



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

**AYLA MÁRCIA CORDEIRO BIZERRA**

**BIORREDUÇÕES DE CETONAS PRÓ-QUIRAIS E NITROCOMPOSTOS COM  
CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *Vigna unguiculata* L. E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE  
ÉSTERES DE CLORANFENICOL**

**TESE DE DOUTORADO**

**FORTALEZA**

**2012**

AYLA MÁRCIA CORDEIRO BIZERRA

Biorreduções de cetonas pró-quirais e nitrocompostos com células íntegras de *Vigna unguiculata* L. e Produção Enzimática de Ésteres de Cloranfenicol

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

Orientador: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos

**FORTALEZA**

**2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- B552b Bizerra, Ayla Márcia Cordeiro.  
Biorreduções de cetonas pró-quirais e nitrocompostos com células íntegras de *Vigna unguiculata* L. e produção enzimática de ésteres de cloranfenicol / Ayla Márcia Cordeiro Bizerra. – 2012.  
277 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Química Orgânica.  
Orientação: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.
1. Cloranfenicol. 2. Lipase. 3. Acilação. 4. Biocatálise. I. Título.

AYLA MÁRCIA CORDEIRO BIZERRA

Biorreduções de cetonas pró-quirais e nitrocompostos com células íntegras de *Vigna unguiculata* L. e Produção Enzimática de Ésteres de Cloranfenicol

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

Aprovada em \_\_\_\_/ \_\_\_\_/ \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA



À meu pai e principalmente minha amada mãe e irmã, que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado em todas as situações.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o grande maestro da vida, que sempre nos conduz por caminhos que muitas vezes não entendemos, mas que nos levam a felicidade. Ele que é o autor da vida, meu eterno agradecimento. À Nossa Senhora, por toda a intersecção e amor de mãe que nos dá todos os dias.

A meu amado pai, José Alberto e em especial, à minha mãe Socorro e minha irmã Aline. Que mesmo diante de todas as adversidades e conflitos, jamais deixaram de me apoiar e acima de tudo de me amar. E é principalmente à minha mãe, o meu maior e verdadeiro amor à quem dedico cada passo de minha vida, e essa tese em especial.

Aos meus tios Alverne e Marcone por estarem tão presentes em minha vida, e serem meus grandes amigos. Aos demais familiares: tios Cláudio, Emanuel, Genésio; minhas tias Maria Rita, Miriam (*in memoriam*), Ana Lúcia; meus amados avós Pedro e Dos Anjos os quais amo muito, por todo acompanhamento e incentivo. À pequena Maryanne por tornar muitos fins de semana em minha casa, mais coloridos e divertidos.

Aos meus grandes e melhores amigos Luciana Bertini e Leonardo Alcântara que mesmo diante das transformações que nos acompanharam ao longo desses quatro anos, jamais deixaram de estar presente, fazendo valer o real sentido da palavra amizade. Não menos importante, agradeço a Juliana Maria, que não apenas me ajudou em tantas situações, mas se tornou um grande apoio e uma fiel amiga.

À família Almeida Canuto: Helena, Eliseu, Jáder e Júnior, que me adotou como filha, e com os quais criei laços eternos de amizade e carinho.

Aos meus amigos de laboratório: Juliana, Patrícia, Anderson, Karina, Allyson, Davi, Cleane, Léo Carvalho, Leila, Felipe, Gizele e André, que sem dúvida, ajudaram a tornar os dias de trabalho bem mais alegres e divertidos. Aqui construímos uma grande família e sem dúvida somos o laboratório “mais feliz” desta universidade.

Aos companheiros de departamento na orgânica: Daniele, Juliana, Elaine, Carol, Irvila, Thiago, Paula Uchôa, Isabel, Ceiza, Reinaldo, Daniel, Natália, Biel, Bárbara, Elton, Regivaldo, Honório e Isabel.

Aos amigos de sempre, do coração: Thiciana, Karísia, Mariano, Vanessa, Karine, Max, Paula, Solange, que são um grande tesouro e um bem inestimável.

Aqueles que já não fazem mais parte do convívio diário de laboratório, mas que permanecem amigos de coração: Allana, Lobinha, Luciana, Délcio, Hélcio, Sammy, Aluísio,

Mozarina, Gizelle, Rosa, Bartholomeu, Praxedes, Ernani, Fátima, Renata Paiva, Renata Mendonça, Andreza, Glauber, João Carlos, Davina, Neto, Jackson, Jefferson, Sávio e Arthur. Com eles aprendi muito sobre o significado de amizade.

Aos amigos extra-UFC: Santos, Wagner, Diana, Ribamar, Kelly, Noélia, Gustavo, Tatiana, Lucas, Thays e Léo Natanael que são sempre grandes apoios e sinceras amizades.

Às verdadeiras amizades conquistadas na Universidad de Oviedo: Maria, Ana, Niko, Fabri, Sergio, Aníbal, Anina, Rafael, Romey, Yamilla, Cris, Tania, Alba, Jefferson, e Elke, por se tornarem a minha família em terra estrangeira, meus sinceros e eternos agradecimentos.

Aos meus orientadores espanhóis: Vicente Gotor-Fernández, Ivan Lavadera, e Gonzalo de Gonzalo, os quais carinhosamente chamo de Vicen, Ivo e Gonza, por terem sido como pai e irmãos para mim, no momento em que estive longe de minha família e por eles fui acolhida. Ao professor Vicente Gotor, por me aceitar em seu laboratório e confiar em meu trabalho.

À professora Telma Leda, pela orientação e amizade construída ao longo de todos esses anos. Meus agradecimentos pelo conhecimento adquirido, pelas experiências obtidas, pelo laço fraterno, pelo apoio em cada momento, e por todas as situações vivenciadas, me ensinando sempre algo novo em cada uma delas. Por todo apoio, incentivo e confiança em mim depositados.

A todos os professores do Departamento de Química Orgânica que sem dúvida, foram de fundamental importância para minha formação profissional.

Aos funcionários: Mundinha, Lana, Célia e Orlando por todo o serviço prestado.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, pela bolsa concedida e à CAPES pelo projeto de colaboração internacional CAPES-DGU processo nº 149/07 referente ao Doutorado Sanduíche realizado na Espanha.

*“Deixa-te lapidar, deixa-te modelar tu não  
sabes o que Deus fará de ti.”*

## RESUMO

Este trabalho descreve a pesquisa realizada na área de biocatálise através de enzimas obtidas de duas fontes: vegetal e comercial. Para as biotransformações realizadas com fontes vegetais, utilizou-se especialmente a espécie *Vigna unguiculata*; para as biotransformações realizadas com enzimas comerciais, utilizou-se principalmente lipases de *Candida antarctica* e *Pseudomonas cepacia*. Foram selecionados diferentes vegetais para os estudos, estes foram submetidos à testes de determinação de proteínas por diferentes métodos (Lowry e Bradford), e após os resultados obtidos, selecionou-se apenas as espécies com maiores teores proteicos, sendo este o indicativo de presença de enzimas. Foi realizado um screening com redução de acetofenona variando-se as condições reacionais, onde selecionou-se as espécies que levaram ao melhores resultados de conversão e excesso enantiomérico. Essas condições foram aplicadas para outros 34 substratos, entre eles: cetonas alifáticas e aromáticas com diferentes substituintes no anel como: nitro, metóxi, alquila e halogênios em várias posições; nitrocompostos,  $\beta$ -ceto-ésteres, uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada e benzonitrila. No geral, os resultados obtidos com as biorreduções podem ser considerados satisfatórios, assim como os valores de excesso enantiomérico. Para as reações que utilizaram enzimas comerciais, foram utilizadas as seguintes lipases : CAL-B, PSL-C(I) e PSL-C Amano. Elas foram utilizadas em reações de acilação do fármaco cloranfenicol, em um estudo exaustivo em busca de condições ótimas de reação explorando principalmente a atividade regioseletiva dessas enzimas. Foram obtidos oito derivados desse fármaco, a depender do agente acilante utilizado, sendo sete destes, monoacilados e um, di-acilado. Como doador acila usou-se diversos ésteres vinílicos, saturados ou não e com diversos tamanhos de cadeia. Parâmetros reacionais como: variação do solvente, da temperatura, concentração do meio e agente acilante foram otimizados para obtenção desses derivados. Praticamente todos os produtos foram obtidos em elevados percentuais de conversão, exceto para aqueles que possuem insaturação. Realizou-se ainda um procedimento em escala de bancada utilizando a enzima CAL-B, sendo obtidos resultados bem significativos em todos os casos. Ao final do estudo adotou-se um procedimento de reciclagem desta mesma enzima, onde ficou comprovada sua eficiência no reuso.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, células íntegras, excesso enantiomérico, cloranfenicol, lipase, acilação.

## ABSTRACT

This paper describes the research conducted in the area of catalysis by enzymes obtained from two sources: vegetable and commercial. For the biotransformations with plant sources was used especially the species *Vigna unguiculata*; for biotransformations with commercial enzymes was used mainly lipases from *Candida antarctica* and *Pseudomonas cepacia*. Different plants were selected for the studies, these were subjected to tests of protein determination by different methods (Lowry and Bradford), and after the results, we selected only those species with highest protein levels, which is indicative of the presence of enzymes. We performed a screening reduction of acetophenone with varying the reaction conditions where the species is selected which led to the best results of conversion and enantiomeric excess. These conditions were applied to 34 other substrates, including: aliphatic and aromatic ketones with different substituents on the ring such as nitro, methoxy, alkyl and halogens in various positions; nitrocompounds,  $\beta$ -keto ester, a ketone  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated and benzonitrile. Overall, the results obtained with the biorreduções can be considered satisfactory, as are the enantiomeric excess values. For the reactions using commercial enzymes, we used the following lipases: CAL-B, PSL-C (I) and PSL-C Amano. They were used in acylation reactions of the drug chloramphenicol, in an exhaustive study in search of optimum reaction conditions mainly exploring the activity of these enzymes regioselective. We obtained eight derivatives of the drug, depending on the acylating agent utilized, and seven of these, and a monoacylated, di-acylated. As acyl donor was used several vinyl esters, saturated or not and with different sizes of chain. Reaction parameters such as the variation of solvent, temperature, concentration of the medium and acylating agent have been optimized to obtain these derivatives. Virtually all products were obtained in high conversion percentage, except for those with unsaturation. It was also performed a procedure on a bench scale using the enzyme CAL-B, very significant results were obtained in all cases. At the end of the study we adopted a procedure for recycling this same enzyme, which was proven to be efficient in reuse.

Keywords: *Vigna unguiculata*, whole cells, enantiomeric excess, chloramphenicol, lipase, acylation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Partes aéreas de <i>Vigna unguiculata</i> .....	31
FIGURA 2 – Grãos de <i>Vigna unguiculata</i> .....	31
FIGURA 3 - Estrutura de cloranfenicol .....	34
FIGURA 4 – Formas estereoisoméricas de cloranfenicol .....	35
FIGURA 5 – Estruturas de Tianfenicol (5) e Florfenicol (6) .....	36
FIGURA 6 – Estrutura de Azidamfenicol (7) .....	36
FIGURA 7 – Estruturas de Palmitato (8) e Succinato (9) de cloranfenicol .....	37
FIGURA 8 - Esquema reacional de obtenção química de palmitato de cloranfenicol (8) .....	38
FIGURA 9 - Gráfico da evolução das publicações em biocatálise nos últimos dez anos .....	42
FIGURA 10 – Esquema geral do processo de regeneração de cofator .....	45
FIGURA 11 – Biotransformações de carvona com <i>N. tabacum</i> e <i>M.piperita</i> .....	49
FIGURA 12 – Biotransformação $\beta$ -pineno com <i>P. abies</i> .....	49
FIGURA 13 - Biotransformação de $\alpha$ -santonina por três espécies vegetais .....	50
FIGURA 14 - Biotransformação de bufotalina por <i>S. involucrata</i> .....	51
FIGURA 15 - Biotransformação de $\alpha$ -ionona por <i>C. chamgalu</i> .....	51
FIGURA 16 - Esquema de biooxidação catalisada por espécies vegetais .....	52
FIGURA 17 - Esquema de biooxidação do estragol catalisada por espécies vegetais .....	54
FIGURA 18 - Esquema de biooxidação de bufanolídeos catalisada por <i>S. involucrata</i> .....	55
FIGURA 19 - Esquema de biotransformação de $\alpha$ -santonina por espécies vegetais .....	56
FIGURA 20 - Esquema de hidrólise de epóxidos biocatalisada por <i>S. tuberosum</i> ...	56
FIGURA 21 - Glicosilação de compostos biocatalisada por <i>E. perriniana</i> com seus respectivos rendimentos .....	57
FIGURA 22 - Glicosilação de compostos biocatalisada por <i>P. americana</i> com seus respectivos rendimentos .....	58
FIGURA 23 – Descarboxilação de compostos biocatalisada por <i>C. roseus</i> .....	58
FIGURA 24 - Obtenção de cianohidrinias biocatalisada por <i>H. brasiliensis</i> .....	59
FIGURA 25 - Obtenção de cianohidrinias biocatalisada por <i>V. sativa</i> .....	61
FIGURA 26 - Biorredução de azidocetonas biocatalisada por <i>D. carota</i> .....	62
FIGURA 27 - Biorredução de acetofenonas biocatalisada por <i>D. carota</i> .....	63
FIGURA 28 - Biorredução de acetofenonas organoselenadas biocatalisada por <i>D.</i>	

<i>carota</i> .....	64
FIGURA 29 – Biorredução de tetralonas $\alpha$ -substituídas biocatalisada por <i>D. carota</i>	65
FIGURA 30 – Biorredução de $\beta$ -ceto-ésteres biocatalisada por espécies de <i>Taxus</i> ..	66
FIGURA 31 - Diversidade biológica da origem de lipases .....	67
FIGURA 32 - Mecanismo de catálise por lipase .....	68
FIGURA 33 - Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de <i>Pseudomonas</i> sp .....	69
FIGURA 34 - Mecanismo catalítico de lipases .....	70
FIGURA 35 - Esquema geral de reações catalisadas por lipases .....	72
FIGURA 36 - Mecanismo de reação de aminólise catalisada por lipase .....	73
FIGURA 37 - Esquema geral de reações de hidrólise catalisada por lipase .....	74
FIGURA 38 - Esquema geral de interesterificações e de hidrólises catalisadas por lipase.....	75
FIGURA 39 - Esquema geral de catalises por lipases específicas e não-específicas	76
FIGURA 40 - Relação entre os componentes envolvidos numa reação biocatalisada	78
FIGURA 41 – Estruturas dos aminoácidos tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina.....	83
FIGURA 42 – Estruturas dos aminoácidos lisina, arginina, histidina, aspartato e glutamato .....	87
FIGURA 43 - Estruturas de acetofenona (1), <i>p</i> -cloro-nitrobenzeno (2) e benzoato de metila (3).....	91
FIGURA 44 - Separação cromatográfica de cloro-nitro-benzeno e cloro-anilina.....	91
FIGURA 45 – Separação cromatográfica de 1-fenil-etanol e acetofenona.....	92
FIGURA 46 - Cromatograma de resolução dos enântiômeros do 1-fenil-etanol (1a)	92
FIGURA 47 - Estruturas de diferentes cetonas a serem usadas como substrato nas biotransformações .....	95
FIGURA 48 – Resolução do acetato de ( <i>RS</i> )-2-octanol .....	97
FIGURA 49 – Resolução do acetato de ( <i>RS</i> )-3-hexanol .....	97
FIGURA 50 – Resolução do acetato de ( <i>RS</i> )-5-hexen-2ol.....	97
FIGURA 51 - Resolução do acetato ( <i>RS</i> )-3-hidróxi-butanoato de etila.....	97
FIGURA 52 – Resolução do ( <i>RS</i> )-Mentol.....	97
FIGURA 53 – Resolução do ( <i>RS</i> )-Tetralol .....	97
FIGURA 54 – Esquema de redução de acetofenona .....	103
FIGURA 55 – Esquema de redução química de derivados de acetofenona.....	111



FIGURA 56 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 12 e 12a .....	112
FIGURA 57 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto 12a .....	112
FIGURA 58 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 12a ....	113
FIGURA 59 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 13 e 13a.....	113
FIGURA 60 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto 13a.....	113
FIGURA 61 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 13a ....	113
FIGURA 62 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 14 e 14a.....	114
FIGURA 63 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto 14a.....	114
FIGURA 64 – Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 14a....	114
FIGURA 65 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 15 e 15a .....	114
FIGURA 66 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto 15a.....	114
FIGURA 67 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 15a ....	115
FIGURA 68- Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 16 e 16a .....	115
FIGURA 69 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto 16a.....	115
FIGURA 70 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 16a ...	115
FIGURA 71 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 17 e 17a .....	116
FIGURA 72 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto 17a.....	116
FIGURA 73 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 17a ....	116
FIGURA 74 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 18 e 18a .....	116
FIGURA 75 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto 18a.....	116
FIGURA 76 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 18a ....	117
FIGURA 77 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 19 e 19a .....	117
FIGURA 78 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto 19a.....	117
FIGURA 79 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 19a ....	117
FIGURA 80 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 20 e 20a .....	118
FIGURA 81 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 20a ....	118
FIGURA 82 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 21 e 21a e dos enântiômeros de 21a .....	118
FIGURA 83 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 22 e 22a .....	118
FIGURA 84 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 22a ....	118
FIGURA 85 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 23 e 23a .....	119
FIGURA 86 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 23a ....	119
FIGURA 87 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 24 e 24a .....	119
FIGURA 88 - Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 24a ....	119

FIGURA 89 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 25 e 25a .....	119
FIGURA 90 – Cromatograma de separação em CLAE dos enântiômeros de 25a ...	119
FIGURA 91 – Esquema de redução química de nitro-acetofenona .....	120
FIGURA 92 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 12, 12a e 12b .	121
FIGURA 93 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 13, 13a e 13b.	121
FIGURA 94 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 14, 14a e 14b.	121
FIGURA 95 – Esquema de biorredução de cetonas aromáticas metoxiladas .....	123
FIGURA 96 – Esquema de biorredução de cetonas aromáticas alquiladas .....	124
FIGURA 97 - Esquema de biorredução de cetonas aromáticas halogenadas.....	125
FIGURA 98 - Esquema reacional das biorreduções das cetonas aromáticas nitradas	127
FIGURA 99 - Esquema reacional das biorreduções para o nitrobenzeno.....	128
FIGURA 100 - Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 26 e 26a.....	129
FIGURA 101 - Esquema reacional das biorreduções para o hidróxi-nitrobenzeno...	130
FIGURA 102 - Esquema reacional das biorreduções para a benzonitrila.....	130
FIGURA 103 - Esquema reacional da biorredução nitro-acetato.....	131
FIGURA 104 - Resultados das biorreduções para cetonas alifáticas e $\beta$ -ceto-ésteres	131
FIGURA 105 - Resultados das biorreduções para fenil-butanona .....	133
FIGURA 106 - Estruturas de Resveratrol (36) e <i>S</i> -naproxen (37) .....	134
FIGURA 107 - Estruturas de Dapoxetina (38) e 2-trans-amino-ciclopentanol (39).	135
FIGURA 108 - Esterificação enzimática de cloranfenicol com decanoato de vinila	135
FIGURA 109 - Esquema de reação química para obtenção dos derivados de cloranfenicol .....	145
FIGURA 110 - Derivados monoacilados de cloranfenicol obtidos via reação química com cloretos de ácido .....	146
FIGURA 111 - Derivados monoacilados de cloranfenicol obtidos via reação enzimática .....	146
FIGURA 112 - Esquema reacional de reação química para obter os derivados di-acilados de cloranfenicol .....	147
FIGURA 113 - Estruturas dos compostos cloranfenicol (40), acetato (43), propanoato (44) e crotonato (48) de cloranfenicol .....	148
FFIGURA 114 - Estruturas dos compostos decanoato (41), laurato (45), palmitato (47) e benzoato (46) de cloranfenicol .....	149
FIGURA 115 - Cromatograma de separação dos compostos cloranfenicol, acetato, di-acetato de cloranfenicol.....	151

FIGURA 116 - Cromatograma de separação dos compostos cloranfenicol, propanoato e di-propanoato de cloranfenicol .....	152
FIGURA 117 – Cromatograma de separação dos compostos cloranfenicol, crotonato e di-crotonato de cloranfenicol .....	152
FIGURA 118 - Cromatograma de separação dos compostos di-laurato, laurato de cloranfenicol e cloranfenicol.....	152
FIGURA 119 - Cromatograma de separação dos compostos cloranfenicol, benzoato e dibenzoato de cloranfenicol.....	153
FIGURA 120 - Cromatograma de separação dos compostos di-decanoato, decanoato de cloranfenicol e cloranfenicol.....	153
FIGURA 121 - Cromatograma de separação dos compostos di-palmitato, palmitato de cloranfenicol e cloranfenicol.....	153
FIGURA 122 - Curva de calibração de Cloranfenicol.....	154
FIGURA 123 – Curva de calibração de Decanoato de cloranfenicol.....	154
FIGURA 124 – Curva de calibração de Di-decanoato de cloranfenicol.....	155
FIGURA 125 – Curva de calibração de Acetato de cloranfenicol.....	155
FIGURA 126 – Curva de calibração de Propanoato de cloranfenicol.....	155
FIGURA 127 - Curva de calibração de Di-propanoato de cloranfenicol .....	155
FIGURA 128 - Curva de calibração de Crotonato de cloranfenicol.....	156
FIGURA 129 – Curva de calibração de Laurato de cloranfenicol.....	156
FIGURA 130 – Curva de calibração de Palmitato de cloranfenicol.....	156
FIGURA 131 – Curva de calibração de Benzoato de cloranfenicol.....	156
FIGURA 132 - Reação de acetilação enzimática com cloranfenicol.....	157
FIGURA 133 – Reação de acilação enzimática com propanoato de vinilo.....	158
FIGURA 134 - Reação de acilação enzimática com crotonato de vinilo .....	159
FIGURA 135 - Reação de acilação enzimática com laurato de vinilo.....	161
FIGURA 136 - Reação de acilação enzimática com benzoato de vinilo.....	162
FIGURA 137 - Cromatograma da reação com do anidrido acético .....	165
FIGURA 138 - Reação de acilação enzimática com palmitato de vinilo.....	166
FIGURA 139 - Esquema reacional para reciclagem enzimática.....	174
FIGURA 140 – Gráfico dos resultados das reações de reciclagem enzimática.....	174

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Reações orgânicas e as correspondentes enzimas que as catalisam em biotransformações.....	43
TABELA 2 - Relação de cofator e sua atuação em reações orgânicas.....	44
TABELA 3 - Espécies utilizadas na biotransformação de $\alpha$ -santonina e seus respectivos rendimentos .....	50
TABELA 4 - Espécies utilizadas na biooxidação álcoois aromáticos.....	53
TABELA 5 - Espécies usadas na biooxidação do estragol e suas conversões .....	54
TABELA 6 – Espécies usadas na biotransformação de $\alpha$ -santonina e seus respectivos rendimentos .....	56
TABELA 7 - Resultados das hidrólises dos epóxidos biocatalisadas por <i>S. tuberosum</i>	57
TABELA 8 - Rendimentos das descarboxilações biocatalisadas por <i>C. roseus</i> .....	59
TABELA 9 - Resultado da obtenção de cianohidrinias biocatalisada por <i>H. brasiliensis</i> .....	60
TABELA 10 - Resultado da obtenção de cianohidrinias biocatalisada por <i>V. sativa</i>	61
TABELA 11 - Resultados da Biorredução de azidocetonas biocatalisada por <i>D. carota</i> .....	63
TABELA 12 - Resultados da Biorredução de acetofenonas biocatalisada por <i>D. carota</i> .....	64
TABELA 13 - Resultados da Biorredução de acetofenonas organoselenadas biocatalisada por <i>D. carota</i> .....	65
TABELA 14 - Resultados da Biorredução de tetralonas $\alpha$ -substituídas biocatalisada por <i>D. carota</i> .....	66
TABELA 15 - Resultados da Biorredução de $\beta$ -ceto-ésteres biocatalisada por espécies de <i>Taxus</i> .....	66
TABELA 16 - Fontes vegetais utilizadas no screening para o estudo de biocatálise	82
TABELA 17 - Lista de interferentes na análise pelo método de Lowry .....	85
TABELA 18 - Concentração de proteínas nos materiais vegetais utilizados pelo método de Lowry.....	86
TABELA 19 - Interferentes no método de Bradford.....	88
TABELA 20 - Concentração de proteínas nos materiais vegetais utilizados pelo método de Bradford.....	88

