,81 (s). EMEI (70 eV): m/z 138 (M^{+} ; 75); 121 (12); 109 (75); 94 (55); 77 (100); 65 (48); 51 (60); 39 (60).

Álcool vanílico (6a). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 6,80 (m); 4,52 (s); 3,84 (s). EMEI (70 eV): m/z 154 (M^{+} ; 80); 153 (15); 137 (40); 122 (30); 93 (70); 65 (100); 39 (62).

Éter etil vanílico (6b). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 6,87 (m); 4,62 (s); 3,91 (s); 3,37 (s). EMEI (70 eV): m/z 168 (M^{+} ; 42); 167 (15); 151 (10); 137 (100); 122 (25); 94 (22); 65 (22).

Álcool cinâmico (7a). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,35 (m); 6,76 (d, $J = 15,9$ Hz); 6,36 (m); 4,37 (d, $J = 6,3$ Hz); 2,10 (s). EMEI (70 eV): m/z m/z 134 (M^{+} ; 32); 115 (32); 105 (40); 92 (100); 78 (62); 51 (60).

Álcool dihidrocinâmico (7b). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,27 (m); 3,70 (t, $J = 6,48$ Hz); 2,97 (t, $J = 7,59$ Hz); 1,91 (q). EMEI (70 eV): m/z 136 (M^{+} ; 12); 117 (75); 93 (100); 77 (25); 65 (30); 51 (30).

Álcool furfurílico (9a). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,38 (s); 6,32 (s); 6,26 (s); 4,53 (s). EMEI (70 eV): m/z 98 (M^{+} ; 100); 97 (60); 81 (62); 69 (50); 53 (65); 42 (70).

Citronelol (10a). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 5,08 (t, $J = 7,00$ Hz); 3,65 (m); 1,62 (s); 1,59 (s); 0,90 (d, $J = 6,39$ Hz). EMEI (70 eV): m/z 156 (M^{+} ; 5); 138 (10); 123 (15); 95 (35); 81 (48); 69 (85); 55 (50); 41 (100).

Ciclopentanol (12a). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 4,05 (q, $J = 7,17$ Hz); 1,73 (m); 1,43 (m). EMEI (70 eV): m/z 86 (M^{+} ; 10); 57 (100); 44 (35); 41 (20).

Ciclohexanol (13a). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 3,57 (m); 1,86 (m); 1,72 (m); 1,50 (m); 1,13 (m). EMEI (70 eV): m/z 100 (M^{+} ; 0,5); 98 (20); 82 (65); 57 (100); 42 (70).

3-hidroxi-butanoato de etila (16a). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 4,14 (m); 2,41 (m); 1,20 (m). EMEI (70 eV): m/z 132 (M^{+} ; 0); 131 (2); 117 (40); 87 (45); 88 (45); 71 (42); 60 (45); 45 (90); 43 (100).

Acetatos

Acetato de Anisila. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,33 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 6,91 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 5,09 (s, 2H), 3,83 (s, 3H); 2,10 (s, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 170,85 (C); 159,70 (C); 130,11 (CH); 129,39 (C); 113,98 (CH); 66,20 (CH_2); 55,21 (CH_3); 20,29 (CH_3). EMEI (70 eV): m/z 180 (M^{+}); 138 (34); 121 (100); 43 (72).

Acetato de 1-fenil-etan-1-ila (1a'). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,32 (sl); 5,90 (q, $J = 6,48$ Hz); 2,07 (s); 1,56 (d, $J = 6,60$ Hz). EMEI (70 eV): m/z 164 (M^{+} ; 15); 122 (86); 104 (100); 77 (55); 43 (90).

Acetato de 3-metoxi-1-fenil-etan-1-ila (2a'). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,23 (t, $J = 4,95$); 6,92 (m); 6,80 (m); 5,85 (q, $J = 6,48$ Hz); 3,81 (s); 2,08 (s); 1,54 (d, $J = 6,57$ Hz). EMEI (70 eV): m/z 194 (M^{+} ; 24); 152 (100); 105 (25); 91 (25); 77 (20); 43 (80).

Acetato de benzila (3a'). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,42 (sl); 5,14 (s); 2,11 (s). EMEI (70 eV): m/z 150 (M^{+} , 40); 108 (100); 91 (80); 43 (62).