TABELA 21 - Resultados do primeiro screening de reações realizado com espécies de feijão .....	91
TABELA 22 - Resultados obtidos para reações realizadas em meio tamponante.....	93
TABELA 23 - Rendimento das reações químicas do preparo de padrões .....	96
TABELA 24 - Reações de biorredução de diferentes cetonas com F-1 .....	98
TABELA 25 - Reações de biorredução de diferentes cetonas com F-2 .....	100
TABELA 26 - Reações de biorredução de acetofenona com F-1 em diferentes meios reacionais .....	104
TABELA 27 - Reações de biorredução de acetofenona com F-2 em diferentes meios reacionais.....	105
TABELA 28 - Resultados de biorredução com o uso de IPA como co-solvente no meio reacional .....	107
TABELA 29 - Resultados de biorredução variando as quantidades de solvente ou biocatalisador.....	109
TABELA 30 - Rendimentos das reações químicas para obtenção dos padrões .....	112
TABELA 31 - Resultados das biorreduções das cetonas aromáticas metoxiladas ....	123
TABELA 32 - Resultados das biorreduções das cetonas aromáticas alquiladas.....	124
TABELA 33 - Resultados das biorreduções das cetonas aromáticas halogenadas.....	125
TABELA 34 - Resultados das biorreduções das cetonas aromáticas nitradas .....	127
TABELA 35 - Resultados das biorreduções para o nitrobenzeno .....	128
TABELA 36 - Resultados das biorreduções para cetonas alifáticas e $\beta$ -ceto-ésteres..	132
TABELA 37 - Resultados das reações iniciais de acilação de cloranfenicol .....	136
TABELA 38 - Resultados das reações de acilação com mudança de solvente.....	137
TABELA 39 - Constantes físicas dos solventes utilizados nas reações de esterificação de cloranfenicol .....	138
TABELA 40 - Resultados das reações de acilação com mudança de temperatura e solvente com CAL-B .....	141
TABELA 41 - Resultados das reações de acilação de cloranfenicol com variação de temperatura e solvente com PSL-C (I) e Amano .....	143
TABELA 42 – Condições ideais de atividade para as enzimas utilizadas .....	144
TABELA 43 - Rendimentos das reações químicas para obtenção dos padrões .....	145
TABELA 44 - Dados de $^{13}\text{C}$ dos compostos cloranfenicol (40), acetato (43), propanoato (44) e crotonato (48) de cloranfenicol .....	148

TABELA 45 - Dados de <sup>13</sup> C compostos decanoato (41), laurato (45), palmitato (47) e benzoato (46) de cloranfenicol .....	150
TABELA 46 - Resultados da acetilação enzimática com cloranfenicol .....	157
TABELA 47- Resultados da propanoilação enzimática com cloranfenicol .....	159
TABELA 48 - Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com crotonato de vinilo.....	160
TABELA 49 - Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com laurato de Vinilo .....	161
TABELA 50 - Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com benzoato de Vinilo .....	163
TABELA 51 - Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com benzoato de vinilo à 40° e 60° .....	164
TABELA 52 - Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com benzoato de vinilo e anidrido benzóico .....	165
TABELA 53 - Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com palmitato de Vinilo .....	166
TABELA 54 - Resultados das reações de acilação com acetato e propanoato de vinilo à maior concentração.....	168
TABELA 55 Resultados das reações de acilação com crotonato e benzoato de vinilo à maior concentração .....	170
TABELA 56 - Resultados das reações de acilação com decanoato, laurato e palmitato de vinilo à maior concentração .....	171
TABELA 57 - Fontes vegetais utilizadas no screening para o estudo de biocatálise .....	182
TABELA 58 – Condições gerais de separação das cetonas aromáticas e resolução dos álcoois por CG-FID ou CLAE .....	189
TABELA 59 - Condições empregadas nas reações químicas com cloretos de ácido para obtenção dos derivados de cloranfenicol .....	195
TABELA 60 - Solventes utilizados nas cromatografias de separação dos produtos das reações químicas para obtenção dos derivados de cloranfenicol e seus pesos ...	195
TABELA 61 - Condições de separação em CLAE dos derivados de cloranfenicol...	197

## LISTA DE SIGLAS

$\mu$	Momento de dipolo elétrico
Acetil-CoA	Acetil- Coenzima A
AcOEt	Acetato de Etila
ADH	Álcool Desidrogenase
ATP	Adenosina Trifosfato
BCA	Ácido Bicincônico
CAL-A	Lipase de <i>Candida Antarctica</i> do tipo A
CAL-B	Lipase de <i>Candida Antarctica</i> do tipo B
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD <sub>3</sub> CN	Acetonitrila deuterada
CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub>	Acetona deuterada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CENAUREM	Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear
CG	Cromatografia Gasosa
CG	Cromatografia Gasosa
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CG-DIC	Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Ionização de Chamas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrila
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
D	Debye
DCC	DiCicloexilcarbodiimida
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAP	N,N-Dimetil-aminopiridína
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
EDTA	Ácido Tetracético etilenodiamino
ee	excesso enantiomérico

EM	Espectrometria de Massa
FM	Fórmula Molecular
Hz	Hertz
IPA	Isopropanol
IV	Infravermelho
J	Constante de Acoplamento
KBr	Brometo de Potássio
LiAlH <sub>4</sub>	Hidreto de Alumínio de Lítio
Log P	Logaritmo do Coeficiente de Partição
MeOH	Metanol
N(Et) <sub>3</sub>	Trietil-amina
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
NaBH <sub>4</sub>	Borohidreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
ppm	Partes por milhão
PSL-C (I)	<i>Pseudomonas cepacia</i> do tipo I
PSL-C Amano	<i>Pseudomonas cepacia</i> do tipo Amano
QEEL	Química Especializada Erich LTDA
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido desoxiribonucléico
RPM	Rotações por minuto
TBME	Ter-butil-metil-éter
THF	Tetrahidrofurano
UV-Vís	Ultra-violeta e no Visível
δ	Deslocamento Químico
ε	Constante Dielétrica



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
2	CONSIDERAÇÕES SOBRE CLORANFENICOL .....	34
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	40
3.1	Enzimas.....	42
3.1.1	<i>Oxidoreduases – aspectos gerais</i> .....	44
3.2	Biocatálise e sistemas de biocatálise .....	46
3.3	Reações biocatalisadas por enzimas de vegetais .....	48
3.3.1	<i>Hidroxilação</i> .....	48
3.3.2	<i>Oxidação</i> .....	51
3.3.3	<i>Hidrogenação da dupla C=C</i> .....	55
3.3.4	<i>Hidrólise</i> .....	56
3.3.5	<i>Glicosilação</i> .....	57
3.3.6	<i>Descarboxilação</i> .....	58
3.3.7	<i>Produção de cianohidrinás</i> .....	59
3.3.8	<i>Redução</i> .....	62
3.4	Lipases – aspectos gerais .....	67
3.5	Lipases – mecanismo de atuação .....	69
3.6	Propriedades das lipases .....	70
3.6.1	<i>Efeitos de pH e temperatura</i> .....	71
3.6.2	<i>Tipos de reação que catalisam</i> .....	72
3.6.2.1	<i>Acidólises</i> .....	72
3.6.2.2	<i>Aminólises</i> .....	73
3.6.2.3	<i>Hidrólises</i> .....	73
3.6.2.4	<i>Transesterificação</i> .....	74
3.6.2.5	<i>Interesterificação</i> .....	74
3.6.2.6	<i>Esterificação</i> .....	75
3.6.3	<i>Substratos</i> .....	76
3.6.4	<i>Estabilidade em solventes orgânicos</i> .....	77
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.1	Procedimentos realizados com células íntegras .....	81
4.1.1	<i>Screening de espécies vegetais</i> .....	81

4.1.2	<i>Determinação do teor de proteínas</i> .....	82
4.1.2.1	<i>Método de Lowry</i> .....	83
4.1.2.2	<i>Método de Bradford</i> .....	87
4.2	<b>Seleção dos vegetais e obtenção dos extratos aquosos</b> .....	90
4.3	<b>Screening de Feijões</b> .....	90
4.3.1	<i>Reações em meio aquoso</i> .....	90
4.3.2	<i>Reações em tampão fosfato</i> .....	93
4.4	<b>Preparo de padrões via química</b> .....	94
4.5	<b>Reações de Biorredução</b> .....	98
4.5.1	<i>Reações de biorredução com F-1</i> .....	98
4.5.2	<i>Reações de biorredução com F-2</i> .....	100
4.6	<b>Otimização de biorredução de acetofenona</b> .....	103
4.6.1	<i>Biorredução de acetofenona com variação de co-solvente</i> .....	107
4.6.2	<i>Biorredução de acetofenona com variação de solvente/biocatalisador</i> .....	108
4.7	<b>Redução química de cetonas e nitrocompostos</b> .....	110
4.7.1	<i>Derivados de acetofenona</i> .....	111
4.7.2	<i>Nitrocompostos</i> .....	120
4.8	<b>Biorreduções</b> .....	122
4.8.1	<i>Cetonas aromáticas com grupos ativantes</i> .....	122
4.8.1.1	<i>Metoxilados</i> .....	122
4.8.1.2	<i>Alquilados</i> .....	124
4.8.2	<i>Cetonas aromáticas com grupos desativantes</i> .....	125
4.8.2.1	<i>Halogenados</i> .....	125
4.8.2.2	<i>Nitrados</i> .....	126
4.8.3	<i>Nitrocompostos</i> .....	128
4.8.4	<i>Compostos alifáticos e <math>\beta</math>-ceto-ésteres</i> .....	131
4.8.5	<i>Redução de uma cetona <math>\alpha,\beta</math>-insaturada</i> .....	132
4.9	<b>Procedimento realizado com lipases comerciais</b> .....	133
4.9.1	<i>Screening de enzimas</i> .....	134
4.9.2	<i>Otimização das condições reacionais</i> .....	136
4.9.2.1	<i>Variação de solvente</i> .....	137
4.9.2.2	<i>Variação de temperatura</i> .....	140
4.10	<b>Obtenção dos padrões químicos</b> .....	144
4.10.1	<i>Obtenção dos padrões com cloretos de ácido</i> .....	144

4.10.2	<i>Obtenção de padrões via metodologia enzimática</i> .....	146
4.10.3	<i>Obtenção dos padrões di-crotonato e di- palmitato de cloranfenicol</i> .....	147
4.11	Caracterização dos derivados por RMN <sup>13</sup> C .....	147
4.12	Separação dos compostos através de CLAE .....	151
4.13	Curvas de calibração .....	154
4.14	Reações de acilação com diferentes doadores acila .....	157
4.14.1	<i>Obtenção enzimática do acetato de cloranfenicol</i> .....	157
4.14.2	<i>Obtenção enzimática do propanoato de cloranfenicol</i> .....	158
4.14.3	<i>Obtenção enzimática do crotonato de cloranfenicol</i> .....	159
4.14.4	<i>Obtenção enzimática do laurato de cloranfenicol</i> .....	161
4.14.5	<i>Obtenção enzimática do benzoato de cloranfenicol</i> .....	162
4.14.6	<i>Obtenção enzimática do palmitato de cloranfenicol</i> .....	166
4.15	Reações de acilação a uma maior concentração .....	168
4.15.1	<i>Acilações com acetato e propanoato de vinilo</i> .....	168
4.15.2	<i>Acilações com crotonato e benzoato de vinilo</i> .....	169
4.15.3	<i>Acilações com decanoato, laurato e palmitato de vinilo</i> .....	171
4.16	Reação com palmitato de vinilo à 0,25M e acetato de vinilo à 0,15M.....	173
4.17	Reciclagem enzimática .....	173
4.18	Reações em escala de bancada .....	175
5	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	177
5.1	<b>Material Utilizado</b> .....	177
5.2	<b>Métodos Cromatográficos</b> .....	177
5.2.1	<i>Cromatografia em Camada Delgada</i> .....	177
5.2.2	<i>Cromatografia em Coluna por Adsorção</i> .....	178
5.2.3	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i> .....	178
5.3	<b>Métodos de Análise</b> .....	178
5.3.1	<i>Espectroscopia na Região de Infravermelho (IV)</i> .....	179
5.3.2	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e de Carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C)</i> .....	179
5.3.3	<i>Cromatografia Gasosa acoplada à detector por ionização de chamas (CG/DIC)</i> .....	179
5.3.4	<i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) ..</i>	180
5.3.5	<i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) de alta resolução</i> .....	180

5.3.6	<i>Rotação óptica</i>	180
5.3.7	<i>Ponto de fusão</i>	180
5.4	<b>Procedimento experimental para reações com células íntegras</b>	181
5.4.1	<i>Determinação de Proteínas</i>	181
5.4.2	<i>Obtenção dos extratos aquosos para determinação de proteínas</i>	181
5.4.3	<i>Método de Lowry</i>	182
5.4.4	<i>Método de Bradford</i>	183
5.5	<b>Screening de feijões</b>	184
5.5.1	<i>Reações com acetofenona, cloronitrobenzeno e benzoato de metila....</i>	184
5.5.2	<i>Reações em tampão fosfato</i>	185
5.6	<b>Preparo dos padrões via química</b>	185
5.7	<b>Reações de biorredução</b>	186
5.7.1	<i>Biorredução de acetofenona em diferentes condições reacionais</i>	186
5.7.1.1	<i>Variação da concentração do co-solvente</i>	186
5.7.1.2	<i>Variação da quantidade de solvente ou biocatalisador</i>	187
5.8	<b>Redução de cetonas</b>	187
5.8.1	<i>Redução química dos derivados de acetofenona</i>	187
5.8.2	<i>Redução de nitrocompostos</i>	188
5.8.3	<i>Biorredução</i>	188
5.9	<b>Métodos de separação</b>	188
5.10	<b>Procedimento experimental para reações com lipase comercial</b>	193
5.10.1	<i>Screening de enzimas e otimização de condições reacionais</i>	193
5.10.2	<i>Variação do solvente e temperatura</i>	194
5.11	<b>Obtenção dos Padrões Químicos</b>	194
5.11.1	<i>Obtenção dos padrões derivados de cloranfenicol com cloretos de ácido ..</i>	194
5.11.2	<i>Obtenção dos padrões via metodologia enzimática</i>	196
5.11.3	<i>Obtenção dos padrões di-palmitato e di-crotonato de cloranfenicol</i>	196
5.12	<b>Condições de separação dos compostos em CLAE</b>	197
5.13	<b>Curvas de calibração</b>	198
5.14	<b>Reações de acilação utilizando diferentes doadores acila</b>	198
5.14.1	<i>Reações com acetato de vinilo e propanoato de vinilo</i>	198
5.14.2	<i>Reações com benzoato de vinilo</i>	199
5.14.3	<i>Reações com laurato de vinilo e palmitato de vinilo</i>	199
5.15	<b>Aumento da concentração das reações de acilação</b>	200

<b>5.16</b>	<b>Reação de cloranfenicol com concentração de 0,25M .....</b>	<b>200</b>
<b>5.17</b>	<b>Reciclagem enzimática .....</b>	<b>200</b>
<b>5.18</b>	<b>Reações em grande escala .....</b>	<b>201</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>203</b>
<b>7</b>	<b>DADOS ESPECTROSCÓPICOS .....</b>	<b>207</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>216</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>229</b>

A detailed illustration of a fountain pen and an inkwell. The pen is silver with a black nib, resting on a matching silver tray. The inkwell is glass with a silver rim. The word "Introdução" is written in a large, elegant, black cursive font across the center of the scene.

# *Introdução*

*“Serei Pai para vós, e vós sereis para mim filhos e filhas, diz o Senhor Todo-Poderoso.”*

*II Co 6.18*

## 1. INTRODUÇÃO

A área multidisciplinar da biocatálise encontra-se atualmente em amplo e contínuo desenvolvimento. Pesquisas realizadas em vários segmentos da química, bem como da biologia, têm como principal objetivo a descoberta, assim como o desenvolvimento de novos catalisadores para uso industrial.

Biocatalisadores ou catalisadores biológicos são biomoléculas, especialmente proteínas, cuja principal função é catalisar reações nos organismos. Eles são utilizados em química orgânica como uma alternativa em processos químicos clássicos, por apresentarem inúmeras vantagens. Dentre estas, se destacam: elevada velocidade de reação, utilização de condições brandas, compatibilidade com substratos sintéticos, sendo que em alguns casos podem catalisar reações nos dois sentidos e ainda podem apresentar alguma seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam (PAQUES e MACEDO, 2006).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse na utilização de enzimas como biocatalisadores industriais na síntese de química fina, particularmente na produção de compostos quirais. Nos casos onde o desenvolvimento de uma transformação catalisada por uma enzima leva a uma viável aplicação em grande escala, o resultado bem sucedido vem de um esforço conjunto entre a pesquisa acadêmica e a indústria, o que representa um importante fator (NIDETZKY, 2007). Companhias que adquiriram conhecimentos em síntese assimétrica, atualmente apresentam grandes vantagens tecnológicas e industriais, comparadas com as que não se encontram capacitadas para a produção de compostos enantiomericamente puros.

Compostos opticamente ativos são úteis intermediários na síntese de fármacos, agroquímicos e cristais líquidos. A necessidade da síntese estereosseletiva de compostos opticamente ativos com atividade biológica é importante porque somente um isômero entre os muitos compostos opticamente ativos disponíveis possui a atividade biológica específica (GOTOR *et al*, 2008).

Enzimas isoladas, microorganismos como leveduras e fungos, culturas de células de plantas, bem como vegetais, têm sido usados como biocatalisadores em reduções assimétricas. Microorganismos e células de culturas de plantas são mais eficientes como biocatalisadores que enzimas isoladas porque células vivas providenciam um meio que inclui substratos, numerosas enzimas, cofatores e sistemas de regeneração de cofatores que facilitam as reações de biocatálise (MATSUDA *et al*, 2009).

Mas a obtenção e manutenção dessas células não é muito fácil. Portanto, outros tipos de biocatalisadores, como leveduras e vegetais também têm sido muito aplicados em síntese orgânica porque eles são facilmente disponíveis e de fácil manipulação (TAKEDA *et al*, 2011). Enzimas isoladas ou células íntegras, usadas como biocatalisadores, catalisam a redução estereosseletiva de cetonas pró-quirais com notável quimio-, regio- e estereosseletividade.

As biotransformações têm sido extensivamente estudadas porque são consideradas como importante método para conversão de compostos orgânicos baratos e abundantes, em caros e escassos (SHIMODA *et al*, 2007). Além disso, a área da biocatálise emergiu como uma ferramenta poderosa para a chamada ‘química ecologicamente correta’ ou *green chemistry*, a qual levará cada vez mais a processos industriais comprometidos com o controle ambiental (DE CONTI, 2001). Diante das questões de “tecnologia quiral” e da preocupação ambiental, mais intimamente relacionada a química verde, a biocatálise consiste em uma ferramenta muito importante na obtenção de compostos opticamente ativos. Como muitas enzimas mostram atividade frente a substratos não-naturais e em solventes orgânicos, elas estão sendo amplamente utilizadas em transformações sintéticas (HILL *et al*, 2007).

Nesse sentido a biocatálise, abrange uma grande variedade de metodologias e fontes de catalisadores, que podem ser aplicados das mais diversas formas em procedimentos químicos para obtenção de compostos enriquecidos ou enantiomericamente puros. Nesta perspectiva, pode-se inserir a biocatálise bem como as biotransformações, como áreas onde o catalisador é uma enzima que permite converter um substrato (composto orgânico) em um produto através de um número limitado de reações.

É uma área de grande importância na transformação de produtos naturais ou sintéticos, representando uma extensão das rotas clássicas de síntese com significantes reduções nos custos e impacto ambiental (PRADO, 2003; SHAW *et al*, 2003). As biotransformações exploram propriedades únicas dos biocatalisadores, a saber de sua estereosseletividade e regioespecificidade e sua habilidade para conduzir reações em condições suaves de pH e temperatura. Elas podem ser usadas para conduzir específicas conversões de substratos complexos usando plantas, células de plantas, de animais ou microbianas, ou ainda enzimas purificadas como biocatalisadores. Elas tem um grande potencial para gerar novos produtos ou para produzir produtos conhecidos de forma eficiente (GIRI *et al*, 2001).

Entre as vantagens em se utilizar enzimas isoladas puras ou parcialmente purificadas estão a alta especificidade, maior produtividade e facilidade de isolamento dos produtos, embora os fatores relacionados a custo, disponibilidade da enzima e inexistência de



sistemas apropriados de regeneração de cofatores para determinadas classes enzimáticas possam inviabilizar sua aplicação. Por outro lado, processos que utilizam células íntegras em geral são de baixo custo e especialmente interessantes para aplicação em sistemas dependentes de cofator, pois a própria célula possui a maquinaria para promover a regeneração. Entretanto, a ocorrência de reações paralelas, resultantes do metabolismo celular, reversibilidade e baixa tolerância a substratos e solventes orgânicos, inativando o sistema enzimático, pesam contra o uso de microorganismos vivos em biocatálise (OLIVEIRA *and* MANTOVANI, 2009).

Os compostos químicos que podem sofrer biotransformações mediados por enzimas de plantas são variados na natureza. Essas reações incluem as mais diferentes moléculas, entre elas: compostos aromáticos, esteróides, alcalóides, cumarinas, terpenóides, lignanas dentre outras. As reações que envolvem os processos de biotransformação de compostos orgânicos catalisados por enzimas presentes em plantas incluem: hidroxilação, oxidação, redução, hidrogenação, glicosilação e hidrólises. Exemplos dessas reações são apresentadas no capítulo de levantamento bibliográfico.

A razão para a seletividade observada na atividade enzimática nas reações que elas catalisam, se deve ao controle do meio em que essas reações ocorrem. Por outro lado, processos designados como químicos, se transmitirem alguma seletividade, são capazes de fazê-lo baseado principalmente nas propriedades eletrônicas em vez das propriedades estéricas dos reagentes e não no meio reacional. As enzimas limitam um número de sítios reativos de substratos pela eliminação ao acesso de reagentes, possibilitando a interação com apenas um grupo funcional. As reações são seletivas baseadas nas diferentes velocidades de grupos funcionais com o reagente introduzido no meio reacional, é a chamada compatibilidade de grupo funcional ou quimioseletividade (HUDLICKY *and* REED, 2009).

Dentre as características mais importantes no comportamento das enzimas encontra-se a enorme especificidade e velocidade das reações que promovem. A natureza quiral das enzimas resulta na formação de produtos de maneira altamente estereo- e regioseletiva. A capacidade de atuar a temperaturas brandas, condições neutras e aquosas, além do elevado número de ciclos catalíticos, chama a atenção para o uso de enzimas em síntese química. Os biocatalisadores permitem a biotransformação de compostos polifuncionalizados e sensíveis em condições amenas, ao contrário das variantes químicas correspondentes que exigem condições reacionais severas. Muitas enzimas conseguem promover a biotransformação de vários substratos em produtos dificilmente obtidos por rotas

químicas ou ainda atuar em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis (OLIVEIRA *and* MANTOVANI, 2009).

Dentre as enzimas utilizadas em biocatálise, as lipases têm sido comumente utilizadas como catalisadores viáveis em síntese orgânica. Possuem um amplo espectro de atividade com diversos substratos, catalisando desde reações hidrolíticas em sistemas não-aquosos, como também a formação de ésteres a partir de doadores acila e alcoóis. Elas não necessitam de coenzima e uma grande variedade delas é comercialmente disponível na forma livre ou imobilizada. A maioria delas aceita diferentes substâncias como substratos e por isso possuem versátil aplicação em síntese orgânica, exibindo em muitos casos entre boa e excelente estereoseletividade e regioseletividade (GHANEM *and* ABOUL-ENEIN, 2005).

A utilização de enzimas, principalmente lipases, para a síntese de fármacos quirais está bem estabelecida desde alguns anos, e atualmente biotransformações são aceitas como uma metodologia comum para a preparação de fármacos quirais. Ao longo dos últimos anos, processos interessantes surgiram utilizando hidrolases, liases, oxidoredutases como biocatalisadores. No entanto, o uso de lipases em solventes orgânicos revela uma excelente metodologia para o preparo de fármacos enantiomericamente puros, seja por hidrólise enzimática, reações de transesterificação ou aminólise (GOTOR-FERNANDEZ *et al*, 2006a).

Nos últimos anos há uma tendência crescente na busca de obtenção de medicamentos quirais na forma de um único estereoisômero ao invés da mistura racêmica ou um enantiômero instável. A mais simples razão para o desenvolvimento de compostos estereoquimicamente puros está na diferença de atividade biológica, apresentada em muitos casos em apenas um enantiômero do composto quiral. Nesse contexto a biocatálise representa uma excelente estratégia para o preparo de fármacos (GOTOR, 2002).

Entre os métodos de introdução de novos fármacos na terapêutica, os processos de modificação molecular são os mais promissores. Entre eles, merece realce a latenciação, transformação do fármaco em forma de transporte inativo que, *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Uma das formas latentes obtidas mediante este processo denomina-se pró-fármaco (CHIN *e* FERREIRA, 1999).

Em 1958, Adrien Albert definiu pró-fármacos como qualquer composto que sofre biotransformação antes de exibir seus efeitos farmacológicos. Uma definição expandida considera um pró-fármaco como um fármaco ativo, quimicamente transformado em um derivado inativo, que é convertido por um ataque químico ou enzimático ou de ambos no fármaco matriz no organismo, antes ou após alcançar seu local de ação (CHIN *et al*, 2005).

A latenciação de fármacos é um processo de modificação molecular que proporciona melhorias às substâncias terapêuticas, alterando características diversas como: propriedades organolépticas, farmacocinéticas, toxicológicas, posológicas e farmacológicas. (NEVES, 2004).

Em 1959, Harper propôs o termo *latenciação* de fármacos para o processo de obtenção de pró-fármacos. Entretanto, somente em meados da década de 70, quando pesquisadores começaram a traçar os destinos dos fármacos no organismo, compreendendo melhor a absorção, metabolismo, distribuição e excreção, o planejamento de fármacos utilizando o processo de latenciação tomou rumo mais definido. Vários outros termos, tais como fármaco latente, derivados biorreversíveis, conjugados fármaco-transportador biolábil ou congêneres, foram utilizados como sinonímia para pró-fármaco. Este foi posteriormente padronizado e definido como derivado química e farmacologicamente inativo da molécula matriz, que requer transformação no organismo para liberar o fármaco ativo (CHIN, 1999).

Os pró-fármacos promovem a melhoria da atividade terapêutica por aumento de biodisponibilidade, diminuição da toxicidade, prolongamento da ação, aumento da seletividade, mediante a escolha de transportador adequado, geralmente de caráter lipofílico. Estes pró-fármacos são menos ativos *per se* ou inativos quando comparados à molécula matriz e devem sofrer reação hidrolítica (química ou enzimática) para liberar a porção ativa.

Esse trabalho descreve um projeto de biocatálise executado em duas vertentes: a primeira utilizando células íntegras da espécie vegetal *Vigna unguiculata* na biorredução de diferentes cetonas e nitrocompostos. A outra vertente abrange processos de acilação do fármaco cloranfenicol biocatalisado por enzimas comerciais e diversos agentes acilantes.

Para as reações com células íntegras, foi desenvolvida uma metodologia para de reações de redução de compostos orgânicos realizadas através da biocatálise utilizando principalmente como biocatalisador a espécie *Vigna unguiculata*, conhecida popularmente como feijão de corda.

*Vigna unguiculata*, (L.) walp, é também conhecida como feijão de corda ou feijão caupi e constitui uma das principais culturas em diversas regiões semi-áridas do mundo. No Nordeste brasileiro, onde é cultivado tanto para suprir as necessidades básicas dos agricultores quanto em escala comercial, o feijão comum e o caupi ocupam grande parte da área cultivada, assumindo grande importância social e econômica, principalmente, para as camadas mais carentes da população (FILHO *and* TAHIN, 2002).

Constitui-se uma das principais culturas alimentares desta região e também do Oeste da África (FROTA *et al*, 2008). Dentre os diferentes produtos agrícolas encontrados nas

regiões tropicais, o caupi se destaca pelo alto valor nutritivo, além do baixo custo de produção. É amplamente cultivado pelos pequenos produtores, constituindo um dos principais componentes da dieta alimentar, especialmente na zona rural (EMBRAPA MEIO NORTE, 2008).

Em termos mundiais, a área ocupada com feijão caupi é de cerca de 12,5 milhões de ha, com 8 milhões (64% da área mundial) na parte oeste e central da África e o restante nas Américas do Sul e Central, e na Ásia. Os principais produtores mundiais são Nigéria e Brasil. No Brasil, o feijão caupi é cultivado predominantemente no sertão semi-árido da região Nordeste e em pequenas áreas na Amazônia. (FROTA *et al*, 2008). Esta leguminosa constitui importante fonte de proteínas (23 a 25% em média) e carboidratos, destacando-se pelo alto teor de fibras alimentares, vitaminas e minerais, além de possuir baixa quantidade de lipídios que, em média, é de 2% (EMBRAPA MEIO NORTE, 2008). As figuras 1 – 2 apresentam as fotos desta leguminosa, bem como de seus grãos.

FIGURA 1 – Partes aéreas de *Vigna unguiculata*



Fonte: elaborada pelo próprio autor

FIGURA 2 – Grãos de *Vigna unguiculata*



Fonte: elaborada pelo próprio autor

As reações que utilizaram essa espécie como fonte de biocatalisador, foram realizadas com os mais diversos tipos de substratos, utilizando a acetofenona como modelo para obtenção das melhores condições reacionais. Depois de encontradas as condições mais adequadas para biorredução com essa espécie, estas foram estendidas a diferentes substratos, incluindo derivados de acetofenona com diferentes tipos de substituintes (nitratos, alquilados, metoxilados, halogenados), entre os demais, incluem-se cetonas alifáticas, compostos nitrogenados, bem como, um  $\beta$ -ceto-éster.

Para as reações que utilizaram as enzimas comerciais realizou-se a síntese de sete ésteres do fármaco cloranfenicol (acetato, propanoato, crotonato, benzoato, decanoato, laurato e palmitato) através de metodologias química e enzimática. Destaca-se dentre os produtos gerados, o palmitato de cloranfenicol, que é o seu pró-fármaco.

O cloranfenicol é um antibiótico natural com amplo espectro de atividade antimicrobial. É principalmente empregado na medicina veterinária no tratamento de infecções urinárias e outras doenças causadas por bactérias. Por outro lado, a terapia humana usando cloranfenicol é limitada a algumas infecções, como febre tifóide e meningite bacteriana, em que os benefícios da droga superam os riscos de potencial toxicidade, o qual pode causar algumas discrasias sanguíneas. Ele pode ser administrado oralmente, usualmente como o 3-O-palmitato que é insolúvel em água ou por via intravenosa como o inativo 3-O-succinato. Ambos esses derivados são rapidamente hidrolizados *in vivo* para a droga biologicamente ativa (OTTOLINA *et al*, 1990). Ele apresenta sabor amargo, dificilmente mascarado em preparações orais. Entretanto, o fármaco torna-se insípido quando transformado em éster palmitato, sendo este hidrolisado pelas esterases intestinais que liberam a porção ativa do fármaco no organismo (DAUGS, 2000).

Na metodologia adotada nesta parte do trabalho foram utilizadas enzimas produzidas por *Candida antarctica* e *Pseudomonas cepacia*, buscando-se as melhores condições reacionais. Fez-se uma comparação entre a metodologia utilizada na indústria e a enzimática, podendo-se estabelecer padrões comparativos e dessa maneira, permitindo uma análise da técnica empregada. Foram adotados vários procedimentos nas reações de obtenção dos derivados, sendo avaliados parâmetros como solvente, temperatura, tipo de lipase e tempo reacional. Desta forma, foram estabelecidas as melhores condições para a obtenção dos ésteres. Há um enfoque especial na otimização das condições de reação, incluindo o protocolo sintético, escalado das reações e resultados de reciclagem da enzima.

*Considerações  
sobre  
Cloranfenicol*

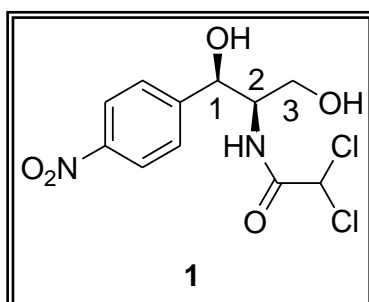
*“Recomenda ao Senhor tuas obras e  
teus projetos se realizarão.”*

*Ps 16, 3*

## 2. CONSIDERAÇÕES SOBRE CLORANFENICOL

Cloranfenicol, de nomenclatura D-(-)-*threo*-(1*R*,2*R*)-2',2'-dicloro-N-[1,3-dihidroxi-1-(4-nitrofenil)propan-2-il] acetamida (1, Figura 3), também chamado cloromicetina, é um antimicrobiano bacteriostático, que atua como um agente eficaz contra diversos tipos de organismos gram-positivos e gram-negativos (REBSTOCK *et al*, 1949).

FIGURA 3 – Estrutura de cloranfenicol (1)

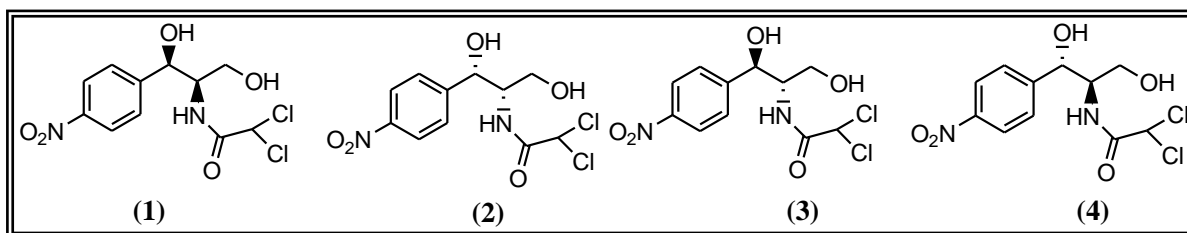


Foi introduzido para o tratamento clínico em humanos e animais em meados do século 20, e sua primeira indicação foi para o tratamento da febre tifóide. Felizmente, a sua eficácia no tratamento da cólera resistente a tetraciclina, abscessos cerebrais causados por estafilococos, meningite, gripe, pneumonia e infecções diversas, tem sido efetivamente demonstrada ao longo dos anos (EL-WAHED *et al*, 2008).

Trata-se de um composto bastante conhecido e com um amplo espectro de atividade antibiótica, o qual foi isolado pela primeira vez em 1947 do microorganismo *Streptomyces venezuelae* coletado em uma amostra de solo da Venezuela. Neste mesmo ano foi empregado em um surto de tifo epidêmico na Bolívia e num surto de tifo exantemático na Península Malaia, ambos com resultados extraordinários (DEL FIOLE and AVALLONE, 2005). Dois anos depois se relatava a primeira síntese química deste composto por pesquisadores do Laboratório de Parke, Davis e colaboradores (REBSTOCK *et al*, 1949).

É usado principalmente no tratamento de febre tifóide, desintérias e infecções bacterianas oculares. Apresenta quatro formas isoméricas distintas (figura 4), sendo ativo somente aquele com configuração D-(-)-*threo*, o qual foi provavelmente o primeiro antibiótico a ser produzido na forma opticamente ativa por síntese química ao invés de utilizar técnicas de fermentação (BHASKAR *et al*, 2004b).

FIGURA 4 – Formas estereoisoméricas de cloranfenicol



Desde sua descoberta, teve seu uso de maneira fortemente crescente. As salmonelas são geralmente sensíveis e os principais agentes causadores da meningite na infância (*H. influenzae* e *N. meningitidis*) apresentam grande sensibilidade, o que fez com que seu uso aumentasse muito para o tratamento da meningite do neonato (DEL FIOLE and AVALLONE, 2005). Tem como indicações clínicas primárias, as infecções causadas por salmonelas, como a febre tifóide (ACKERS *et al*, 2002), infecções graves como meningite, epiglote ou pneumonia causada por *H. influenzae* (ALMEIDA-GONZÁLEZ *et al*, 2004), infecções meningocócicas ou pneumocócicas do sistema nervoso central (HERNANDEZ *et al*, 2003) e na brucelose (HIRINCHSEN *et al*, 2002).

Por outro lado, este antibiótico também pode produzir efeitos colaterais, como anemia aplástica, supressão da medula óssea, leucemia infantil, e síndrome do bebê cinzento, de modo que este composto requer prescrição médica (RONNING *et al*, 2006). Outros efeitos colaterais importantes que decorrem do uso do cloranfenicol são as alterações hematológicas que ele promove. O efeito hematológico mais importante é observado na medula óssea. O cloranfenicol, afeta o sistema hematopoiético de duas maneiras: através de um efeito tóxico relacionado com a dose, que se manifesta em forma de anemia, leucopenia ou trombocitopenia, e através de uma resposta idiossincrática manifestada por anemia aplástica, que, em muitos casos, leva a pancitopenia fatal. Esta última resposta não está relacionada com a dose. Esses efeitos não foram encontrados em bebês nascidos de mães que utilizaram o fármaco durante a gestação.

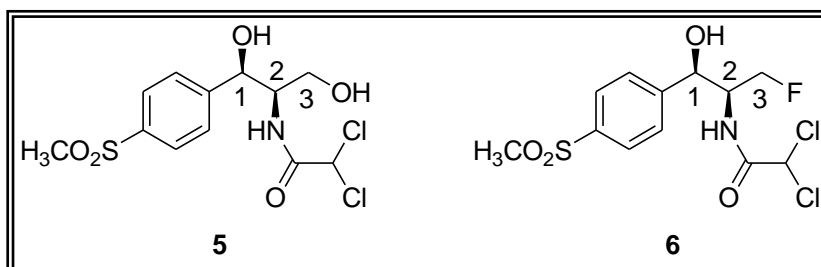
Embora a literatura não tenha encontrado qualquer alteração no desenvolvimento e na viabilidade fetal, é no recém-nascido que reside o maior problema deste fármaco. Apesar da potencialidade hematotóxica do cloranfenicol ser conhecida, não são descritos danos hematológicos em fetos nascidos de mães que utilizaram o fármaco, exceto pela ocorrência de anemia em conceitos de cães e camundongos fêmeas que receberam altas doses e por tempo prolongado durante a gravidez (DEL FIOLE and AVALLONE, 2005).



Com o aparecimento de agentes antimicrobianos mais seguros, o cloranfenicol é frequentemente considerado um antibiótico de menor interesse em virtude dos efeitos colaterais que apresenta. Todavia é útil em algumas situações como, em pessoas gravemente doentes nas quais as alternativas mais seguras se revelam menos eficazes ou, quando as alternativas não estão disponíveis. Continua, no entanto, a ser muito utilizado nos países de Terceiro Mundo, pelo fato de ser barato e eficaz em muitas infecções graves, e ainda em casos de outros antibióticos não apresentarem eficácia (CHEN *et al*, 2007).

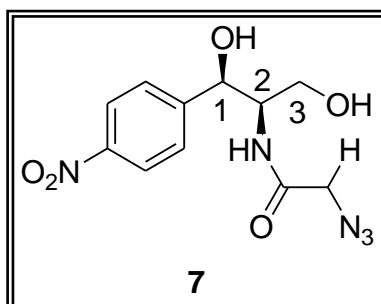
O cloranfenicol apresenta alguns compostos similares como tianfenicol (5) e florfenicol (6) – figura 5 - são todos antibióticos bactericidas de largo espectro. O tianfenicol é estruturalmente semelhante ao cloranfenicol diferindo deste pela presença de um grupo sulfometilo em vez do grupo *p*- nitro. O florfenicol é um análogo do tianfenicol e contém um átomo de flúor em vez de um grupo hidroxila no carbono 3. A substituição nesta posição reduz o número de locais disponíveis para acetilação bacteriana, possivelmente tornando o antibiótico mais resistente à inativação. Tanto o uso de tianfenicol como o de florfenicol está aprovado na União Europeia para gado, ovelhas, porcos e galinhas. Em aviários é prática comum administrar estes antibióticos através da água dos animais (SWITALA *et al*, 2007).

FIGURA 5 – Estruturas de tianfenicol (5) e florfenicol (6)



O cloranfenicol e alguns dos seus derivados, como o tianfenicol e azidanfenicol (7) – figura 6 - têm sido utilizados ao longo dos anos na medicina humana.

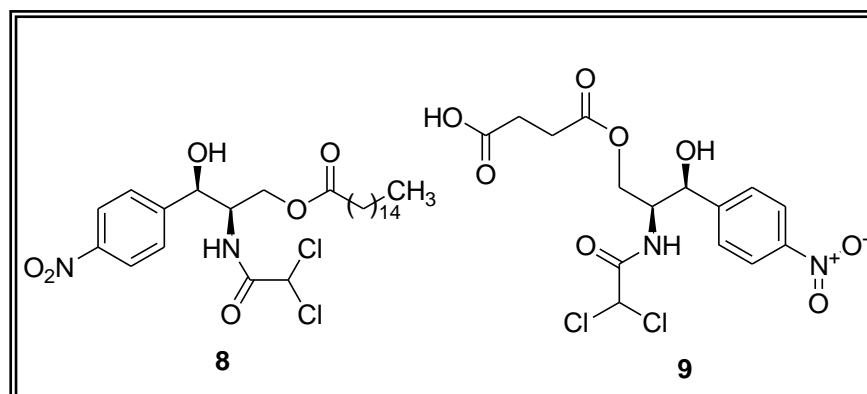
FIGURA 6 – Estrutura de Azidanfenicol (7)



Existem atualmente várias maneiras para administração desta droga, por exemplo, cápsulas, forma oleosa ou líquida, mas seu gosto amargo levou à indústria farmacêutica à produção de diferentes alternativas, tais como os derivados ésteres palmitato ou succinato, oriundos da modificação seletiva do grupo hidroxila primária.

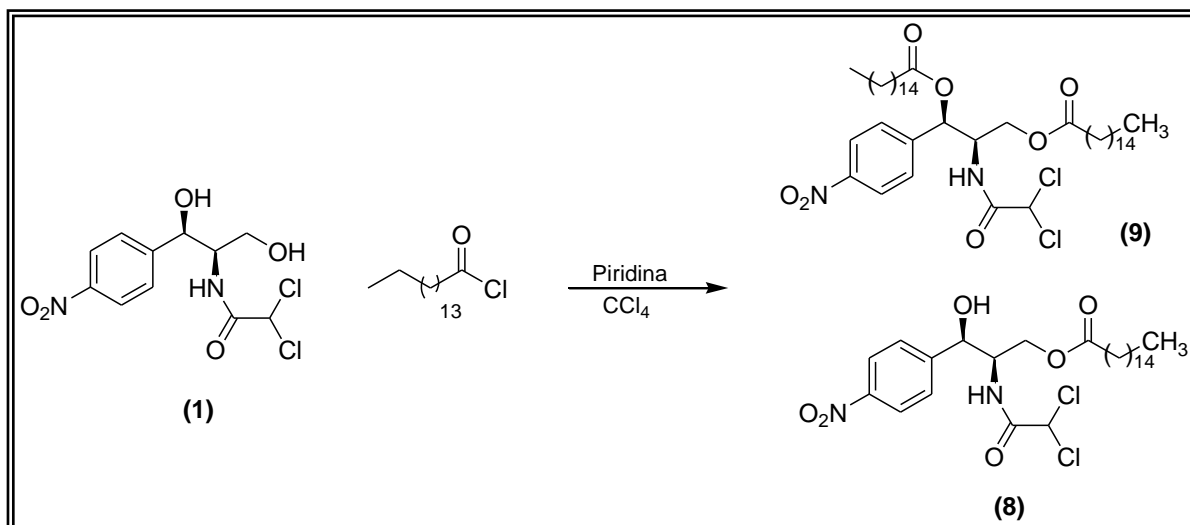
Alguns ésteres do cloranfenicol como o palmitato (8) ou succinato de cloranfenicol (9) – figura 7 - têm sido produzidos para aplicações terapêuticas. Não exibem atividade anti-microbiana até o cloranfenicol ser libertado após a hidrólise por esterases. O succinato de cloranfenicol mostra boa solubilidade na água e é por este motivo utilizado para aplicações parenterais. O azidamfenicol só é utilizado em gotas oculares (SCHWARZ *et al*, 2004).

FIGURA 7 – Estruturas de Palmitato (8) e Succinato (9) de cloranfenicol



Palmitato de cloranfenicol (8) é um derivado inerte que é hidrolisado no intestino para o antibiótico cloranfenicol e é usado para evitar seu o gosto amargo. A seletiva esterificação do grupo hidroxila primário é um ponto crítico da reação para obtê-la em bom rendimento e um produto de qualidade. O método geral reportado para o seu preparo usa cloreto de palmitoíla e piridina em tetracloreto de carbono ou dicloroetano (EL-SHAFIE, 1979), o esquema encontra-se na figura 8. A sua produção pela Aventis pharmaceutical localizada em Gerassio, Itália, usa cloreto de palmitoila, piridina e cloreto de metileno.

FIGURA 8 – Esquema reacional de obtenção química de palmitato de cloranfenicol (8)



Daugis (2000) desenvolveu uma metodologia de produção de palmitato de cloranfenicol com uso de tolueno como solvente e o compara com o processo industrial e os resultados são similares. No processo de produção o palmitato foi isolado por uma série de lavagens com água da solução de cloreto de metileno e o solvente foi removido por destilação e substituído por xileno. A solução de tolueno foi lavada antes com água e resfriamento para recristalização e centrifugação. Há relato ainda da formação de sub-produtos da reação, compostos di-acilados ou acilado na hidroxila 1.

Até o ano de 1974, existiam apenas 3 rotas sintéticas para a produção de cloranfenicol, de acordo com Veeresa (1998). Atualmente existem na literatura vários outros procedimentos para a produção química deste fármaco (BORUWA *et al*, 2005; GEORGE *et al*, 2006; WULFF and LONCARIC, 2001; BHASKAR *et al*, 2004b; SONTAKKE *et al*, 2005; HAJRA *et al*, 2006).

Também se encontra reportada na literatura o uso de lipases de diferentes linhagens para obtenção de diversos derivados de cloranfenicol. Ottolina e colaboradores (1990) utilizaram diversas lipases em reações de transesterificações, para obtenção de ésteres de cloranfenicol. As lipases utilizadas são oriundas de fungos ou bactérias, e são comerciais, sendo utilizadas em grande quantidade com relação ao substrato, na proporção de 10 vezes. As reações ocorrem com temperaturas de 45°C-75°C e duração de 18-96 horas a depender do éster metílico e temperatura utilizados. São descritas conversões entre 60-99% a depender das condições reacionais. Em alguns dos casos, observa-se a obtenção dos derivados di-acilados.



# *Revisão Bibliográfica*

*“As veredas de Javé são todas amor e  
verdade para os que guardam sua aliança  
e seus preceitos.”*

*Sl 25,10*

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Historicamente, a catálise biológica tem sido usada pela humanidade por milhares de anos, desde que a fermentação foi descoberta como um processo para fabricação de cerveja e pão no antigo Egito. Mas foi somente a partir do século 19 d.C, que os cientistas abordaram essa questão para investigar qual o fator responsável pelo processo de fermentação, se havia a participação de alguma espécie viva ou substância química. Em 1897, Eduard Buchner depois de algumas observações realizadas em processo fermentativos por leveduras de pão, propôs que a espécie por ele chamada de “zymase” encontrada nas leveduras, era a responsável pela fermentação. A seletividade da catálise enzimática foi reconhecida em 1984 por Emil Fischer, que deduziu que as enzimas eram moléculas assimetricamente construídas, e que elas interagem como uma “chave-fechadura” na molécula onde atuavam. O reconhecimento da catálise biológica mediada por enzimas anunciava o crescimento da bioquímica e a elucidação de vias metabólicas catalizadas por enzimas (BUGG, 2004).

As enzimas têm sido utilizadas desde muitos anos, e em diferentes formas, como extratos obtidos a partir de vegetais, animais ou micróbios. Desde sua descoberta, tem sido desenvolvido um extensivo estudo sobre as fontes e aplicações dessas enzimas. O setor de biotecnologia industrial experimentou um maior avanço a partir da compreensão de como as enzimas podem ser exploradas comercialmente.

Um grande número de enzimas têm sido produzidas e comercializadas por vários processos e o setor industrial de enzimas e suas aplicações é hoje um dos maiores geradores de receita no setor ciência-indústria da vida. De acordo com estudos realizados pela Global Industry Analysts Inc., o mercado mundial de enzimas deverá exceder \$ 2.9 bilhões até 2012 e os maiores produtos desse segmento incluem carboidratases, proteases e lipases ( SANGEETHA *et al*, 2011).

Dentre todas as enzimas, as lipases são as mais importantes. Elas são usadas na maioria dos campos mencionados para aplicação de enzimas. O principal interesse nas lipases se dá principalmente por suas propriedades em termos de enantiosseletividade, regioseletividade e ampla variedade de substratos.