Acetato de 3-metoxi-benzila (5a'). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,28 (m); 6,90 (m); 5,08 (s); 3,80 (s); 2,11 (s). EMEI (70 eV): m/z 180 (M^{+} , 40); 138 (100); 121 (33); 109 (35); 91 (37); 43 (43).

Acetato de cinamila (7a'). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,35 (m); 6,76 (d, $J = 15,9$ Hz); 6,36 (m); 4,80 (d, $J = 6,3$ Hz); 2,10 (s). EMEI (70 eV): m/z 176 (M^{+} ; 22); 134 (39); 115 (75); 105 (38); 92 (30); 43 (100).

Acetato de furfurila (9a'). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,39 (s); 6,40 (s); 3,29 (s); 5,05 (s); 2,07 (s). EMEI (70 eV): m/z 140 (M^{+} ; 53); 98 (87); 81 (100); 43 (66).

Acetato de citronelila (10a'). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 5,07 (t, $J = 7,05$ Hz); 4,09 (m); 2,02 (s); 1,62 (s); 1,55 (s); 0,90 (d, $J = 6,39$ Hz). EMEI (70 eV): m/z 198 (M^{+} ; 0); 138 (35); 123 (48); 109 (25); 95 (74); 81 (78); 69 (78); 43 (100).

Acetato de ciclohexila (13a'). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 4,70 (m); 2,19 (s); 1,85 (m); 1,70 (m); 1,50 (m); 1,28 (m). EMEI (70 eV): m/z 142 (M^{+} ; 0); 82 (70); 67 (60); 43 (100).

Acetato de amila (23a). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 3,57 (t, $J = 6,69$ Hz); 2,04 (s); 1,54 (m); 1,28 (sl); 0,87 (m). EMEI (70 eV): m/z 130 (M^{+} ; 0); 101 (0,5); 70 (25); 61 (15); 43 (100).

Acetato de octila (24a). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 4,07 (t, $J = 6,78$ Hz); 2,05 (s); 1,59 (m); 1,29 (sl); 0,89 (m). EMEI (70 eV): m/z 172 (M^{+} ; 0); 130 (0,2); 112 (5); 70 (15); 43 (100).

Acetato de decanoíla (25a). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 3,98 (t, $J = 6,78$ Hz); 1,97 (s); 1,50 (m); 1,28 (sl); 0,81 (m). EMEI (70 eV): m/z 200 (M^{+} ; 0); 97 (8); 70 (20); 56 (30); 43 (100).



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. G.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. **Química Orgânica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978, p. 479.
- ANDERSON, B. A.; HANSEN, M. M.; HARKNESS, A. R.; HENRY, C. L.; VICENZI, J. T.; ZMIJEWSKI, M. J. Application of a practical biocatalytic reduction to an enantioselective synthesis of the 5H-2,3-benzodiazepine LY300164. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 2358–12359, 1995.
- ANDRADE, L. H.; UTSUNOMIYA, R. S.; OMORI, A. T.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, 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, 2006.
- AHEM, T. J.; KLIBANO, A. M. The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. **Science**, v. 228, p. 1280-1284, 1985.
- ARAÚJO, D. M. F.; **Obtenção de Álcoois Quirais Empregando Células Íntegras de Vegetais e Microorganismos como Biocatalisadores na Redução de Cetonas Pró-Quirais**. Dissertação de Mestrado, Edições UFC, Fortaleza, Brasil, 2006.
- BALDASSARRE, F.; BERTONI, G. CHIAPPE, C; MARIONI, F. **Preparative** synthesis of chiral alcohols by enantioselective reduction with *Daucus carota* root as biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 55-58, 2000.
- BARALDI, P. T.; CORREA, A. G. O emprego de fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae*, na síntese de feromônios. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 421-331, 2004.
- BARBIERI, C.; BOSSI, L.; 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.