Grande parte do interesse pelas biotransformações deve-se à habilidade de se catalisar reações com regio-, quimio- e estereosseletividade, aliada a outros fatores como a utilização de solventes aquosos, biodegradabilidade e a não necessidade de proteção de alguns grupos funcionais. A união destes fatores representa uma alternativa sintética bastante viável e

dentro dos princípios da química verde. Este ramo da Química tem despertado o interesse de pesquisadores e pode ser definido como a utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzem ou eliminam o uso de solventes e reagentes ou geração de produtos e subprodutos tóxicos, que são nocivos à saúde humana e ao ambiente (HANSON, 1997).

Atualmente, os processos mais estudados em reações enzimáticas utilizam bactérias e fungos, mas também são relatados ensaios com enzimas isoladas e mais recentemente com células íntegras. O uso de células íntegras é relacionado com a utilização da biomassa (VILELA *et al*, 2000) da fonte enzimática nas reações em questão. Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil (FABER, 2000).

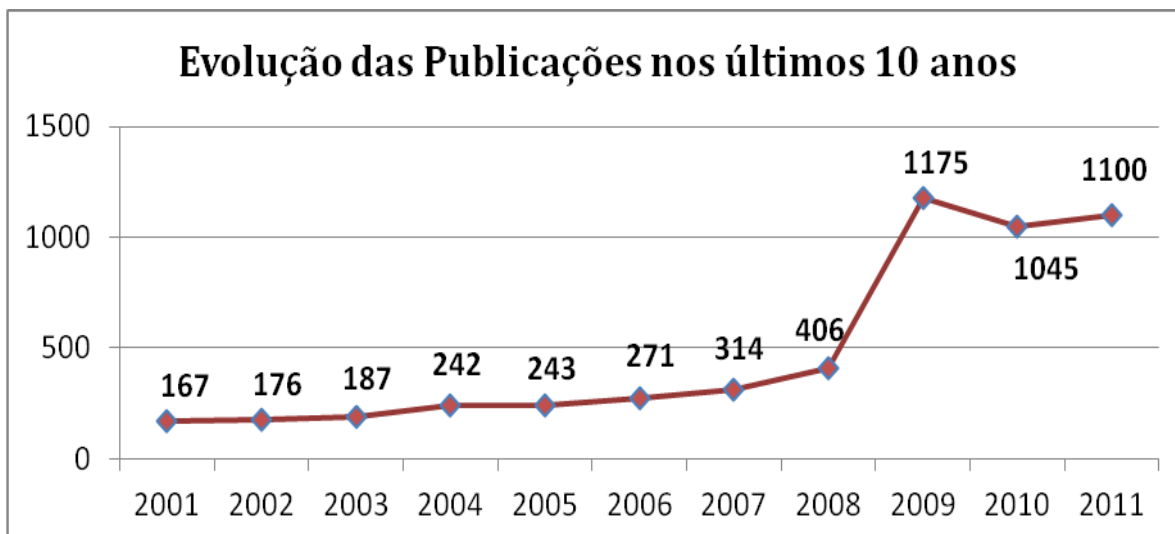
O uso de vegetais em reações de biocatálise, mesmo com todos os avanços e investigações já realizados até o momento, ainda é um campo muito novo visto a enorme diversidade de espécies vegetais existentes e ao pequeno número de espécies investigadas.

Biotransformações usando células de plantas são consideradas como uma importante ferramenta para modificação estrutural de moléculas a fim de produzirem compostos com propriedades únicas. As principais reações envolvendo biotransformações: oxidações, reduções, hidroxilações, metilações, acetilações, isomerizações, glicosilações e esterificações (GIRI *et al*, 2001). Sistemas de bioconversão que usam plantas podem ser usados sozinhos ou combinados em síntese orgânica.

A bioconversão realizada através de células de plantas e organismos, depende de uma variedade de fatores, incluindo a solubilidade dos precursores, a atividade das enzimas presentes, localização das enzimas, presença de sítios reacionais produzindo produtos indesejáveis e presença de enzimas que degradam os produtos.

Uma pesquisa feita com a palavra “biocatalisys” no ScinderFinder, para os últimos dez anos (2001-2011), encontrou um total de 5686 referências para este tema, correspondendo a aproximadamente 85,2% de todas as publicações feitas até então nesta linha de pesquisa. O gráfico apresentado na figura 9 mostra a evolução dessas publicações nos últimos 10 anos. Neste gráfico observa-se um crescimento significativo no número de publicações a partir de 2008 com uma relativa estabilização nos últimos anos. Talvez seja motivo para esse avanço a ampliação da pesquisa na busca por novas fontes de biocatalisadores, sendo possíveis de serem obtidos de meio animal, vegetal ou microbiano.

FIGURA 9 – Gráfico da evolução das publicações em biocatálise nos últimos dez anos



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

### 3.1 Enzimas

Enzimas constituem um grupo de substâncias orgânicas protéicas com atividade intra ou extracelular, as quais possuem funções catalíticas em reações químicas. Estas, sem a presença das enzimas ocorreriam a velocidades extremamente baixas. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas RNA catalíticas, todas as enzimas são proteínas e suas atividades dependem da integridade de sua conformação protéica original. Se uma enzima é desnaturada, dissociada em subunidades ou ainda quebrada em seus componentes aminoácidos, a atividade catalítica é normalmente perdida. Assim as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária são de fundamental importância para esta atividade (LEHNINGER, 2002).

As enzimas são classificadas e codificadas pela NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) de acordo com a reação catalisada. Elas dividem-se em seis classes principais (BOMMARIUS, 2004):

**Oxidoredutases:** São enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxi-redução. São as desidrogenases e as oxidases.

**Transferases:** Enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acila, carboxila, etc. Como exemplo, tem-se as quinases e as transaminases.

**Hidrolases:** Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente. Ex: lipases.

**Liases:** Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico. As desidratases e as aldolases são bons exemplos.

**Isomerases:** Catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos. Um exemplo são as epimerases.

**Ligases:** Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre à custa de energia (ATP). Exemplos são as sintetases e as carboxilases.

As enzimas possuem várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações, atuando como catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (FABER, 2000).

Relacionando reações orgânicas com a biocatálise, precisa-se definir o tipo de biocatalisador a ser utilizado. Uma comparação entre catalisadores químicos e enzimas por alguns autores revela que: enzimas "não são diferentes, apenas melhores". A gama de modelos de enzimas, prova que toda a ação enzimática pode ser explicada pela química racional e princípios físicos. Cada vez mais, um número maior de enzimas têm sido encontradas para catalisar as mais diversas reações em química orgânica (BOMMARIUS, 2004). A tabela 1 apresenta exemplos de uma série desse tipo de reações.

TABELA 1 – Reações orgânicas e as correspondentes enzimas que as catalisam em biotransformações

<b>Entrada</b>	<b>Reação Orgânica</b>	<b>Enzima</b>
1	Redução de Meerwein–Ponndorff–Verley	Álcool desidrogenase
2	Oxidação Oppenauer	Álcool desidrogenase
3	Oxidação de Baeyer–Villiger	Baeyer–Villiger Monooxigenase
4	Esterificação	Subtilisina
5	Transaminação	Aminotransaminase
6	Hidrólise	Lipase, esterase
7	Transesterificação	Subtilisina
8	Reação de Aldol	Aldolase
9	Decarboxilação( $\beta$ -eliminação)	L-asp. descarboxilase
10	Reação de Mannich	Triptofanase e $\beta$ -tirosinase
11	Reação de Diels–Alder	Diels–Alderase
12	Rearranjo de Claisen	Corismato mutase
13	Racemização	Mandelato racemase
14	Isomerização	Glucose isomerase



### 3.1.1 Oxidoreduções – aspectos gerais

O segundo grupo de enzimas mais utilizado compreende as oxidoreduções. Este grupo de enzimas é cofator-dependente. Neste caso a utilização de células íntegras ou de alternativas que permitam a regeneração de cofatores a partir dos subprodutos das reações são necessárias para viabilizar o custo na aplicação destas enzimas industrialmente. A regeneração do cofator também viabiliza o processo sintético geral e permite que a reação química se processe por completo, previne o acúmulo de subprodutos que venham a promover a inibição da enzima, facilita o tratamento da reação e promove o aumento da enantiosseletividade (OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009).

As oxidoreduções catalizam reações redox, portanto há transferência de elétrons de/ou para o substrato. A redução de cetonas por exemplo, são catalisadas por álcool-desidrogenases, que também podem ser referidas como carbonil-redutases ou ceto-redutases. Entretanto, os álcoois também podem ser obtidos por oxidação das ligações C-H por monooxigenases (GOLDBERG *et al*, 2007).

A classe das oxidoreduções constitui-se de enzimas que requerem a presença de cofator para exibir sua atividade catalítica. A tabela 2 apresenta alguns dos cofatores requeridos por algumas enzimas para alguns tipos de reações (BRUCE, 1998).

TABELA 2 – Relação de cofator e sua atuação em reações orgânicas

COFATORES	TIPO DE REAÇÃO
NAD <sup>+</sup> /NADH	Remoção ou adição de hidrogênio
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Remoção ou adição de hidrogênio
ATP, GTP, CTP e UTP	Fosfoliração
SAM	C <sub>1</sub> -alquilação
Acetil-CoA	C <sub>2</sub> -alquilação
Flavinas	Oxigenação
Piridoxal-fosfato	Transaminação
Biotina	Carboxilação
Complexo metal-porfirina	Peroxidação, oxigenação

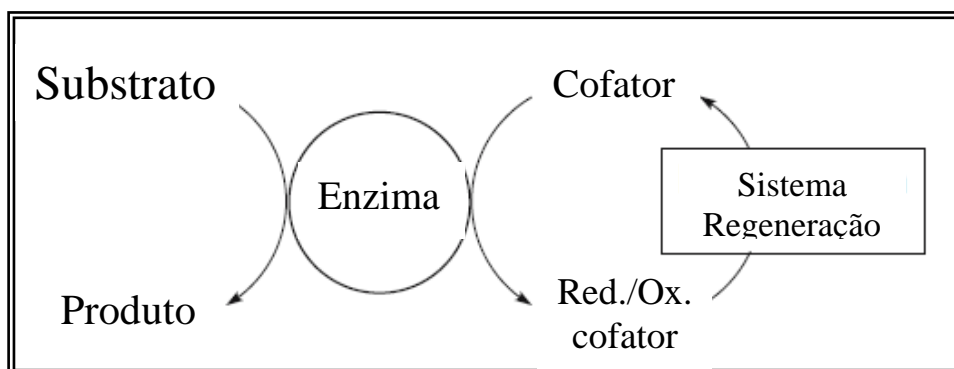
A título de exemplo, torna-se economicamente vantajoso o uso de células íntegras na redução de carbonilas de cetonas, pois fornece alta seletividade e elimina a necessidade de

fornecer quantidades equimolares de cofatores, como por exemplo  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ou  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , que são bastante dispendiosos, ao sistema reacional.

A enzima álcool desidrogenase (ADH) é caracterizada por catalisar a transferência do hidrogênio e oxidar álcoois a compostos carbonílicos e vice-versa. Aplicados em reduções elas podem distinguir entre a face enantiotópica e diastereotópica do composto carbonílico pró-quiral e então obter a preparação de álcoois não racêmicos.

A maioria das ADH's são dependentes dos cofatores  $\text{NADH}$  e  $\text{NADPH}$ , e como eles são muito caros para serem usados estequiometricamente – com preço estimado em R\$ 3.700 por mol para  $\text{NAD}^+$  - têm aumentado o interesse no desenvolvimento de eficientes processos de regeneração dos mesmos. A regeneração do cofator ocorre em paralelo a conversão do substrato no produto, como demonstra a figura 10. No caso das ADH's a produção do  $\text{NADPH}$  pode ocorrer por métodos químicos, eletroquímicos, fotoquímicos e enzimáticos. Uma outra abordagem para regeneração de cofator em processos de biotransformação por células íntegras usa o metabolismo de células cultivadas utilizando glicose ou outros compostos como nutrientes (HABERLAND *et al*, 2002).

FIGURA 10 – Esquema geral do processo de regeneração de cofator



Fonte: HABERLAND *et al*, 2002

Para a regeneração de cofator via enzimática existem duas diferentes abordagens: os processos de acoplamento com a enzima e o acoplamento com o substrato. O acoplamento com a enzima usa um co-substrato que é convertido por uma segunda enzima na direção oposta da redução, ou seja, o processo requer a aplicação de duas enzimas ao mesmo tempo. O acoplamento com o substrato usa somente uma enzima para a produção do composto e a regeneração do cofator, é uma melhor alternativa em comparação com o outro método. (GOLDBERG *et al*, 2007).

Biocatálise envolvendo oxidoredutases isoladas ou de organismos vivos é sempre considerado um dos mais promissores métodos devido a excelente enantiosseletividade, condições brandas de reação e meio reacional suave. Nesse caso, células íntegras são uma excelente alternativa em detrimento do uso da enzima isolada, pois a oxidoredutase, o cofator e o sistema de regeneração, se localizam todos dentro da célula, e portanto a adição de um cofator caro é evitada (YANG, 2008).

Reações de redução de cetonas pró-quirais promovem a produção de álcoois enantiomericamente puros que são intermediários importantes na síntese orgânica assimétrica. Álcoois quirais são um dos mais importantes blocos de construção quiral para inúmeros fármacos quirais devido possuírem propriedades únicas em suas estruturas. A redução assimétrica de cetonas pró-quirais é uma das mais efetivas e promissoras rotas para obtenção de álcoois quirais (YANG, 2008; MOUAD, 2011).

### **3.2 Biocatálise e sistemas de biocatálise**

Uma das metodologias mais comumente empregadas em biocatálise é realizada através da utilização de células íntegras de microorganismos cultivados em meios de cultura apropriados, onde toda a maquinaria enzimática está disponível para catalisar inúmeras reações enzimáticas, podendo inclusive gerar uma mistura de produtos oriundos da biotransformação. O uso de células íntegras aplica-se principalmente nas reações em que as enzimas para catalisarem as reações químicas requerem cofatores.

Nos últimos anos culturas de células de plantas e células íntegras de plantas têm sido usadas com o propósito de realizar transformações sintéticas com alta enantiosseletividade. Nesse contexto, o desenvolvimento de processos químicos verdes e sustentáveis fazem parte de uma transição para alternativas econômicas, biológicas e biotecnológicas mais atrativas. As rotas de biotecnologias para síntese fina de substâncias orgânicas, têm aumentado consideravelmente.

Reduções bioquímicas ocorridas em meio aquoso, têm tradicionalmente envolvido álcool desidrogenases isoladas (ADH) acoplada com um cofator (NADH ou NADPH). As principais vantagens desses métodos biocatalíticos são as condições brandas de reação, associada a alta estereoseletividade, uma ampla quantidade de substratos específicos, fácil recuperação do produto e ampla disponibilidade de material biológico. A limitação desses biocatalisadores é a necessidade de reciclar o cofator oxidado durante a reação (COMASSETO *et al*, 2004; BLANCHARD e WEGHE, 2006).

Biorreduções mediadas por pedaços ou culturas de células de plantas imobilizadas são conhecidas desde algumas décadas, mas recentemente a funcionalidade de células intactas (conhecidas como células íntegras) obtidas diretamente de porções de pedaços de plantas tem aumentado. Alta quimio- e estereoseletividade nas reduções de substratos exógenos têm sido observadas, bem como para a síntese de compostos orgânicos de um modo geral. O uso de células íntegras de plantas têm muitas vantagens. A primeira delas, é a grande variedade de plantas taxonomicamente diferentes disponíveis a custos muito baixos nos mercados. Além disso, as células íntegras também garantem a reciclagem do cofator oxidado, a separação a partir da mistura reacional do produto é mais fácil e o material biodegradável remanescente pode ser descartado ou reutilizado (BLANCHARD e WEGHE, 2006).

A redução assimétrica de cetonas é uma das mais importantes e fundamentais para a produção de álcoois quirais, que podem ser transformados em outras funcionalidades com aplicações para a síntese química industrial tais como farmacêutica, agroquímica e alimentícia (NAKAMURA, 2003).

Álcoois secundários opticamente ativos são principalmente utilizados como intermediários para a introdução de uma informação quiral em um determinado produto. Na indústria, métodos químicos bem estabelecidos são usados, mas nas últimas décadas, o interesse em se criar centros estereogênicos por aplicação de métodos de biocatálise tem aumentado. Em particular o número de processos industriais usando álcool desidrogenases (ADH's) tem aumentado. Esses biocatalisadores usados como enzimas isoladas ou células íntegras catalizam a redução estereoseletiva de cetonas pró-quirais com notável quimio-, regio- e estereoseletividade (GOLDBERG *et al*, 2007).

Para reduções assimétricas, enzimas isoladas, microorganismos como leveduras e fungos, e culturas de células de plantas bem como vegetais, tem sido muito utilizados. Microorganismos e culturas de células de plantas, têm sido mais usados que enzimas isoladas devido a existência de algumas enzimas que catalisam várias reações. Por outro lado, biocatalisadores como leveduras e vegetais têm sido muito aplicados em síntese orgânica porque esses biocatalisadores são facilmente obtidos no mercado e são facilmente manipulados por químicos orgânicos (MATSUO *et al*, 2008).

Matsuo e colaboradores (2008), descrevem as seguintes vantagens do uso de sementes de vegetais como biocatalisadores:

- (1) Sementes de vegetais são obtidos em todos os lugares do mundo;
- (2) São facilmente preservadas por longos períodos de tempo;

(3) Têm a habilidade de serem germinadas em qualquer época do ano em condições sustentáveis.

Percebe-se que tecidos de plantas são biocatalisadores potenciais para reações de redução assimétrica, pois dispõem de uma diversidade de oxidoredutases e a regeneração do cofator requerido ocorre dentro da própria célula da planta. Como exemplificado logo adiante, excelentes resultados são obtidos em reações de redução assimétrica biocatalisadas por tecidos de plantas. Além disso reporta-se também outros tipos de reações biocatalisadas por vegetais apresentando excelentes resultados de conversão e também de estereosseletividade.

### **3.3 Reações biocatalisadas por enzimas de vegetais**

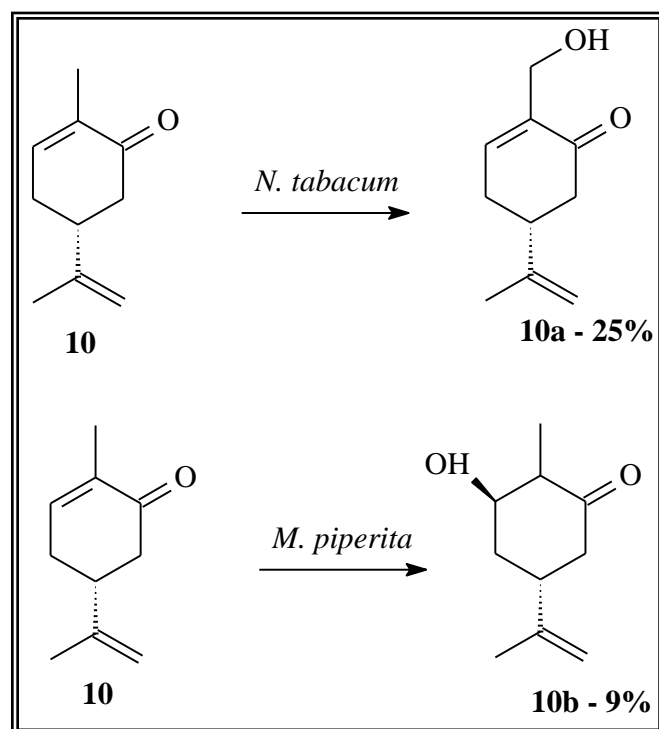
Conforme o levantamento bibliográfico realizado são registrados diferentes tipos de reações com a utilização de células vegetais como biocatalisadores. Dentre as reações relacionadas são encontradas reações de redução, oxidação, hidroxilação, hidrólises ou conjugação de glicosídeos, utilizando substratos naturais e não-naturais. Sendo assim, são apresentadas a seguir exemplos de reações biocatalisadas por diferentes espécies vegetais.

#### **3.3.1 Hidroxilação**

A hidroxilação de moléculas alvo é uma das mais importantes categorias na biotransformação de substratos exógenos por tecidos de plantas, porque elas oferecem um grande potencial na produção de substâncias úteis. A seguir são descritos alguns exemplos de hidroxilação biocatalisadas por espécies vegetais.

Em 2002, Kim e colaboradores, realizaram um série de estudos de biocatálise com as espécies *Nicotiana tabacum* e *Mentha piperita* usadas na biotransformação do monoterpeno carvona (10). As reações duraram entre 4 e 5 dias, e a figura 11 apresenta os produtos obtidos bem como seus respectivos rendimentos.

FIGURA 11 – Biotransformações de carvona com *N. tabacum* e *M. piperita*



Pelos resultados apresentados, a comparação entre as duas espécies para este tipo de reação mostra que *N. tabacum* possui maior habilidade em produzir o composto hidroxilado, como já reportado outras vezes na literatura por outros autores (HIRATA *et al*, 1982; SUGA *et al*, 1983). Além disso, as hidroxilações ocorreram em posições diferentes, sendo estereoespecífica quando biocatalisada por *M. piperita*.

Lindmark-Henriksson e colaboradores (2004) relataram a biotransformação do monoterpene  $\beta$ -pineno (11), produzindo vários produtos hidroxilados depois de 15 dias de tempo reacional utilizando a espécie *Picea abies*, como biocatalisador. A Figura 12 apresenta o esquema de biotransformação do monoterpene e os produtos obtidos com seus respectivos rendimentos.

FIGURA 12 – Biotransformação  $\beta$ -pineno com *P. abies*

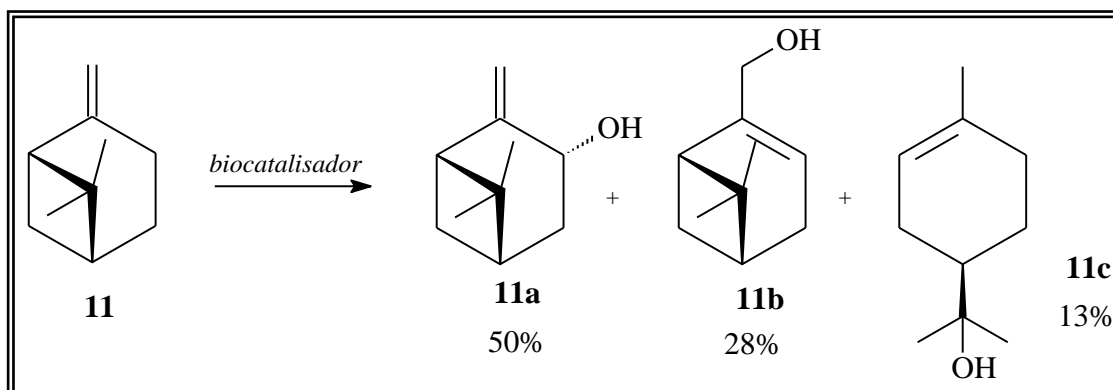
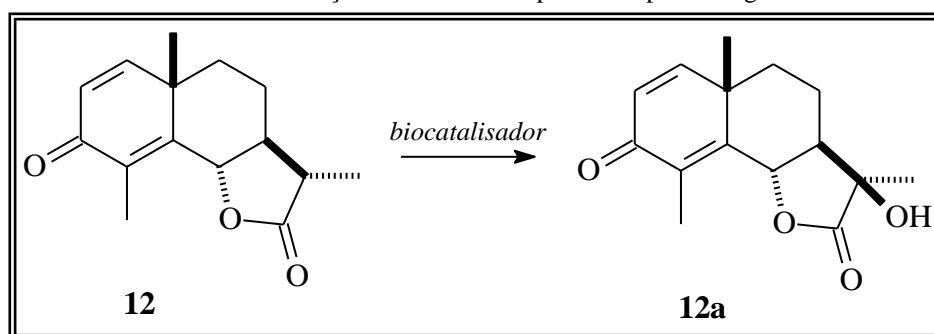


TABELA 3 – Espécies utilizadas na biotransformação de  $\alpha$ -santonina e seus respectivos rendimentos

Entrada	Biocatalisador (vegetal)	12a (rend. Isol.%)
1	<i>Catharanthus roseus</i>	25
2	<i>Platycodon grandiflorum</i>	37
3	<i>Ginkgo biloba</i>	72

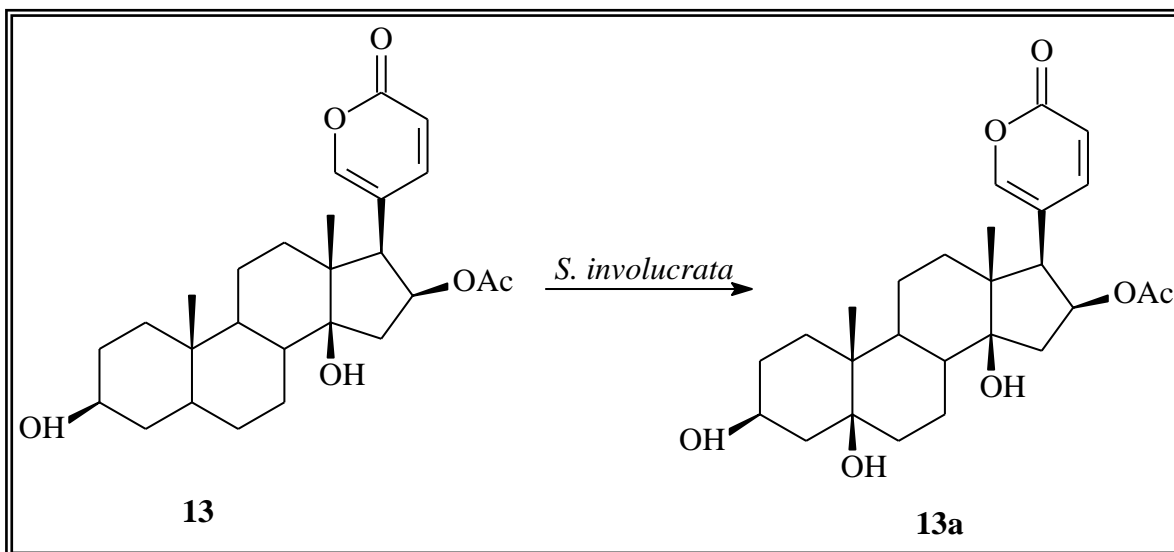
No ano seguinte, Yang e colaboradores (2005), obtiveram produtos hidroxilados a partir do composto  $\alpha$ -santonina (12), que é utilizado como material de partida para a produção de outros compostos com amplas atividades biológicas. Os produtos foram obtidos depois de 7 dias de tempo reacional. A figura 13 apresenta esquema reacional e a tabela 3 as espécies utilizadas bem como os rendimentos obtidos.

FIGURA 13 – Biotransformação de  $\alpha$ -santonina por três espécies vegetais



De acordo com os resultados apresentados na tabela, a espécie *Ginkgo biloba* foi a que se mostrou mais eficiente para esse tipo de reação.

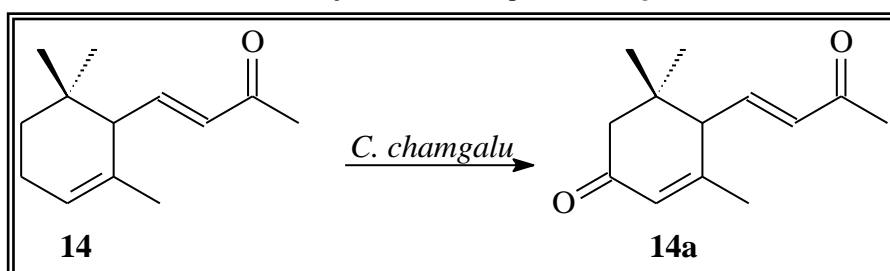
Um outro exemplo de hidroxilação, também foi relatado por Zhang *et al*, em 2011, onde foi obtido um produto hidroxilado do bufadienolídeo bufotalina (13) a partir de biotransformação catalisada por enzimas da espécie *Saussurea involucrata* durante 7 dias com um rendimento isolado de 5%. A figura 14 apresenta o esquema reacional da hidroxilação realizada.

FIGURA 14 – Biotransformação de bufotalina por *S. involucrata*

### 3.3.2 Oxidação

Reações de oxidação também têm sido obtidas através de biocatálise por vegetais, onde álcoois são convertidos às correspondentes cetonas pelas enzimas presentes nesse material. A seguir são mostradas alguns exemplos desse tipo de reação biocatalisada por enzimas presentes em vegetais.

Sakamaki e colaboradores publicaram em 2004 a biotransformação da  $\alpha$ -ionona (14) com *Caragana chamglu* durante 20 dias gerando um produto de oxidação com 50% de rendimento isolado. Esse é aparentemente um bom resultado levando-se em conta o tempo da reação. A figura 15 apresenta o esquema da biotransformação realizada.

FIGURA 15 – Biotransformação de  $\alpha$ -ionona por *C. chamglu*



Em 2006, Andrade e colaboradores realizaram reações de oxidação de álcoois aromáticos utilizando várias espécies vegetais como biocatalisador. As reações tiveram intervalos de 3 ou 6 dias. A figura 16 apresenta os substratos utilizados nas reações e a tabela 4 apresenta as espécies utilizadas, bem como os resultados obtidos.

FIGURA 16 – Esquema de biooxidação catalisada por espécies vegetais

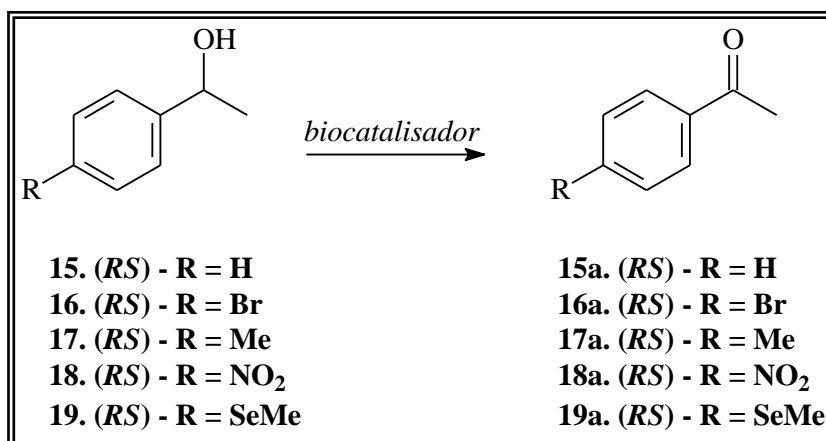


TABELA 4 – Espécies utilizadas na biooxidação álcoois aromáticos

<b>Entrada</b>	<b>Biocatalisador</b>	<b>Tempo (d)</b>	<b>15a (%)</b>	<b>16a (%)</b>	<b>17a (%)</b>	<b>18a (%)</b>	<b>19a (%)</b>
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	5	6	93	1	15
		6	54	37	100	1	88
2	<i>Arctium lappa</i>	3	-	10			
		6	-	11			
3	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	2		31	33	21
		6	88		69	86	40
4	<i>Beta vulgaris</i>	3	22	3	-	23	45
		6	23	1	2	92	44
5	<i>Brassica rapa</i>	3	-	-	25	-	7
		6	-	-	22	1	1
6	<i>Colocasia esculenta</i>	3	33	8	23	1	4
		6	67	14	31	6	5
7	<i>Coriandrum sativum</i>	3	24	1	87	-	46
		6	16	6	100	-	100
8	<i>Dioscorea alata</i>	3	4	56	30	2	9
		6	15	53	27	3	8
9	<i>Ipomoea batatas</i> (brc)	3	11	5	20	1	6
		6	10	5	28	1	11
10	<i>Ipomoea batatas</i> (verm.)	3	5				
		6	5				
11	<i>Manihot esculenta</i>	3	10		22	3	32
		6	13	3	35	3	42
12	<i>Polymnia sonchifolia</i>	3	-				
		6	1				
13	<i>Raphanus sativus</i>	3	49	-	8	1	-
		6	74	-	7	3	1
14	<i>Solanum tuberosum</i>	3	26	1	68	1	1
		6	60	10	96	2	5
15	<i>Zingiber officinale</i>	3	7	3	11	1	3
		6	-	12	40	1	100

Os resultados apresentados são bem variados, sendo o álcool 8, melhor oxidado pela maioria das espécies testadas com as melhores conversões.

Recentemente em 2011, Itoh e colaboradores reportaram a obtenção de produtos de oxidação do monoterpene estragol (20) através de reações de biocatálise com algumas espécies de plantas, com tempos de reação de 2 dias. A figura 17 apresenta o esquema da biotransformação, bem como os produtos obtidos. Percebe-se a formação de uma mistura de produtos oriundas das biotransformações. Sendo o mais favorecido deles, o produto aldeído da oxidação da dupla ligação terminal para as cinco espécies utilizadas. A tabela 5 mostra as espécies utilizadas assim como os rendimentos dos produtos.

FIGURA 17 – Esquema de biooxidação do estragol catalisada por espécies vegetais

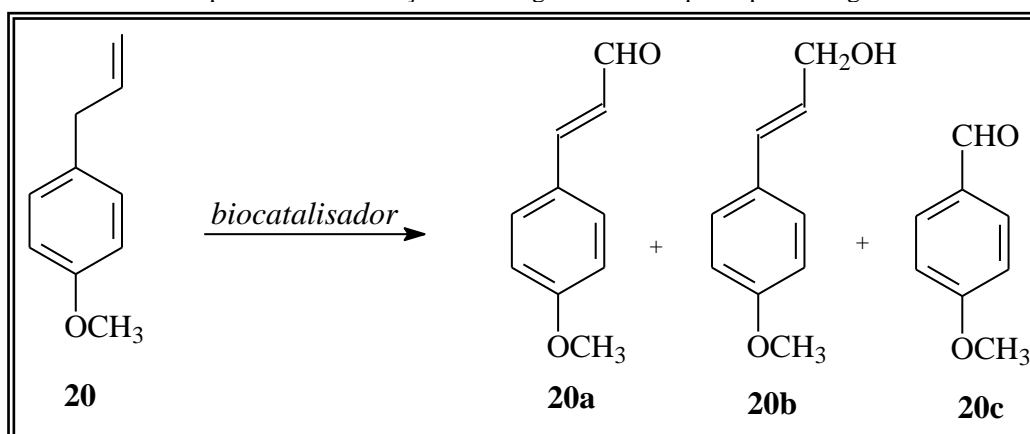
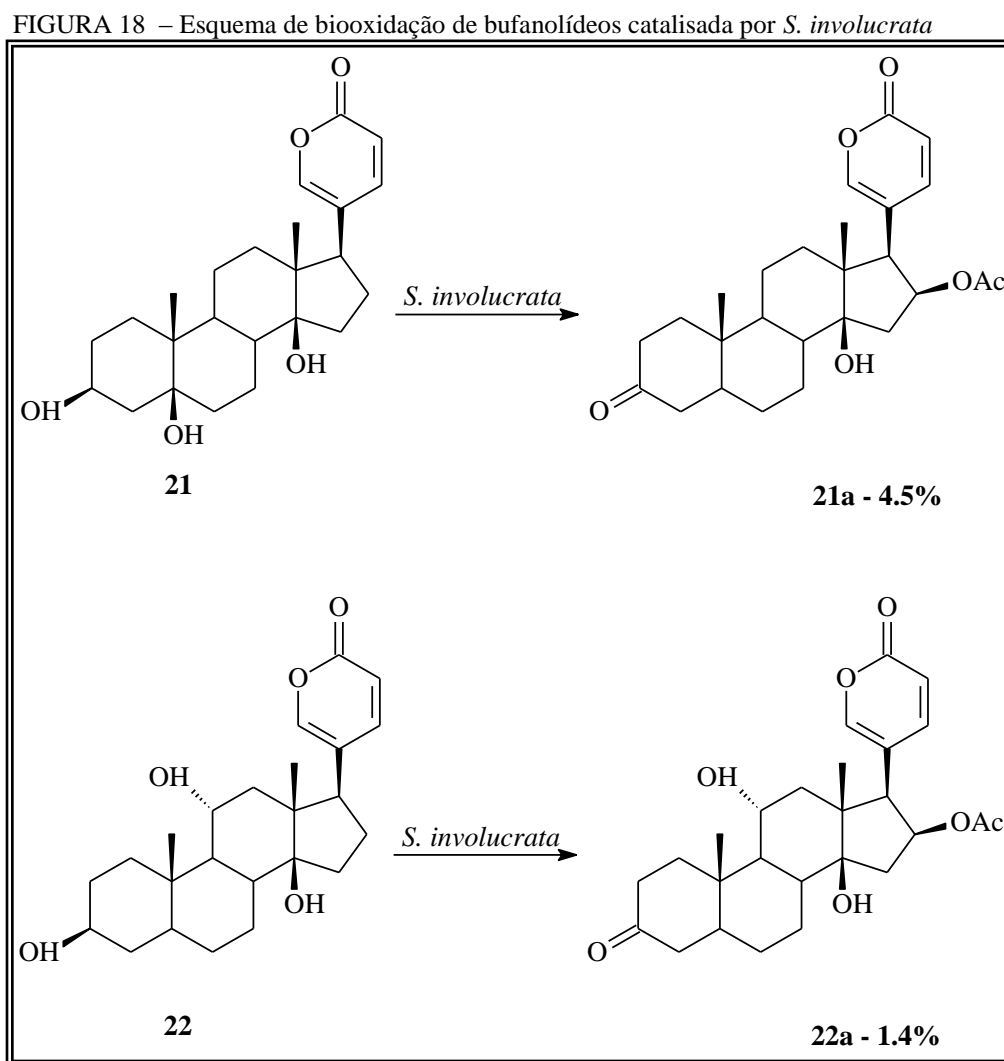


TABELA 5 – Espécies usadas na biooxidação do estragol e suas conversões

Entrada	Biocatalisador	20a (%)	20b (%)	20c (%)
1	<i>Caragana chamlagu</i>	19	5	2
2	<i>Ocimum basilicum</i>	1	-	-
3	<i>Corchoras olitorius</i>	2	4	-
4	<i>Perilla frutecens var. crispa</i>	1	1	-
5	<i>Lavandula angustifolia</i>	1	-	-

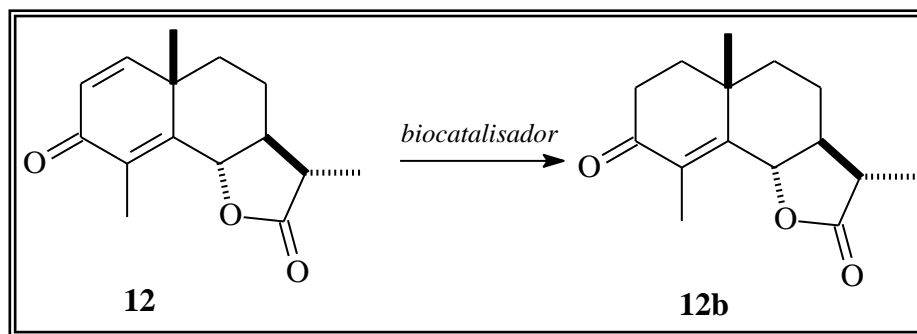
Pelos resultados apresentados, pode-se perceber que a única espécie dentre as pesquisadas que foi capaz de produzir compostos oxidados a partir do monoterpene utilizado foi *Caragana chamlagu*. Esta, produziu dois aldeídos e um álcool numa mesma biotransformação.

Ainda em 2011, também foi reportado por Zhang e colaboradores a oxidação dos bufadienolídeos telocinobufagina (21) e gamabufotalina (22) por enzimas presentes na espécie *S. involucrata* em biotransformações com 7 dias de duração. A figura 18 mostra o esquema reacional para os dois substratos bem como seus respectivos rendimentos isolados.



### 3.3.3 Hidrogenação da dupla C=C

Em 2005, Yang e colaboradores realizaram uma série de biotransformações com  $\alpha$ -santonina (12) mediadas por enzimas de plantas, obtendo diversos produtos, sendo alguns deles provenientes da hidrogenação de uma dupla ligação. Foram utilizadas duas espécies: *Phytolacca asinosa* e *Taxus cuspidata* e as reações duraram 7 dias. A figura 19 apresenta o esquema reacional da biotransformação e a tabela 6, os valores de conversão obtidos.

FIGURA 19 – Esquema de biotransformação de  $\alpha$ -santonina por espécies vegetaisTABELA 6 – Espécies usadas na biotransformação de  $\alpha$ -santonina e seus respectivos rendimentos

Entrada	Biocatalisador (vegetal)	12b (rend. Isol.%)
1	<i>Phytolacca asinosa</i>	62
2	<i>Taxus cuspidata</i>	7

### 3.3.4 Hidrólise

Em 2004, Monterde e colaboradores realizaram a hidrólise de uma série de epóxidos através de enzimas presentes na espécie *Solanum tuberosum*. A figura 20 apresenta os substratos utilizados e a tabela 7 os resultados obtidos.

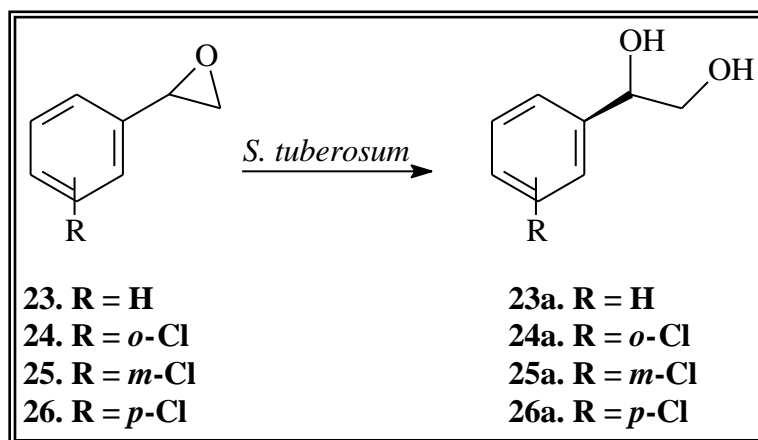
FIGURA 20 – Esquema de hidrólise de epóxidos biocatalisada por *S. tuberosum*

TABELA 7 – Resultados das hidrólises dos epóxidos biocatalisadas por *S. tuberosum*

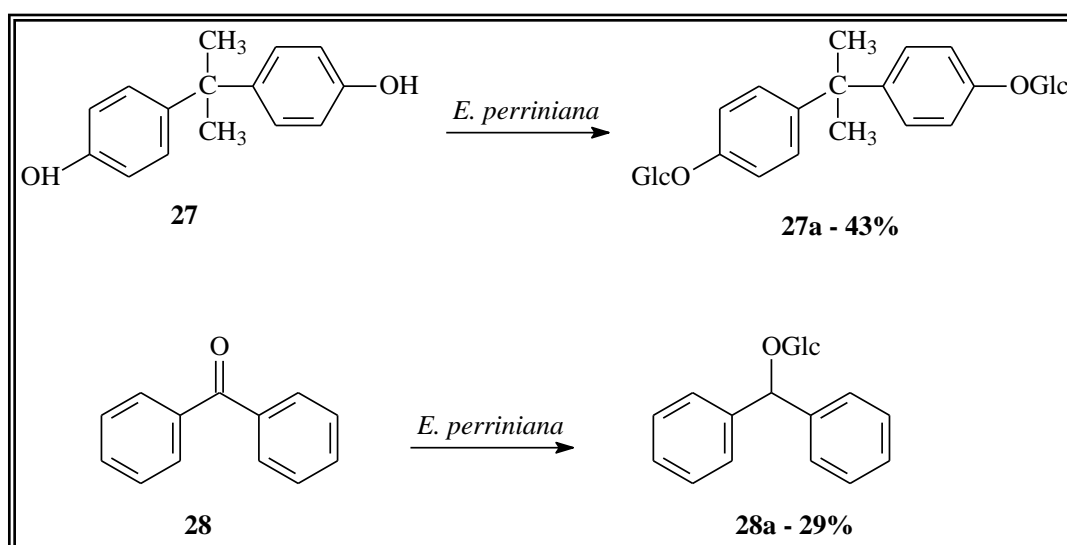
Entrada	Substrato	t (h)	c (%)	e.e (%)	Conf.
1	23	0,7	53	95	R
2	24	5,5	45	30	R
3	25	2	57	94	R
4	26	1,4	50	88	R

### 3.3.5 Glicosilação

Reações de conjugação de glicosídeos são de especial interesse porque possibilitam a produção de novos cardenólídeos bem como a conversão de substâncias insolúveis em água, para compostos solúveis.

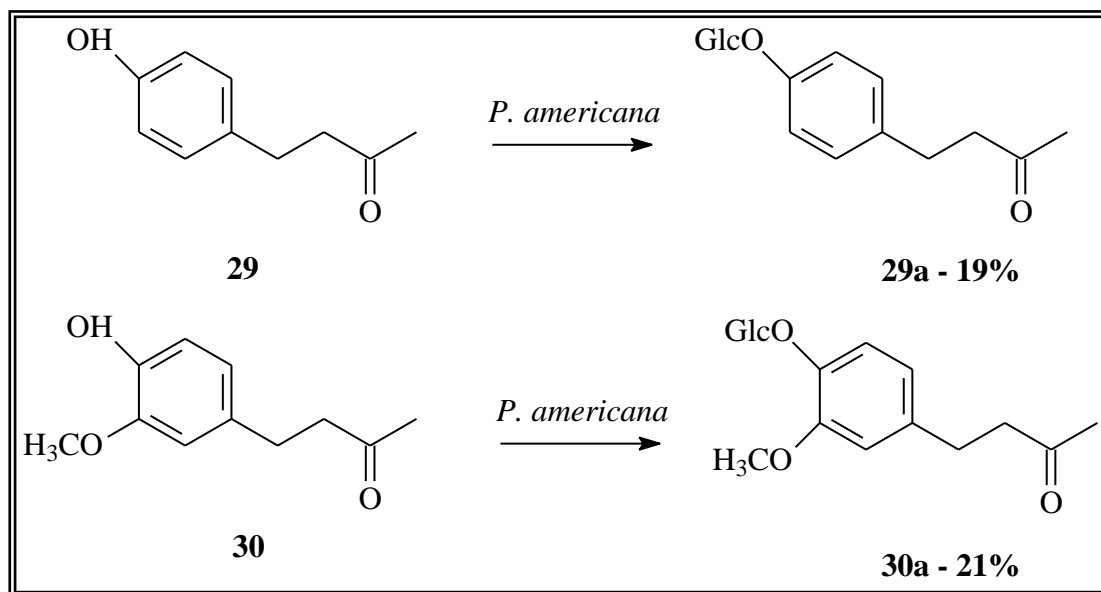
Em 2006, foi publicada por Kondo e colaboradores a obtenção de produtos glicosilados a partir do bisfenol (27) e da benzofenona (28) biocatalisadas pela espécie *Eucalyptus perriniana* em reações de 7 dias de duração.

A figura 21 mostra o esquema reacional das biotransformações, bem como os rendimentos obtidos.

FIGURA 21 – Glicosilação de compostos biocatalisada por *E. perriniana* com seus respectivos rendimentos

No ano seguinte, Shimoda e colaboradores (2007) reportaram a glicosilação de dois compostos com as enzimas da espécie *Phytolacca americana*. A figura 22 apresenta o esquema reacional das biorreduções bem como os respectivos rendimentos isolados dos produtos.

FIGURA 22 – Glicosilação de compostos biocatalisada por *P. americana* com seus respectivos rendimentos



### 3.3.6 Descarboxilação

Em 2001 Takemoto e Achiwa utilizaram a espécie *Catharantus roseus* para promover a descarboxilação de vários substratos carboxílicos. A figura 23 apresenta os substratos usados e a tabela 8 os dados obtidos.