- BASKAR, B.; GANESH, S.; LOKESWARI, T. S.; CHADHA, A. Highly stereoselective reduction of 4-aryl-2-oxo but-3-enoic carboxylic esters by plant cell culture of *Daucus carota*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 13-17, 2004.
- BELIK, W.; RAMOS, P.; VIAN, C. E. F. **Mudanças Institucionais e seus impactos nas estratégias dos capitais do complexo agroindustrial canavieiro no Centro-Sul do Brasil**. In: Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, 36, Poços de Caldas, 1998.
- BIZERRA, A. M. C. **Reações de Biocatálise utilizando Células Íntegras e Enzimas Imobilizadas de *Cocos nucifera* sp.** Dissertação de Mestrado, Edições UFC, Fortaleza, Brasil, 2007.
- BLANCHARDA, N.; DE WEGHEA, P. V. *Daucus carota* L. mediated bioreduction of prochiral ketones. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 4, p. 2348-2353, 2006.
- BOMMARIUS, A. S.; RIEBE, B. R. L. **Biocatalysis - Fundamentals and applications**, Ed. Wiley, 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.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**, Coleção Mossoroense, Natal, RN, Brasil, 3ª Edição, p. 117-118, 1976.
- BRAZIL; **Ministério da Agricultura**. Disponível no <www.agricultura.gov.br>, acessado em 23.06.08.
- BRUICE, P. Y. **Organic Chemistry**, 2nd ed., Prentice Hall, New Jersey, 1998.
- BRZEZINSKA-RODAK, M.; ZYMANCZYK-DUDA, E.; KLIMEK-OCHAB, M.; KAFARSKI, P.; LEJCZAK, B. A simple and green procedure for the microbial effective synthesis of 1-phenylethyl alcohol in both enantiomeric forms. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 511-513, 2006.

- CAMPBELL, M. K. **Biochemistry**, Saunders College Publishing, p. 169, 1995.
- CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry**, third ed. Plenum Press, New York, p. 68–69, 1990.
- CAREY, J. S.; LAFFAN, D.; THOMSON, C.; WILLIAMS, M. T. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 4, p. 2337-2347, 2006.
- CHANG, C.-Y.; YANG, T.-K. Asymmetric synthesis of ACE inhibitor-benazepril HCl via a bioreductive reaction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 2239-2245, 2003.
- CHARTRAIN, M.; LYNCH, J.; CHOI, W.; CHURCHILL, H.; PATEL, S.; YAMAZAKI, S.; VOLANTE, R.; GREASHAM, R. Asymmetric bioreduction of a bisaryl ketone to its corresponding (S)-bisaryl alcohol, by the yeast *Rhodotorula pilimanae* ATCC 32762. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 8, p. 285-288, 2000.
- CHARTRAIN, M.; ROBERG, C.; CHUNG, J.; McNAMARA, J.; ZHAO, D.; OLEWINSKI, R.; HUNT, G.; SALMON, P.; ROUSH, D.; VAMAZAKI, S.; WANG, T.; GRABOWSKI, E.; BUCKLAND, B.; GREASHAM, R. Asymmetric bioreduction of (2-(4-nitro-phenyl)-N-(2-oxo-2-pyridin-3-yl-ethyl)-acetamide) to its corresponding (R) alcohol [(R)-N-(2-hydroxy-2-pyridin-3-yl-ethyl)-2-(4-nitro-phenyl)-acetamide] by using *Candida sorbophila* MY 1833, enzyme and microbial technology. **Enzyme and Microbial Tecnology**, v. 25, p. 489-496, 1999.
- CHOU, S.-C.; GOLDSTEIN, A. Chromogenic groupings in the Lowry protein determination. **Biochemical Journal**. v. 75, p. 109-115, 1960.
- COMASSETO, J. V.; OMORI, A. T.; ANDRADE, L. H.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of fluoracetophenones by the fungi *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 711-715, 2003.
- COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

- CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; MATTOS, M. C. Vegetales as Chemical Reagents. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 478-492, 2007.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lípases Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- DE CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: Avanços Recentes. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 672-675, 2001.
- DEHLI, J. R.; GOTOR, V. Eanatio- and chemoselective bioreduction of β -keto nitriles by the fungus *Curcularia lunata*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 11, p. 3693-3700, 2000.
- DEHLI, R. J.; GOTOR, V. Dinamic kinetic resolution of 2-oxocycloalkanecarbonitriles: chemoenzymatic syntheses of optically active cyclic β - and γ -amino alcohols. **Journal of Organic Chemical**, v. 67, p. 6816-6819, 2002b.
- DEHLI, R. J.; GOTOR, V. Preparation of enantiopure ketones and alcohols containing a quaternary stereocenter trough parallel kinetic resolution of β -keto nitriles. **Journal of Organic Chemical**, v. 67, p. 1716-1718, 2002a.
- DOOREMBOS, J.; KASSAM, A. H. **Efectos del agua sobre el rendimiento de los cultivos**, Roma: FAO, p. 212, 1979.
- EDEGGER, K.; STAMPFER, W.; SEISSER, B.; FABER, K.; MAYER, S. F.; OERHRLEIN, R.; HAFNER, A.; KROUTIL, W. Regio- and Stereoselective Reduction of Diketones and Oxidation of Diols by Biocatalytic Hydrogen Transfer. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 8, p. 1904-1909, 2006.
- FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**; 4th ed.; Spring; Berlin; 2000.
- FARDELONE, L. C.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Bioreduction of α -haloacetophenones by *Rhodotorula glutinis* and *Geotrichum candidum*. **Arkivoc**, X, p. 404-410, 2003.

- FARDELONE, L. C.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Bioreduction of 2-azido-1-arylethanones mediated by *Geotrichum candidum* and *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 9-12, 2006.
- FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organ**, v. 63, n. 6, p. 965-81, 1985.
- FILHO, E. P. S.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Effect of additives on the bioreduction of 2-chloro-1-phenyl-2-propen-1-one by baker's yeast. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 15, p. 23-28, 2001.
- GANDHI, N. N. Applications of lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, p. 621-634, 1997.
- GANONG, W. F. **Review of Medical Physiology**. 17^o edição, Prentice-Hall Inc., São Francisco, 1995.
- GARRITZ, A. E CHAMIZO, J. A. **Química**, Addison-Wesley Ibero-Americana. p. 495, 1994.
- GOGSTAD, G. O.; KRUTNES, M. B. A faithful double stain of proteins in the polyacrylamide gels with Coomassie blue and silver. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 355-359, 1982.
- GOREN, M. P.; LI, J. T. L. The Coomassie Brilliant Blue method underestimates drug-induced tubular proteinuria. **Clinical Chemistry**, v. 32, p. 386-388, 1986.
- GOTHAM, S. M.; FRYER, P. J.; PATERSON, W. R. The measurement of insoluble proteins using a modified Bradford assay. **Analytical Biochemistry**, v. 173, p.353-358, 1988.
- GOTOR, V.; REBOLLEDO, F.; LIZ, R. Enantioselective bioreduction of β -keto sulfones with the fungus *Curcularia lunata*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, p. 513-515, 2001.
- HANSON, J. R.; **An Introduction in Biotransformations in Organic Chemistry**; Oxford University Press; New York; 1997.
- HARTREE, E. F. Determination of Protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

- HIRATA, T.; AOKI, T.; HIRANO, Y.; ITO, T.; SUGA, T. The Biotransformation of Foreign Substrates by Tissue Cultures. I. The Hydroxylation of Linalool and Its Related Compounds with the Suspension Cells of *Nicotiana tabacum*, **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 3527-3529, 1981.
- INOUE, K.; MAKINO, Y.; ITHO, N. Production of (R)-chiral alcohols by a hydrogen-transfer bioreduction with NADH-dependent *Leifsonia* alcohol desidrogenase (LSADH). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, p. 2539-2549, 2005.
- ITOH, N.; NAKAMURA, M.; INOUE, K.; MAKINO, Y. Continuous production of chiral 1,3-butanediol using immobilized biocatalysts method with an asymmetric hydrogen-transfer bioreduction. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 75, p. 1249-1256, 2007.
- KALOGERIS, E.; SANAKIS, Y.; MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; STAMATIS, H. Properties of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* immobilized in calcium alginate hidrogels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1113-1121, 2006.
- KIM, K.-W.; SONG, B.; CHOI, M.-Y.; KIM, M.-J. Biocatalysis in Ionics Liquids: Markedly Enhanced Enantioselectivity of Lipase. **Organic Letters**, v. 3, n. 10, 1507-1509, 2001.
- KREUTZ, O. C.; SEGURA, R. C. M.; RODRIGUES, A. R.; MORAN, P. J. S. Enantioselective bioreduction of (E)-1-phenyl-1,2-alkanedione 2-(O-methyloxime). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 11, 2107-2115, 2000.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 3^a Ed., Ed. Sarvier, São Paulo, 2002.
- LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 229-245, 1999.
- LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 149-154, 1999.