FIGURA 23 – Descarboxilação de compostos biocatalisada por *C. roseus*

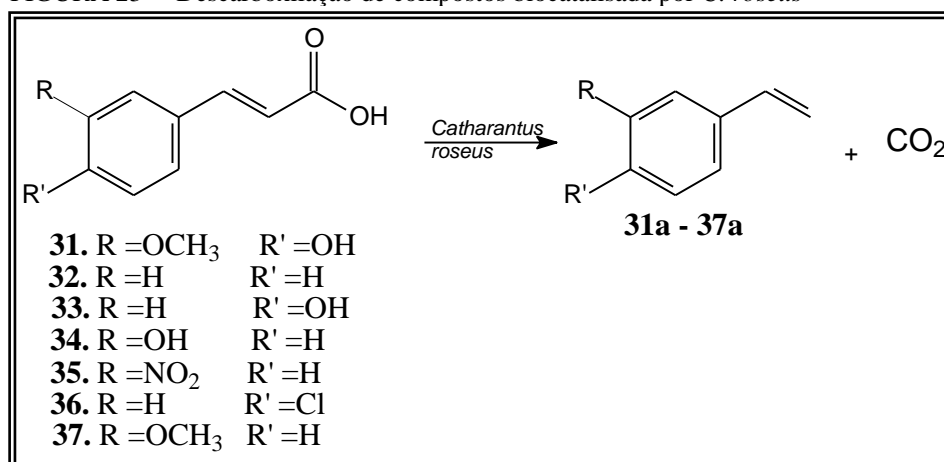


TABELA 8 – Rendimentos das descarboxilações biocatalisadas por *C. roseus*

Entrada	Substrato	Produto	t (dias)	Rend.
1	31	31a	5	Quant.
2	32	32a	5	10%
3	33	33a	5	30%
4	34	34a	5	traços
5	35	35a	5	Quant.
6	36	36a	5	10%
7	37	37a	5	traços

Pelos resultados apresentados na tabela 8, a descarboxilação desses substratos biocatalisadas por *C. roseus* não apresentou bons rendimentos, os grupos substituintes presentes no anel aromático não apresentaram uma influência significativa nas conversões. Observa-se que a espécie testada não é uma opção muito viável para este tipo de reação.

### 3.3.7 Produção de ciano-hidrinas

Em 2002, Roda e colaboradores publicaram biotransformações usando *Hevea brasiliensis* (seringueira) como biocatalisador com aldeídos  $\alpha$ ,  $\beta$  substituídos em reações para gerar ciano-hidrinas, conforme mostra a figura 24. A tabela 9 apresenta os resultados obtidos para essas bioconversões.

FIGURA 24 – Obtenção de cianohidrinas biocatalisada por *H. brasiliensis*

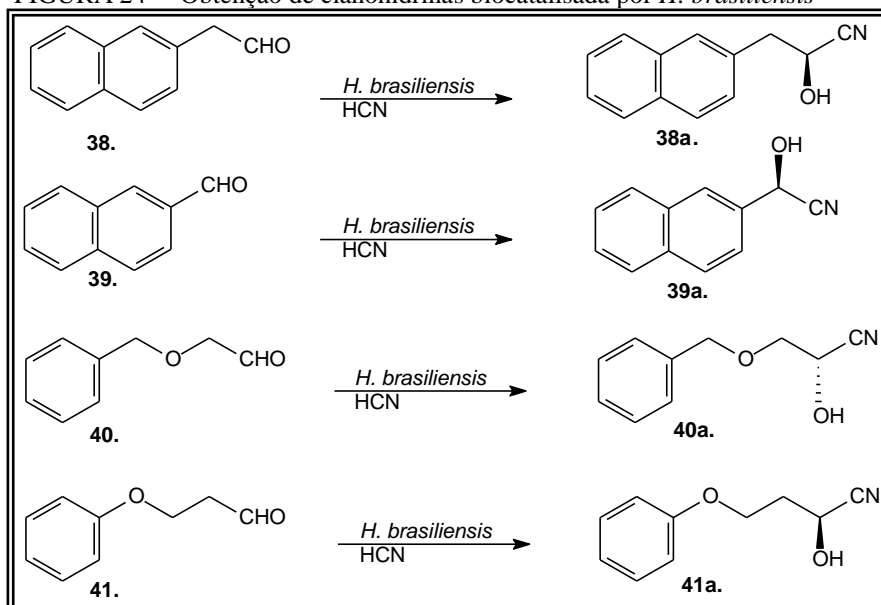


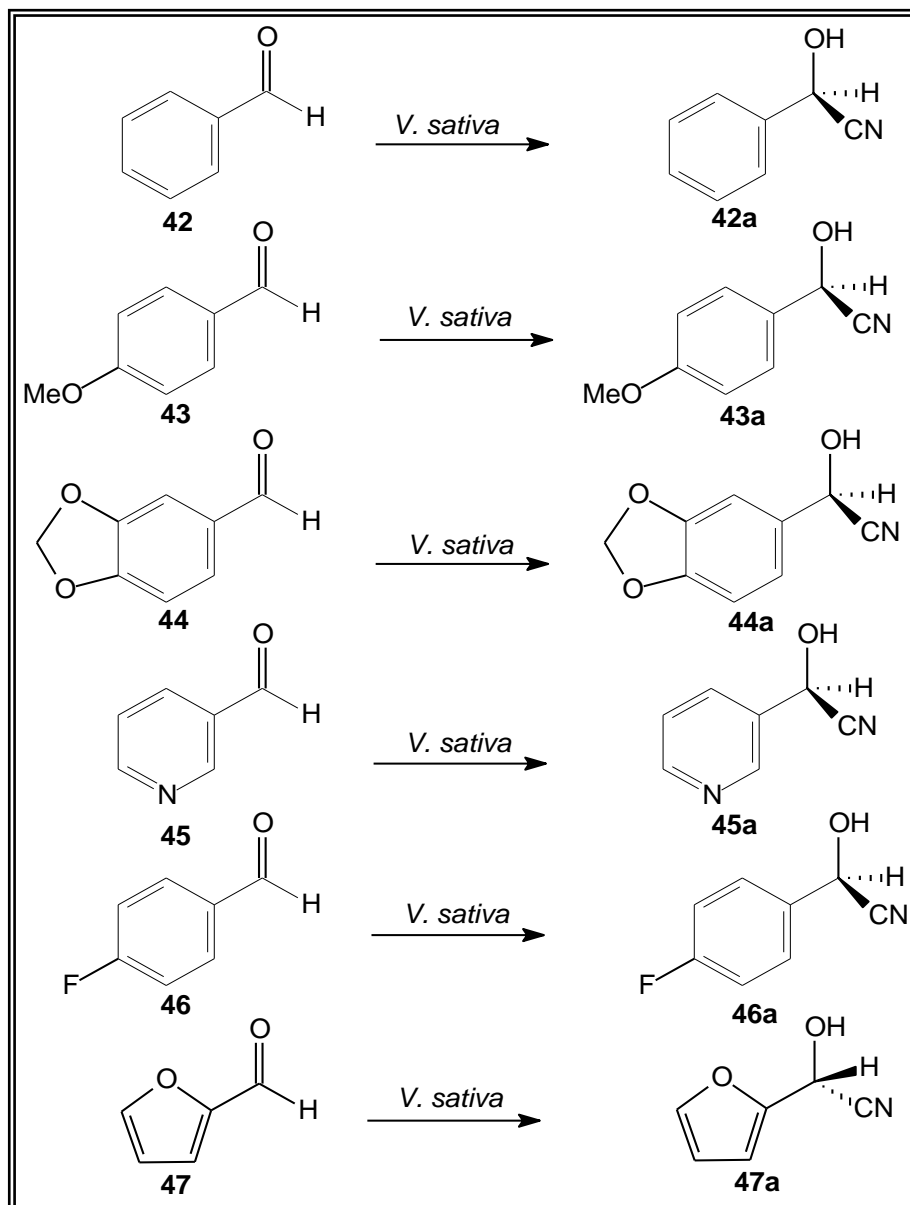


TABELA 9 – Resultado da obtenção de cianohidrinas biocatalisada por *H. brasiliensis*

<b>Entrada</b>	<b>Substrato</b>	<b>Produto</b>	<b>ee (%)</b>	<b>Config.</b>
1	38	38a	68,8	<i>S</i>
2	39	39a	66	<i>S</i>
3	40	40a	12,2	<i>R</i>
4	41	41a	91,6	<i>S</i>

Pelos resultados obtidos, nota-se que há influência na indução da configuração final do produto de acordo com o tipo de cadeia que o substrato possui. Para os substratos 38, 39 e 41 obtêm-se produtos com configuração *S*, os dois primeiros com excessos enantioméricos moderados e o último com excelente *ee*. No caso, do substrato 40 houve um baixíssimo *ee* com inversão da configuração do produto obtido.

Em 2006, Han e colaboradores publicaram biotransformações de aldeídos em ciano-hidrinas usando *Vicia sativa* (um tipo de ervilha) como biocatalisador. A figura 25 apresenta os substratos usados e os produtos obtidos. A tabela 10 apresenta os resultados reacionais.

FIGURA 25 – Obtenção de ciano-hidrinas biocatalisada por *V. sativa*TABELA 10 – Resultado da obtenção de cianohidrinas biocatalisada por *V. sativa*

Entrada	Substrato	Produto	t (h)	T (°C)	Rend.	ee (%)	Configuração
1	42	42a	24	12	100	99	<i>R</i>
2	43	43a	24	12	52	94	<i>R</i>
3	44	44a	12	12	93	88	<i>R</i>
4	45	45a	12	12	71	3	<i>R</i>
5	46	46a	12	12	97	91	<i>R</i>
6	47	47a	12	4	96	97	<i>S</i>

A obtenção das ciano-hidrinas biocatalisadas pela espécie *V. sativa* apresentam segunda a tabela tempos de reação não muito longos, com duração máxima de 24 horas ocorrendo à baixas temperaturas. Foram obtidos excelentes rendimentos e excessos enantioméricos, exceto para o substrato 36 que contém um anel piridínico. Este anel influenciou na baixa resolução do composto. Os produtos 42a-46a apresentaram configuração anti-prelog (*R*), já para o substrato 47, o anel furânico influenciou na enantioselectividade da reação, que se processou à uma temperatura de 4°C tendo como produto a cianohidrina com configuração (*S*).

### 3.3.8 Redução

Reações de redução de grupos carbonílicos são as mais reportadas em biocatálise através de enzimas de vegetais. Isso porque a redução assimétrica de cetonas pró-quirais é uma das efetivas e promissoras rotas para a manufatura de álcoois quirais. A seguir são relacionados alguns trabalhos que envolvem este tipo de biotransformação. A grande maioria desses trabalhos ainda envolve a redução de cetonas derivadas de acetofenona, isto porque a acetofenona foi tomada como substrato modelo para este tipo de biotransformação.

Uma das espécies mais utilizadas nestes últimos dez anos na redução de cetonas pró-quirais é a cenoura ou *Daucus carota*. Vários autores reportam as mais diferentes biorreduções com este biocatalisador. Em 2001, Yadav e colaboradores já realizavam reduções de azidocetonas com essa espécie. A reação realizada está representada na figura 26 e os resultados obtidos na tabela 11.

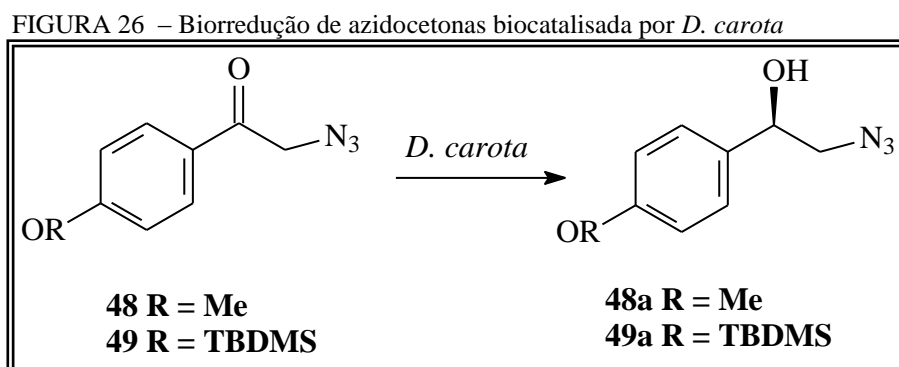


TABELA 11 – Resultados da Biorredução de azidocetonas biocatalisada por *D. carota*

Entrada	Substrato	Produto	t (h)	Rend.	ee (%)	Configuração
1	48	39a	48	92	99	<i>R</i>
2	49	40a	72	85	99	<i>R</i>

No ano seguinte, este mesmo autor utilizou a mesma espécie na redução de acetofenona e derivados (YADAV *et al*, 2002). Esses compostos são os mais utilizados em reações de redução biocatalisadas por diversas espécies vegetais, sendo alguns exemplos: *Manihot esculenta* (MACHADO *et al*, 2006); *Passiflora edulis* (MACHADO *et al*, 2008); *Saccharum officinarum* L. (ASSUNÇÃO *et al*, 2008); *Cocos nucifera* (FONSECA, *et al*, 2009); *Malus pumila*, *Cucumis sativus*, *Allium cepa*, *Soanum tuberosum*, *Raphanus sativus*, *Ipomoea batatas* (XU *et al*, 2010); e até com as algas marinhas *Bostrychia radicans* e *B. Tenella* (MOUAD, 2011). Todos esses trabalhos apresentam as conversões e excessos enantioméricos dos mais variados, sempre a depender da espécie utilizada com biocatalisador e do substituinte presente no substrato utilizado.

A figura 27 apresenta os substratos cetônicos aromáticos testados por YADAV e seu grupo em 2002, e os resultados obtidos por suas biorreduções encontram-se na tabela 12.

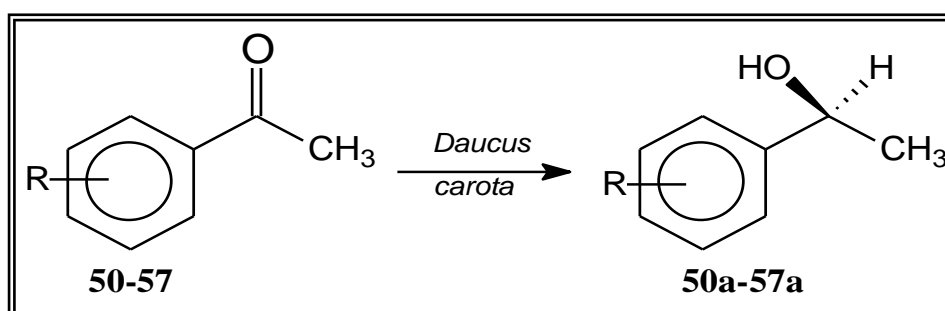
FIGURA 27 – Biorredução de acetofenonas biocatalisada por *D. carota*

TABELA 12 – Resultados da Biorredução de acetofenonas biocatalisada por *D. carota*

Entrada	Substrato	R	t (h)	Rend.	ee (%)	Configuração
1	50	H	40	73	92	S
2	51	<i>p</i> -Cl	42	76	95	S
3	52	<i>p</i> -Br	48	61	95	S
4	53	<i>p</i> -F	41	80	90	S
5	54	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	40	82	96	S
6	55	<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	50	75	92	S
7	56	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	45	72	94	S
8	57	<i>p</i> -OH	47	73	91	S

Observa-se que a posição do substituinte ou o tipo dele não tem efeito na enantioseletividade, pois todos os álcoois produzidos apresentaram configuração do tipo *S*, de acordo, portanto, com a regra de Prelog, além de apresentarem também excelentes excessos enantioméricos e percentuais de rendimentos.

No ano de 2004, esta mesma espécie foi utilizada por Comasseto e colaboradores na redução de acetofenonas organosulfuradas e organoselenios para gerar os correspondentes  $\alpha$ -metil-álcoois. A figura 28 apresenta os substratos e os produtos gerados e a tabela 13 mostra os resultados das reações.

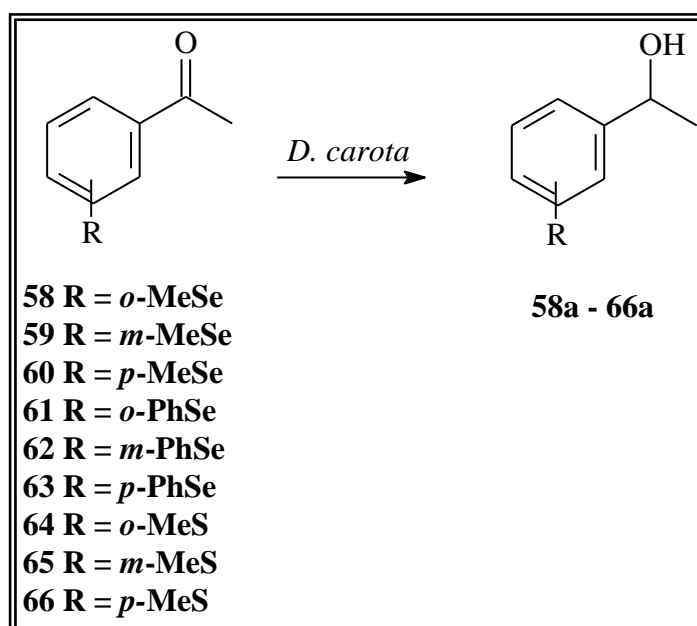
FIGURA 28 – Biorredução de acetofenonas organoselenadas biocatalisada por *D. carota*

TABELA 13 – Resultados da Biorredução de acetofenonas organoselenadas biocatalisada por *D. carota*

Entrada	Substrato	Produto	t (h)	Conv.(%)	ee (%)	Configuração
1	58	58a	72	-	-	-
2	59	59a	48	96	99	S
3	60	60a	48	83	99	S
4	61	61a	72	-	-	-
5	62	62a	72	95	99	S
6	63	63a	72	72	99	S
7	64	64a	72	8	99	S
8	65	65a	72	97	99	S
9	66	66a	72	95	99	S

Ainda em 2008, *D. Carota* foi utilizada por Ferraz e colaboradores como biocatalisador na biorredução de tetralonas  $\alpha$ -substituídas. As reações duraram 4 dias à 32°C. Os substratos utilizados encontram-se na figura 29 e os resultados obtidos na tabela 14.

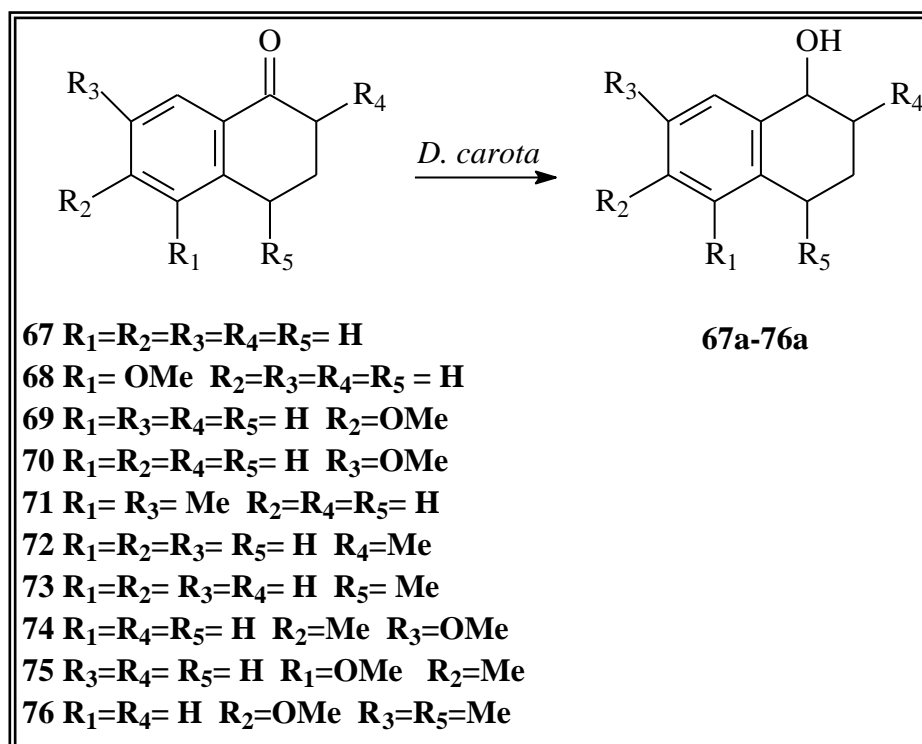
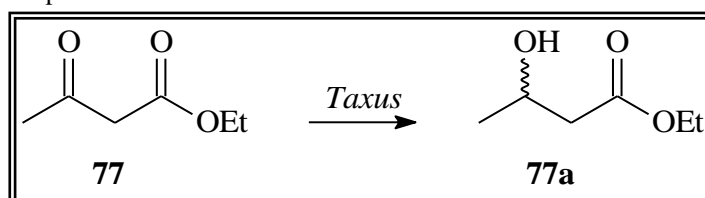
FIGURA 29 – Biorredução de tetralonas  $\alpha$ -substituídas biocatalisada por *D. carota*

TABELA 14 – Resultados da Biorredução de tetralonas  $\alpha$ -substituídas biocatalisada por *D. carota*

Entrada	Substrato	Produto	Conv.(%)	ee (%)	Configuração
1	67	67a	57	95	S
2	68	68a	80	99	S
3	69	69a	11	60	-
4	70	70a	82	99	S
5	71	71a	20	99	S
6	72	72a	-	-	-
7	73	73a	37	99	-
8	74	74a	9	99	-
9	75	75a	75	99	-
10	76	76a	-	-	-

Em 2009, Sandoval e colaboradores utilizaram varias espécies de *Taxus* para a redução do  $\beta$ -ceto-éster aceto acetato de etila (77). As reações duraram 7 dias e o esquema reacional delas encontra-se na figura 30, bem como os resultados obtidos em diferentes condições reacionais são apresentados na tabela 15.

FIGURA 30 – Biorredução de  $\beta$ -ceto-ésteres biocatalisada por espécies de *Taxus*TABELA 15 – Resultados da Biorredução de  $\beta$ -ceto-ésteres biocatalisada por espécies de *Taxus*

Entrada	Biocatalisador	pH	Conv.(%)	ee (%)	Config.
1	<i>T. brevifolia</i>	5,7	28	49,7	R
2	<i>T. brevifolia</i>	6,5	32	44,8	R
3	<i>T. brevifolia</i>	7,5	24	32,1	R
4	<i>T. globosa</i>	5,7	26	32	S
5	<i>T. globosa</i>	6,5	25	43,6	S
6	<i>T. globosa</i>	7,5	25	6,8	S

### 3.4 Lipases – Aspectos gerais

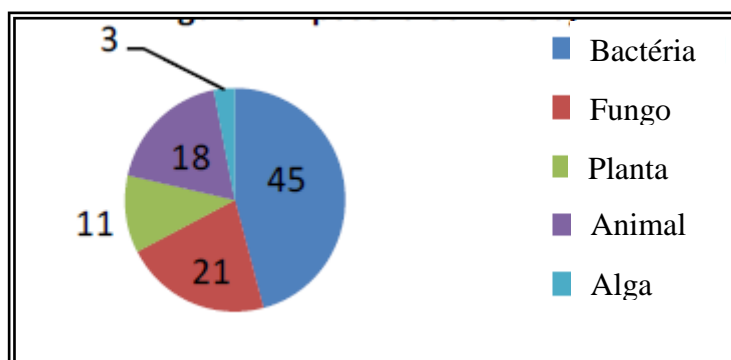
Lipases constituem um tipo especial de esterases que pertencem a subclasse 1 da classe 3 das enzimas hidrolíticas e quem possuem atribuição 3.1.1 devido a sua especificidade por ligações de ésteres carboxílicos. Naturalmente as lipases agem sobre glicerídeos que possuem um álcool quiral principalmente. Elas também são utilizadas na resolução ou assimetriação de ésteres contendo uma porção de álcool quiral. (ARAVIDAN *et al*, 2007).

São enzimas hidrolíticas com inúmeras aplicações e potencial industrial. Lipídeos são macromoléculas que possuem importantes rotas fisiológicas e enzimas lipolíticas são necessárias para sua quebra. Essas enzimas lipolíticas incluem esterases, comumente chamadas de carboxiesterases, e lipases, que originalmente são chamadas de lipases verdadeiras. A principal diferença entre esterases e lipases é que, uma atua em cadeias curtas de triglicerídeos que são solúveis em água. Lipases, entretanto agem em lipídeos que forma agregados em água e requerem uma interface lipídeo-água para a catálise. (GILHAM *and* LEHNER, 2005; ANGKAWIDJAJA *and* KANAYA, 2006).

A função biológica desta enzima é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis gerando ácidos graxos livres e glicerol. Elas são obtidas de várias fontes e possuem consideráveis variações em suas reações específicas. Algumas delas possuem afinidade por ácidos graxos de cadeia curta, outras têm preferência por ácidos graxos insaturados e outras ainda não são específicas e aleatoriamente dividem triglicerídeos e ácidos graxos (PATIL *et al*, 2011).

Lipases ocorrem amplamente na natureza, entretanto lipases microbiais são comercialmente significantes por causa do baixo custo de produção, grande estabilidade e principalmente que podem ser obtidas de várias fontes. A figura 31 adaptada de Patil e colaboradores (2011) apresenta um gráfico sobre a diversidade da origem biológica das lipases.

FIGURA 31 – Diversidade biológica da origem de lipases

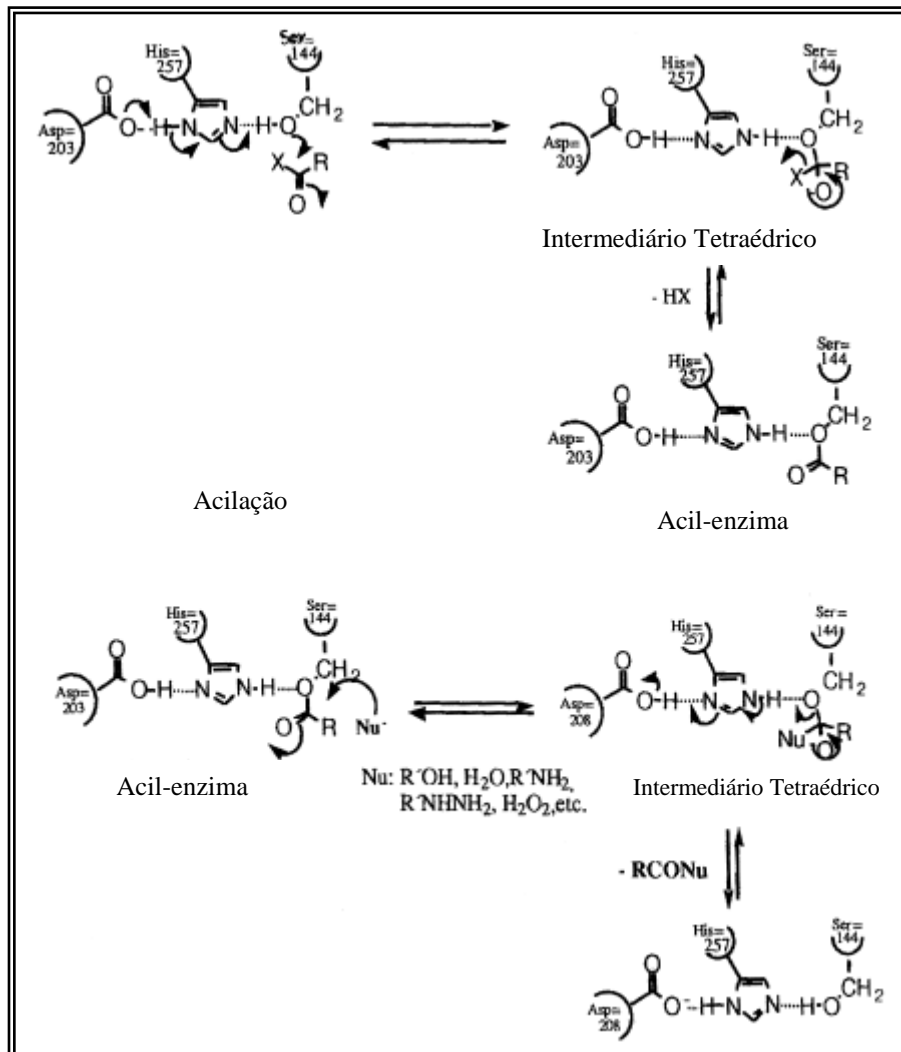


Fonte: Patil *et al*, 2011.



Muralidhar e colaboradores (2002), descrevem o mecanismo de atuação de lipases numa acilação. Segundo os autores, o primeiro substrato, o éster, reage com a enzima acoplando-se com ela, formando o primeiro produto enzima-substrato. Então, um segundo substrato, que é geralmente água, reage com a acil-enzima numa etapa de desacetilação, formando um segundo éster e a enzima livre. As reações de acilação e desacilação são normalmente reversíveis. Hidrólise de substratos insolúveis em água resultam a partir da adsorção da lipase para a interface substrato-água que podem induzir a troca da conformação da enzima causando uma alteração na velocidade da reação que pode ser influenciada tanto por interação adsortiva como pela interação com os substratos. A figura 32 (adaptada), ilustra esse processo.

FIGURA 32 – Mecanismo de catálise por lipase

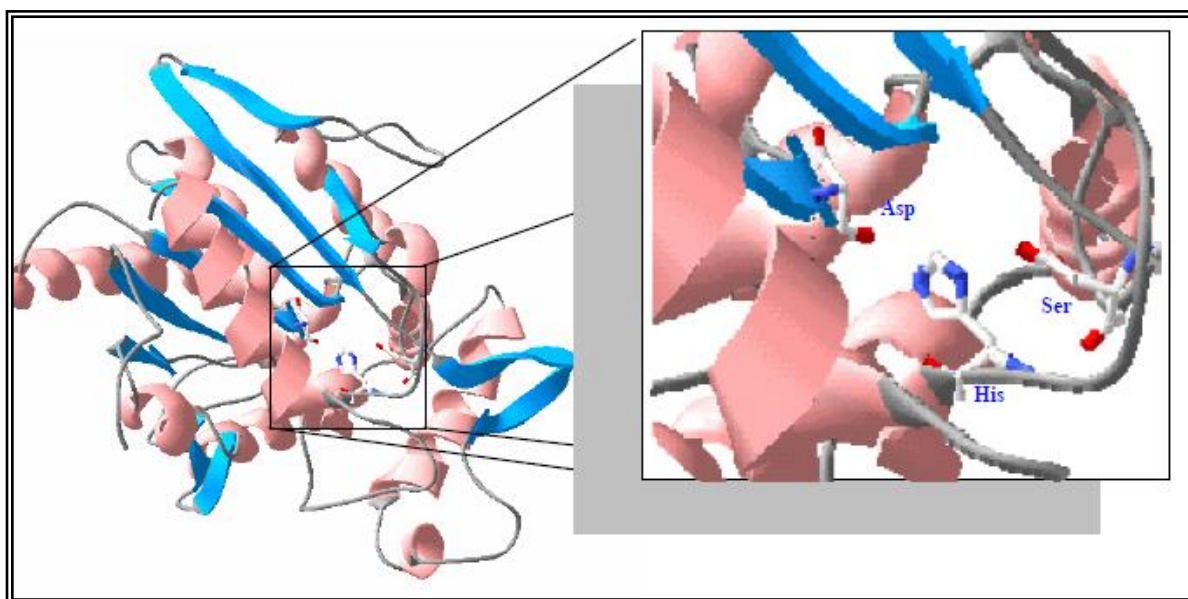


Fonte: Muralidhar *et al.*, 2002.

### 3.5 Lipases – Mecanismo de atuação

A cinética das reações lipolíticas catalizadas por lipases não podem ser descritas pela equação de Michaelis-Menten porque esta é válida somente para reações que ocorrem em fase homogênea. O estudo cinético das reações lipolíticas reportam o fenômeno da “ativação interfacial” que descreve a atividade de lipases. Estudos de estrutura 3D providenciam uma explicação para a ativação interfacial. O sítio ativo da lipase é recoberto por uma espécie de “tampa hidrofóbica” conhecida também como “lid”. Para sua ligação com a interface a tampa se move saindo da posição “fechada” para a posição “aberta”, com o sítio ativo agora acessível para o substrato na presença do solvente. Seu sítio ativo é constituído pela tríade catalítica G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G, onde: G=glicina, S=serina, X<sub>1</sub>=histidina e X<sub>2</sub>= ácido glutâmico ou aspártico. A figura 33 apresenta representação gráfica da estrutura terciária da lipase de *Pseudomonas* sp com a ampliação do seu sítio ativo, que é composto dos resíduos de aminoácido Ser 87, His 286 e Asp 264.

FIGURA 33 – Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas* sp

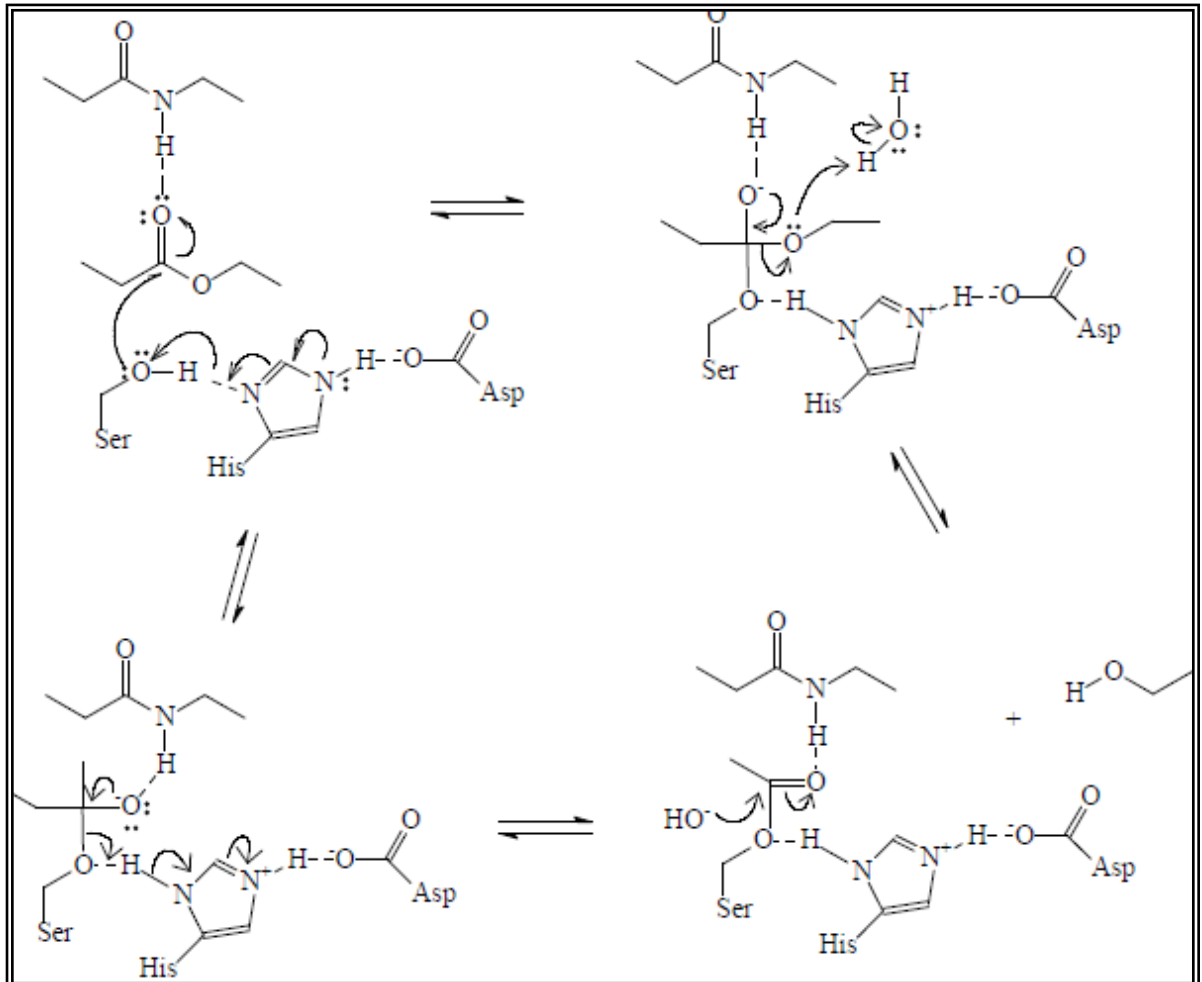


Fonte: Sebrão, D. 2005

A hidrólise do substrato inicia pelo ataque do nucleófilo ao sítio catalítico Ser-oxigênio no átomo do carbono da carbonila da ligação éster do triglicerídeo. Dessa forma, da relação estrutura-função contribuem para uma melhor compreensão do mecanismo cinético da ação de lipases em hidrólises, síntese e trocas de grupos de ésteres (RAJENDRAN *et al*,

2009). A figura 34 apresenta o mecanismo catalítico de lipases (adaptado de JAEGER *et al*, 1999).

FIGURA 34 – Mecanismo catalítico de lipases



Fonte: JAEGER *et al*, 1999.

### 3.6 Propriedades das lipases

São enzimas que são principalmente distribuídas em plantas, animais e microrganismos. Têm ganho atenção especial nas últimas décadas por sua habilidade em atuar em meios aquo-restritos e catalisar reações de esterificações, transesterificações, aminólises e acidólises. Algumas aplicações industriais das lipases tem como foco suas propriedades regio- e enantioesletiva e ainda de poderem atuar em solventes orgânicos. Por essas propriedades elas têm recebido grande atenção nas pesquisas (HE *et al*, 2010).

Elas agem em substratos de uma forma específica ou não. A parte hidrofóbica na superfície das lipases é responsável pelas fortes interações com substratos hidrofóbicos na interface. Na ausência de água lipases são capazes de reverter as reações que levam a esterificação e a transesterificação. Além da atividade lipolítica, elas também possuem atividade esterolítica, assim como uma ampla variedade de substratos. As características de quimio-, regio- e enantioselectividade dessas enzimas têm atraído inúmeras pesquisas científicas e industriais (SAXENA *et al*, 2003).

### **3.6.1 Efeitos de pH e temperatura**

Lipases geralmente possuem pH e temperaturas ditos ótimos, mas os valores específicos para cada lipase, depende do seu habitat e sua fonte. Elas possuem habilidade de atuar numa faixa de pH de 4-11 e temperaturas ótimas entre 10 e 96°. (PATIL *et al*, 2011).

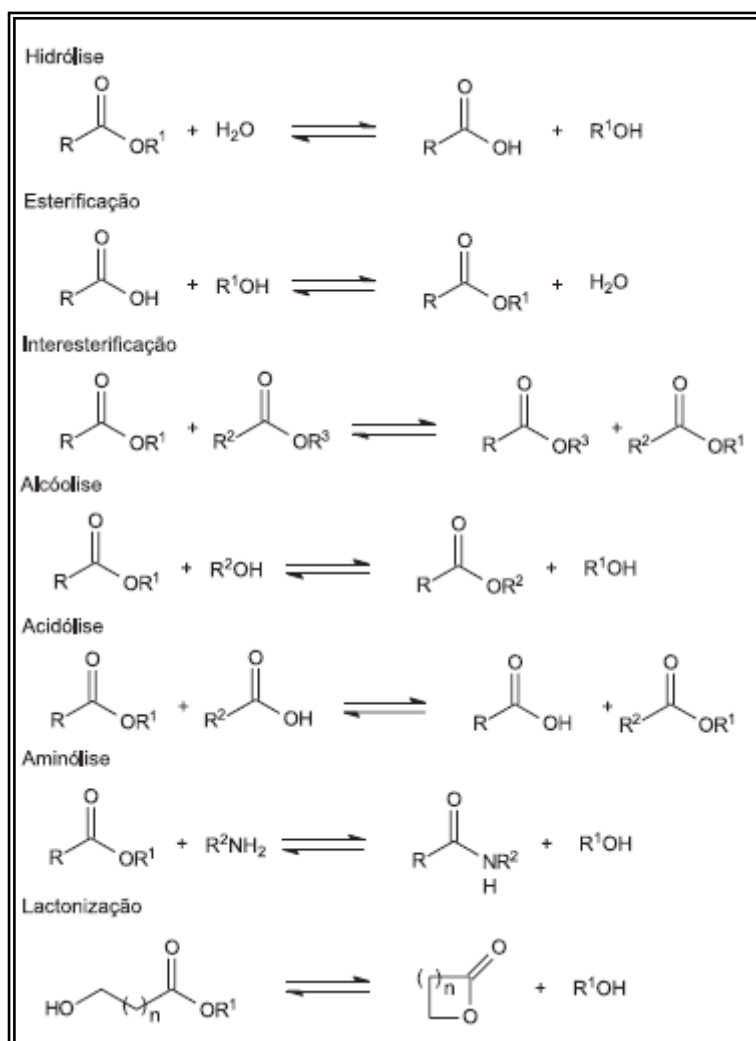
Com relação a estabilidade do pH os protocolos experimentais variam com relação ao tempo e condições de incubação adotadas. Nas lipases bacterianas observa-se uma tendência de maior estabilidade em valores alcalinos de pH; entretanto verifica-se com frequência estabilidade em faixas de pH desde fortemente ácido (pH 2,0) a fortemente alcalino (pH 12). Normalmente elas são ativas em pH 6,5 a 7,0 e inativas em pH 8,0. (RAJENDRAN *et al*, 2009). Algumas lipases têm se mostrado consideravelmente estáveis em uma ampla faixa de pH. Pode-se citar como exemplo, lipases de *P. aureuginosa* que são estáveis em faixas de pH 4-11.5 (KARADZIC *et al*, 2006) e como lipases ativas em meio alcalino, (pH 11.0), *Pseudomonas nitroreducens* (RAJENDRAN *et al*, 2009).

A termoestabilidade é uma das características requeridas de enzimas com aplicação industrial como as lipases, uma vez que, muitos processos usam temperaturas em torno de 50°. Lipases microbianas têm sido estudadas com relação à termoestabilidade, entretanto, não há padronização das metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais. O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre o gênero, as espécies e até isoformas produzidas pela mesma cepa. Pode-se citar como exemplo de lipase termoestável e de ampla aplicação em biocatálise a enzima CAL-A, com termoestabilidade em temperaturas superiores à 90° (MARÍA *et al*, 2005).

### 3.6.2 Tipos de reação que catalisam

Além da hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (PAQUES e MACEDO, 2006). A Figura 35 apresenta um esquema geral das reações biocatalisadas por lipases.

FIGURA 35 – Esquema geral de reações catalisadas por lipases

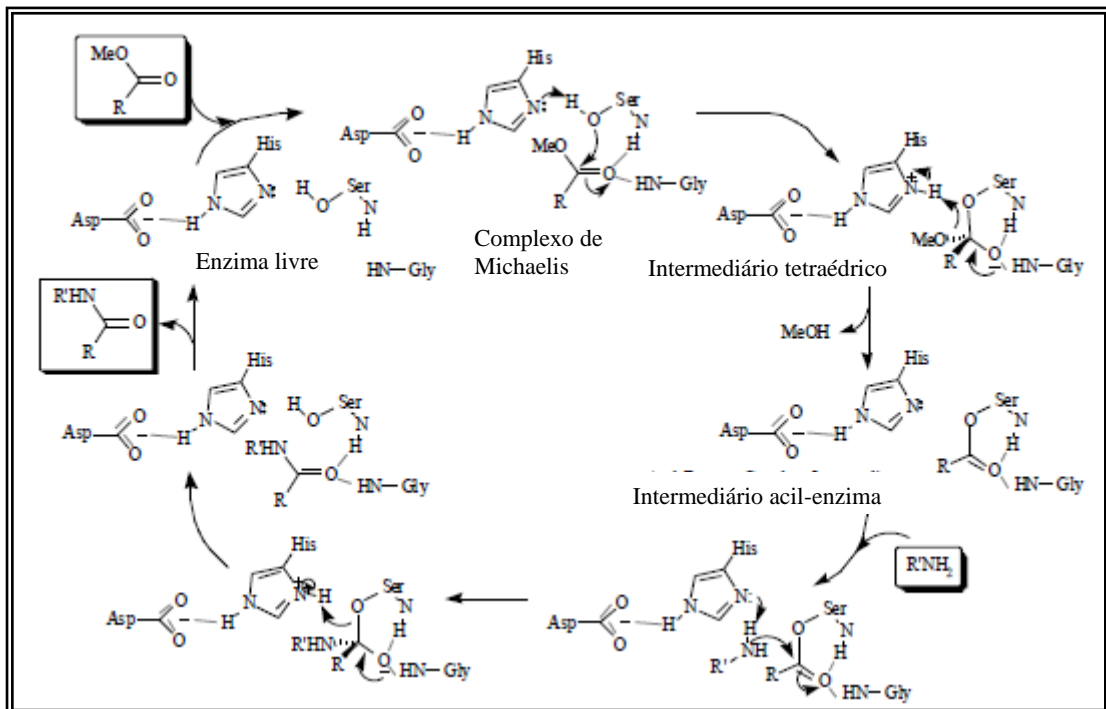


**3.6.2.1 - ACIDÓLISES:** processos em que o reagente é um ácido ou um éster. Acidólise entre trioleína e cadeias curtas de ácidos graxos em meio orgânico por lipases de *Aspergillus oryzae*, *Rhizomucos miehei* e *Candida cylindracea*, foram relatadas por Tsuzuki em 2005. Nesses processos foi observado que as lipases atuaram como biocatalisador na

incorporação de cadeias curtas de ácidos graxos e a trioleína na produção de estruturas de lipídeos com calorias reduzidas.

**3.6.2.2 - AMINÓLISES:** conversões entre aminas e álcoois em amidas e ésteres ou uma reação química em que uma molécula é dividida em duas partes pela reação com uma molécula de amônia ou amina. Essas reações têm sido extensivamente estudadas, e um exemplo básico seria a interação de um grupo carbonila com um nucleófilo, que podem ser um modelo para a formação de ligações peptídicas (GOTOR-FERNÁNDEZ e GOTOR, 2006c). Coutories e colaboradores em 2009 descreveram a catálise quimiosseletiva de lipases em aminólises de vários aminoálcoois com ácidos graxos. Eles utilizaram a lipase de *Candida antarctica*, e desenvolveram um processo enzimático para produção de amidas. A figura 36 (ADAPTADA, GOTOR-FERNÁNDEZ e GOTOR, 2006c) apresenta o mecanismo de reação de aminólise catalisada por lipase.

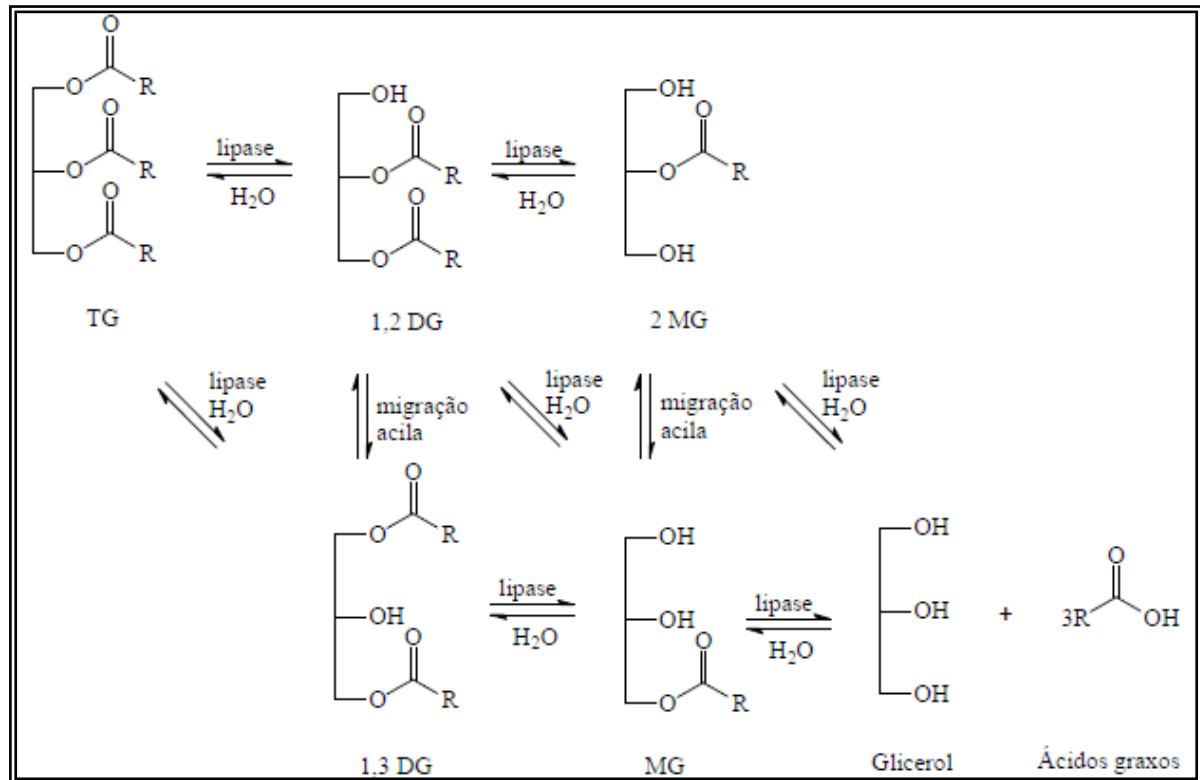
FIGURA 36 – Mecanismo de reação de aminólise catalisada por lipase



Fonte: Gotór-Fernandez e Gotor, 2006c.

**3.6.2.3 - HIDRÓLISES:** Lipases hidrolisam triglicerídeos em suas partes componentes e ainda formam glicerol. A figura 37 apresenta um esquema geral para este tipo de hidrólise. (ADAPTADA, FUREBY *et al*, 1997).