- LUNA, H. Biocatalysis application for preparing intermediates for drug synthesis. **Revista de la Sociedad Química de México**, v. 48, p. 211–219, 2004.
- MACHADO, L. L.; **Estudo Fitoquímico e Atividade Biológica dos Frutos de *Passiflora edulis* e Redução de Cetonas e Aldeídos Aromáticas Utilizando Cascas da *Passiflora edulis* como Biocatalisador**, Dissertação de Mestrado, Edições UFC, Fortaleza, Brasil, 2004.
- MACHADO, L. L.; SOUZA, J. S. N.; MATTOS, M. C.; SAKATA, S. K.; CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioreduction of aldehydes and ketones using Manihot species. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1637-1643, 2006.
- MANCILA, M.; De CONTI, R.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, A. R. Bioreduction of α -methyleneketones. **Arkivoc**, VI, p. 85-93, 2001.
- MANDAL, D.; AHMAD, A.; KHAN, M. J.; KUMAR, R. Enantioselective bioreduction of acetophenone and its analogous by the fungus *Trichothecium* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 61-63, 2004.
- MARSHALL, T.; WILLIAMS, K. M. Coomassie blue protein dye-binding assays measure formation of an insoluble protein-dye complex. **Analytical Biochemistry**, v. 204, p. 107-109, 1992.
- McDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D. **Animal Nutrilion**, Longman Scientific & Technical; Hong Kong, 1987.
- MIHOVILOVIC, M. D.; SPINA, M.; STANETTY, P. Synthesis and yeast-mediated bioreduction of α -keto- β -lactams bearing a functionalized and rigid side chain. **Arkivoc**, V, p. 33-44, 2005.
- MILAGRE, H. M. S.; MILAGRE, C. D. F.; MORAN, P. J. S.; SANTANA, M. H. A.; RODRIGUES, J. A. R. Asymmetry Bioreduction of ethyl 3-halo-2-oxo-4-phenilbutanoate by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in Ca-Alginate beans with double gel layer. **Organic Process Research & Development**, v. 10, p. 611-617, 2006.

- MIRONOWICZ, A. Biotransformations of racemic acetates by potato and topinambur tubers. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1531-1534, 1998.
- NASSAR, N. M. A. Genetic variation of wild *Manihot* species native to Brazil and its potential for cassava improvement. **Field Crops Research**, v. 13, p. 177-184, 1986.
- ORDEN, A. A.; BISOGNO, F. R.; GIORDANO, O. S.; SANZ, M. K. Comparative study in the asymmetric bioreduction of ketones by plant organs and undifferentiated cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 49-55, 2008.
- PALMER, T. **Understanding Enzymes**, Prentice Hall-Ellis Horwood, 67-75, 1995.
- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAN, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.
- PANDY, S. V.; MURTHY, M. S. R. A Modified Micro-Bradford Procedure for Elimination of Interference from Sodium Dodecyl Sulfate, Other Detergents, and Lipids. **Analytical Biochemistry**, v. 220, p. 424-426, 1994.
- PARIDA, S.; DORDICK, J. S. Substrate structure and solvent hydrophobicity control lipase catalysis and enantioselectivity in organic media, **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p. 2253-2259, 1991.
- QUIRÓS, M.; BEBOLLEDO, F.; GOTOR, V. Bioreduction of 2-oxocyclopentanecarboxamides: syntheses of optically active 2-aminomethyl- and 2-aminocyclopentanol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 473-486, 1999.
- 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 and Biotransformation**, v. 23 n. 3-4, p. 233-239, 2005.
- REINHARD, E.; ALFERMANN, A. W. Advances in Biological Engineering. **Springer, Berlin**, v. 16, p. 49-83, 1980.

- ROSENTHAL, K. S.; KOUSSALE, F. Critical micelle concentration determination of nonionic detergents with Coomassie Brilliant Blue G-250. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 1115-1117, 1983.
- SALINAS, Y.; OLIART, R. M.; RAMÍREZ-LEPE, M.; NAVARRO-OCAÑA, A.; VALERIO-ALFARO, G. Synthesis of chiral α -hydroxy amides by two sequential enzymatic catalyzed reaction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 297-302, 2007.
- SALUNKHE, M. M.; NAIR, R. Mild and efficient enzymatic oximolysis by supported *Pseudomonas cepacia* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 535-538, 2000.
- SOARES, C. M.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, p. 745-757, 1999.
- SONI, P.; BANERJEE, U. C. Enantioselective reduction of acetophenone and its derivatives with a new yeast isolated *Candida tropicalis* PBR-2 MTCC 5158. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 80-85, 2006.
- SOUZA, J. S. N.; **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil *Heliotropium indicum* L. e redução de cetonas aromáticas utilizando biocatalisadores**, Dissertação de Mestrado, Edições UFC, Fortaleza, Brasil, 2003.
- STAHL, S.; IKEMOTO, N.; KING, A.; GREASHAM, R.; CHARTRAIN, M. Asymmetric direduction of 1,2-indanedione to cis (1S, 2R) indanediol by *Trichosporon cutaneum* MY 1506. **Journal of Bioscience and bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 495-499, 1999.
- STUECKLER, C.; HALL, M.; EHAMMER, H.; POINTNER, E.; KROUTIL, W.; MACHEROUX, P.; FABER, K. Stereocomplementary bioreduction of α,β -unsaturated dicarboxylic acids and dimethyl esters using enoate reductases: enzyme- and substrate-based stereocontrol. **Organic Letters**, v. 9, n. 26, p. 5409-5411, 2007.

- STUERMER, R.; HAUER, B.; HALL, M.; FABER, K.; Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 203-213, 2007.
- SUGA, T.; HIRATA, T.; HIRANO, Y.; ITO, T. Biotransformation of monoterpenes by tobacco tissue cultures. Selective hydroxylation of *trans*-methyl group in isopropylidene group, **Chemistry Letters**, p. 1245-1248, 1976.
- TAKEMOTO, M.; ACHIWA, K. Deracemization of racemic 4-pyridyl-1-ethanol by *Catharanthus roseus* cell cultures. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1627-1629, 1998.
- VARI, D. L.; BRENNAN, J.; BRIGGS, B.; CRONIN, J. S.; HAY, D. A.; RIECK III, J. A.; ZMIJEWSKI, M. J. Bioreduction of (R)-carvone and Regioselective Baeyer-Villiger Oxidations: Application to the Asymmetric Synthesis of Cryptophycin Fragment A. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 8405-8408, 1998.
- VEIT, T. Biocatalysis for the production of cosmetic ingredients. **Eng. Life Sci.**, v. 4, p. 508-511, 2004.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HOSS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.
- VRIES, E. F. J.; BRUSSEE, J.; KRUSE, C. G.; VAN DER GEN, A. Stereoselective reduction of prochiral ketones, using aluminum hydride reagents prepared from LiAlH₄ and chiral diethanolamines. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 5, p. 377-386, 1994.
- VOLKIN, D. B.; KLIBANOV, A. M. **In Protein Function, A Practical Approach**. Creighton, T. E., Ed., IRL Press: Oxford, 1989.
- XU, P. P.; TROUPE, C. M.; SHARMA, A. Interference by Cyclodextrins in Protein Determination by the Bradford Method. **Microchemical Journal**, v. 49, p. 85-90, 1994.
- YADAV, J. S.; NANDA, S.; REDDY, P. T.; RAO, A. B. Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 3900-3903, 2002.

- YANG, Y.; KAYSER, M. M.; ROCHON, F. D.; RODRIGUES, S.; STEWART, J. D. Assessing substrate acceptance and enantioselectivity of yeast reductases in reactions with substituted α -keto β -lactams. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 167-174, 2005.
- ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens de métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. **Science**, v. 224, p. 1249-1251, 1984.
- ZALE, S. E.; KLIBANOV, A. M. Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures?. **Biochemistry**, v. 25, p. 5432-5444, 1986.