FIGURA 37 – Esquema geral de reações de hidrólise catalisada por lipase



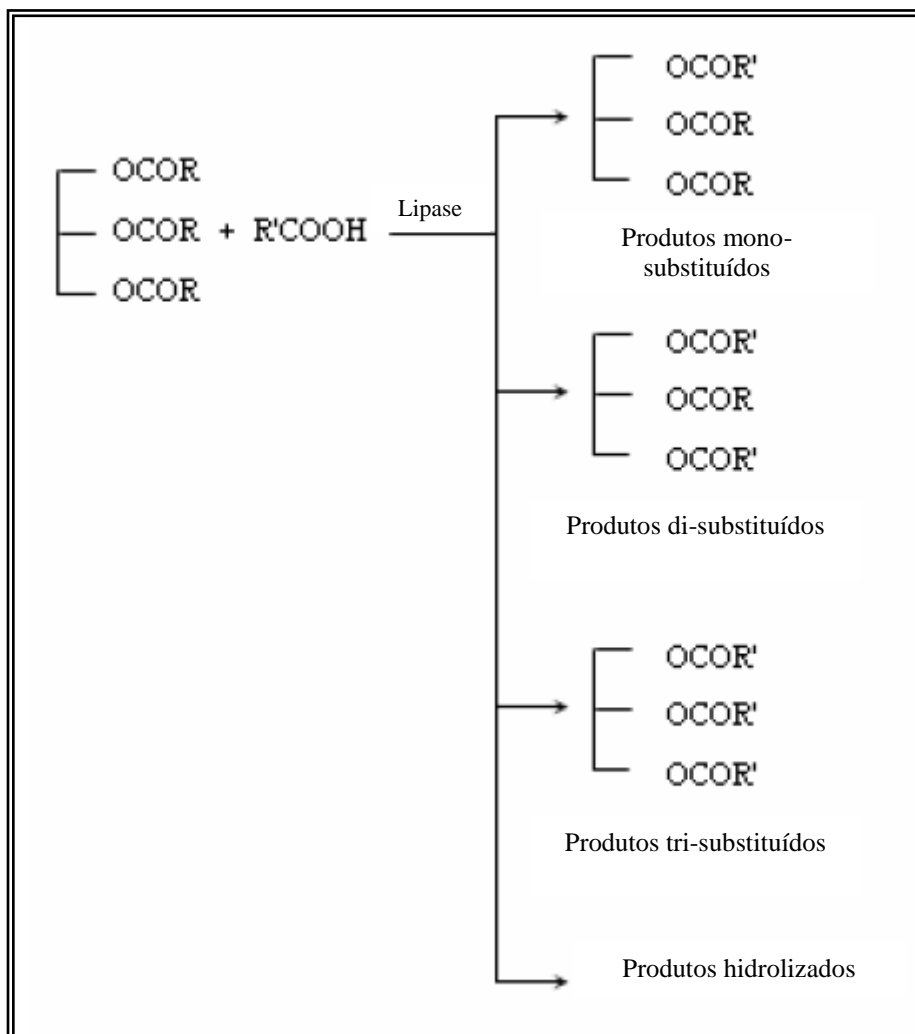
Fonte: Fureby e colaboradores, 1997.

**3.6.2.4 - TRANSESTERIFICAÇÃO:** hidrólise de triglicerídeos na presença de álcool para formar metil-ésteres e glicerol. Uma nova rota enzimática para produção de metil-ésteres a partir de óleo de soja foi sugerida por Xu e colaboradores (2003). Eles utilizaram uma lipase de *Candida antarctica* (Novozyme 435) e obtiveram ésteres metílicos com 92% de rendimento.

Ésteres também podem ser sintetizados por transesterificação. As principais vantagens se comparado com a síntese direta são: moléculas de água não são formadas nem são consumidas na reação e estabilidade da enzima é geralmente alta sob essas condições (RAJENDRAN *et al*, 2009).

**3.6.2.5 - INTERESTERIFICAÇÃO:** esse é um dos processos mais importantes para alteração das características físico-químicas de óleo e gorduras. Lipases são solúveis em água, mas os triglicerídeos de longa cadeia não são. Dessa forma, os estudos de interesterificação ocorrem na presença de pequenas quantidades de água ou em emulsão. Lipases catalisam interesterificações e hidrólises como mostra a figura 38 (ADAPTADA GOTO *et al*, 1995).

FIGURA 38 – Esquema geral de interesterificações e de hidrólises catalisadas por lipase



Fonte: Goto e colaboradores, 1995.

Transesterificações catalisadas por lipases tem ocupado um lugar proeminente na indústria de óleos para a modificação estrutural de lipídeos a partir de modificações enzimáticas que são específicas e que podem ocorrer em condições moderadas de reação (GUPTA *et al*, 2003).

Durante o processo, ácidos graxos são trocados entre triacilgliceróis até que equilíbrio termodinâmico seja estabelecido. Alguns vegetais apresentam composição química não-específica, para serem utilizados esses óleos são modificados quimicamente por interesterificação. Usmani e colaboradores (2010) utilizaram interesterificações catalisadas por lipases na produção de óleos químicos a partir de óleos não tradicionais.

**3.6.2.6 - ESTERIFICAÇÃO:** reação entre um álcool e um ácido produzindo éster e água. Reações de síntese de ésteres fazem uso da lei da ação das massas para

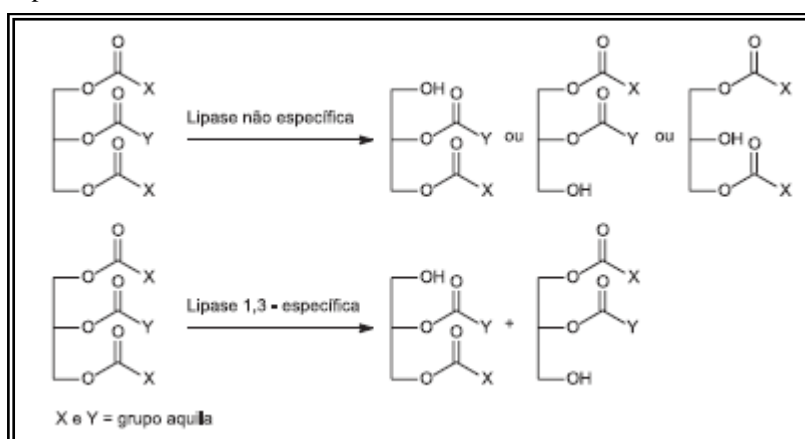


direcionar o equilíbrio na direção da síntese removendo a água gerada durante a reação. Rendimentos ótimos para as esterificações foram determinados a partir da concentração ótima do substrato e da enzima. Os efeitos de inibição dos ácidos são fortemente atenuados pela redução da quantidade de ácido e aumento na quantidade de enzima no meio reacional. A performance da esterificação é independente da estrutura do álcool, com atividade máxima ocorrendo para álcoois primários. Álcoois secundários e terciários têm uma diminuição na velocidade da reação por aproximadamente 40%. A síntese de ésteres pode ser maximizada para substratos que contenham excesso de doadores acila (BRUNO *et al*, 2004).

### 3.6.3 Substratos

Lipases são atualmente fundamentais em aplicações na indústria e laboratórios. Diferentes lipases aparentemente são específicas na divisão de vários ácidos graxos. A especificidade da lipase pode ser controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e fatores que afetam a ligação entre enzima e substrato. Elas podem agir de maneira específica ou não-específica resultando na completa hidrólise de triacilglicerídeos em seus constituintes. A figura 39 (ADAPTADA, PAQUES e MACEDO, 2006), apresenta um esquema geral para a catálise de lipases específica e não-específica.

FIGURA 39 – Esquema geral de catalises por lipases específicas e não-específicas



Fonte: Paques e Macedo, 2006.

A especificidade da enzima é mostrada tanto em relação ao ácido graxo ou álcool. Elas também mostram regioespecificidade e estereoespecificidade com relação a quantidade de álcool e seu substrato. Lipases podem ser divididas em dois grupos com base na

regioespecificidade exibida no substrato acil-glicerol. O primeiro grupo de lipases catalisa a completa quebra do triacilglicerol em glicerol e três ácido graxos livres, junto com diacil- e monoacilglicerol como intermediários na reação. O segundo tipo, forma os ácidos graxos especificamente a partir das posições 1 e 3 do acilglicerol (PATIL *et al*, 2011).

Estereoespecificidade é a habilidade que a lipase tem em discriminar os enântiômeros de um par racêmico. Esse é um processo muito difícil de se obter por métodos químicos. As lipases têm sido extensivamente utilizadas em reações estereoespecíficas para gerar compostos opticamente puros como ésteres alifáticos e aromáticos, álcoois, ácidos e lactonas (WELSH e WILLIAMS, 2002).

#### **3.6.4 Estabilidade em solventes orgânicos**

Um dos maiores prejuízos do uso de enzimas em síntese orgânica é a pouca solubilidade da maioria dos compostos orgânicos com mais de quatro átomo de carbono quando o processo ocorre em meio aquoso. A água é o pior solvente para aplicações na indústria química pois a maioria dos compostos orgânicos são geralmente instáveis nessa solução. Além disso a remoção de água é mais tediosa e cara quando comparadas ao uso de solventes orgânicos, já que estes possuem baixos pontos de ebulição. O uso de solventes orgânicos apresentam algumas vantagens:

1. Fácil recuperação do substrato e produtos com altos rendimentos;
2. Possibilidade de uso de substratos apolares;
3. Não ocorrência de reações laterais;
4. Em alguns casos as lipases são termodinamicamente mais ativas;
5. Deslocamento do equilíbrio termodinâmico favorecer mais a síntese que a

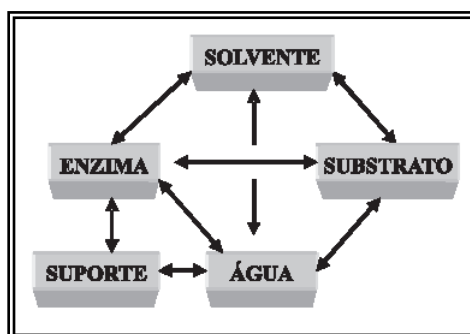
hidrólise.

As lipases são especialmente estáveis em solventes orgânicos, a facilidade com que estas enzimas aceitam uma variedade de substratos não-naturais e de tamanhos diversos, sugere que a espinha dorsal polipeptídica é flexível e pode adotar diferentes conformações. Como consequência, a baixa barreira de energia que é necessária para que ocorram mudanças conformacionais dificulta a modelagem e a previsão das interações estereoquímicas para este grupo de biocatalisadores. Outra característica das lipases é de que as esterificações por elas catalisadas em solventes orgânicos são frequentemente mais enantiosseletivas que as reações hidrolíticas correspondentes em água. O fato de que muitas enzimas mantêm atividade catalítica em solventes orgânicos não possui explicação simples. A hipótese correntemente

aceita é de que, quando a enzima é colocada em um solvente orgânico anidro, esta é cineticamente *congelada* no estado nativo. Isto ocorre em parte devido a baixa constante dielétrica do meio, que produz uma maior efetividade nas forças eletrostáticas responsáveis pela manutenção da estrutura enzimática (COSTA e AMORIM, 1999).

Lipases são geralmente estáveis em solventes orgânicos, podendo ser excepcionalmente estimuladas ou inibidas, a depender do solvente utilizado. Eventualmente altos estímulos são notados na presença de acetona, isopropanol e etanol, mas sendo inativada por metanol (SHARMA *et al*, 2009). A heterogeneidade do sistema biocatalítico, em meio orgânico implica em uma relação mútua entre os diferentes componentes do sistema, como mostra a figura 40.

FIGURA 40 – Relação entre os componentes envolvidos numa reação biocatalisada



Quando um biocatalisador ou uma preparação enzimática é selecionado para determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos devem ser avaliadas e otimizadas. A simples relação entre dois componentes pode levar a uma interpretação errônea (ROCHA, 1998).

A água é talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico, uma quantidade mínima de água, que é dependente do tipo de solvente e das características do suporte utilizado, é absolutamente necessária para a solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise e não de síntese (ROCHA, 1998).

As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando ligadas covalentemente a um suporte. A água contribui para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, e pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima.

A influência da natureza do solvente tem sido interpretada em termos de vários fenômenos, tais como a mudança da rigidez da enzima causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas na proteína. O solvente pode estabilizar as cargas no estado de transição através da modificação da polaridade do sítio ativo, bem como a variação da energia total, que estão associadas com diferentes energias de solvatação do solvente (LANG, 1996).



# *Resultados e Discussão*

*“Amái a justiça, vós que julgais a terra, pensai  
no Senhor com retidão, procurai-o com  
simplicidade de coração.”*

*Sb 1,1*

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo encontram-se todos os resultados obtidos para as reações realizadas. Ele encontra-se dividido em duas partes basicamente, correspondentes aos resultados para os procedimentos realizados com as células íntegras de espécies vegetais e àqueles obtidos para as reações que utilizaram lipases comerciais na acilação do fármaco cloranfenicol.

### **4.1 Procedimento realizado com células íntegras**

#### ***4.1.1 Screening de vegetais***

As espécies vegetais utilizadas nesse estudo foram selecionadas usando como critério o fato de algumas já serem conhecidas popularmente como importantes fontes protéicas. Assim as várias espécies e variedades de feijão, bem como os outros vegetais foram selecionados para investigar os seus níveis de proteínas. Levou-se em consideração também o fato de sua abundância local e facilidade de aquisição. Foram analisadas espécies classificadas em tubérculos, frutos e legumes, destacando-se o feijão, por possuir grande variedade. Neste trabalho, em relação ao feijão, selecionou-se três espécies com diferentes variedades, sendo elas: o feijão carioca e o preto, que são variedades diferentes de uma mesma espécie; o feijão de corda e feijão verde, que pertencem a mesma variedade, mas em estados maturacionais distintos; bem como a fava. Nas reações realizadas não foram utilizadas as partes inteiras das espécies, estes foram divididos em raízes, polpa, ou sementes, e utilizada a parte a qual fosse mais conveniente. As espécies e variedades selecionadas para o estudo protéico, seus nomes científicos, bem como as partes utilizadas como biocatalisador encontram-se descritas na tabela 16.

TABELA 16: Fontes vegetais utilizadas no screening para o estudo de biocatálise

<b>Vegetais</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Parte do vegetal utilizada</b>
Batata doce	<i>Ipomoea batatas L</i>	Polpa sem casca
Beterraba	<i>Beta vulgaris L</i>	Polpa sem casca
Inhame	<i>Dioscorea cayenensis</i>	Polpa sem casca
Maxixe	<i>Cucumis anguri L.</i>	Polpa
Quiabo	<i>Abelmoschus esculentus</i>	Polpa
Abacate	<i>Persea americana</i>	Polpa sem casca e sem semente
Abacaxi	<i>Ananás comosus</i>	Polpa sem casca
Mamão	<i>Carica papaya</i>	Polpa sem casca e sem semente
Feijão de corda	<i>Vigna unguiculata</i>	Semente
Feijão carioca	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Semente
Feijão preto	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Semente
Feijão verde	<i>Vigna unguiculata</i>	Semente
Fava	<i>Phaseolus lunatus L</i>	Semente

#### 4.1.2 Determinação de Proteínas

Existem vários métodos para a determinação de proteínas, que foram desenvolvidos para diferentes amostras, tais como células bacterianas (Biureto), proteínas dissolvidas (Bradford), soluções que contenham detergentes (BCA – Ácido Bicinconínico), proteína pura (absorção UV), alimentos (Biureto, Lowry, Bradford), plasma sanguíneo (Biureto, Lowry, Bradford), plantas (Lowry), entre outras (MIWA *et al*, 2008). Para Zaia e colaboradores (1998), vários fatores podem ser analisados antes da escolha da metodologia para determinação de proteína total, como sensibilidade, reprodutibilidade, simplicidade, poucas substâncias interferentes, disponibilidade de volume de amostra, rapidez, baixo custo, similaridade às concentrações ambientais e toxicidade do reagente. Poucos estudos metodológicos têm sido realizados para comparar o desempenho dos métodos espectrofotométricos na determinação de proteínas em diferentes meios.

A justificativa para o uso dos métodos de determinação de proteínas nesse trabalho se dá pelo fato de enzimas serem compostas de cadeias protéicas. Portanto, leva-se em consideração a sua composição, que a depender do método utilizado e do resultado apresentado pode ser um forte indicativo da presença de enzimas nos materiais analisados.

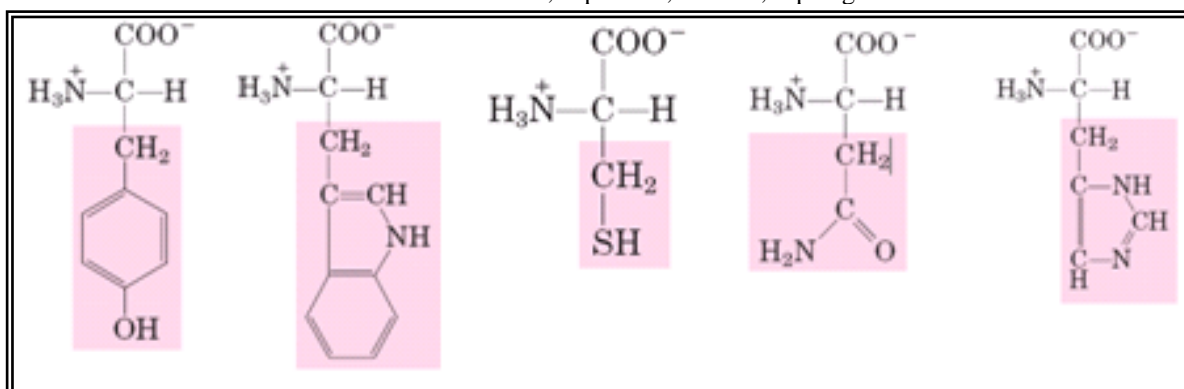
Devido as enzimas serem dotadas de atividade catalítica, busca-se então novas fontes alternativas destas, que possam atuar como catalisador em diferentes reações químicas dentro da área de biocatálise.

No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados os métodos de determinação de proteínas de Lowry, modificado por Hartree (1972) e o método de Bradford (1976), por serem mais amplamente utilizados e como citado acima, mais adequados para os tipos de amostras que nesse trabalho foram utilizadas. Além disso, os métodos foram escolhidos por se tratarem de análises colorimétricas que se baseiam na formação de compostos coloridos devido à reação de grupos ou radicais específicos da molécula de proteína com reagentes químicos, por apresentarem rapidez e facilidade de aplicação. As vantagens e desvantagens de cada método também foram consideradas para estas amostras e são discutidos logo em seguida a apresentação dos resultados.

#### 4.1.2.1 Método de Lowry

De acordo com a literatura, neste método, ocorre a redução dos constituintes ativos do reagente folin-fenol (reagente que contém molibdato, tungstato e ácido fosfórico) por meio das cadeias laterais de alguns aminoácidos como tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina (fig. 41). Estes, que contribuem segundo Zaia e colaboradores (1998), com quatro elétrons ou pela retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas, tornando a reação biureto mais sensível. Segundo Wilson & Walker (1995), o limite de detecção deste método é de  $1 \times 10^{-5} \text{ mg.L}^{-1}$ .

FIGURA 41 – Estruturas dos aminoácidos tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina





A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade e, por isto, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: determinação de proteínas extraídas de microorganismos (GANESH *and* LI, 2011; METZGER *et al.* 2009; ), análise de proteínas em sangue de insetos – hemolinfa (SLADKOVA *e* KHOLODKEVICH, 2011), determinação de proteínas em águas residuais (AVELLA *et al.* 2010), análise de proteínas em farelo de soja (STENZEL *et al.*, 2009), inclusive determinação do teor de proteínas em músculo esquelético de ratos (SEEVARATNAM *et al.* 2009).

Apesar do método de Lowry apresentar uma grande sensibilidade para proteínas, o mesmo possui algumas desvantagens, tais como: estar sujeito a muitos interferentes, apresentar longo tempo de análise, possuir absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas, e seguir a Lei de Beer-Lambert apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas (ZAIA *et al.*, 1998).

Muito embora este método apresente boa sensibilidade e precisão, algumas substâncias atuam como interferentes levando a um falso resultado. A interferência pode causar aumento ou redução no valor de absorção da amostra, bem como podendo formar precipitado com alta concentração de sal.

A lista de interferentes incluem substâncias como lipídeos, detergentes, tampões, sulfato de amônio, EDTA, açúcares (como glucose e sucrose), sais de fosfato, citrato, magnésio e Tris (LUCARINI *and* KILIKIAN, 1999). A tabela 17 apresenta os interferentes mais comuns e seus efeitos.

TABELA 17 – Lista de interferentes na análise pelo método de Lowry

<b>Interferente</b>	<b>Tipo de Interferência</b>
Compostos fenólicos	Reagem com o reativo de Folin, resultando em falso positivo
Lipídios	Turbidez da amostra na amostra, resultando em falso positivo
Detergentes	Provocam a formação de precipitado
Ácido úrico	Reagem com o reativo de Folin, resultando em falso positivo
Guanina e xantina	Reagem com o reativo de Folin, resultando em falso positivo
Sulfato de amônio	Diminui a absorvidade devido à alteração do pH da amostra
Melanina	Reage com o reativo de Folin, resultando em falso positivo
Mercaptanas e cisteína	Reagem com o reativo de Folin, resultando em falso positivo
Tampão tris-HCl	Reage com o reativo de Folin, resultando em falso positivo
Açúcares	Reagem com o reativo de Folin, resultando em falso positivo

As análises dos extratos aquosos das espécies selecionadas obtidos conforme procedimento descrito no item 5.4.2, levou a resultados bem divergentes, porém satisfatórios, levando em consideração a diversidade de material vegetal analisada. A tabela 18 apresenta os valores de concentração (em g/L) de proteínas presente nos extratos aquosos das espécies selecionadas. O procedimento realizado está descrito no item 5.4.3, do capítulo de procedimento experimental.

TABELA 18 – Concentração de proteínas nos materiais vegetais utilizados pelo método de Lowry

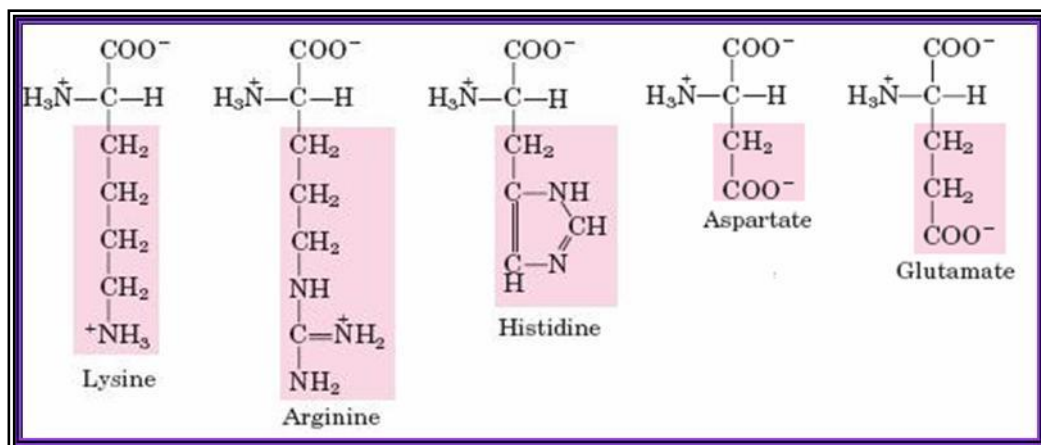
<b>Entrada</b>	<b>Vegetal</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
1	Feijão de corda (F1)	10,6
2	Feijão carioca (F2)	6,8
3	Feijão preto (F3)	5,9
4	Feijão fava branca (F4)	7,9
5	Feijão verde (F5)	9,8
6	Beterraba	0,95
7	Batata doce	0,087
8	Inhame	0,084
9	Maxixe	0,22
10	Quiabo	0,3
11	Abacate	1,1
12	Abacaxi	0,6
13	Mamão	0,34

De acordo com os resultados apresentados os índices de proteínas verificados foram bastante divergentes. As espécies de feijões (F1-F5), apresentaram elevados índices de concentração protéica, valores esses bem superiores aos encontrados para as outras espécies analisadas. O que já era esperado, tendo em vista que são espécies onde comumente se relata os elevados valores de proteínas (FROTA *et al.*, 2008; TOLEDO *and* CANNIATTI-BRAZACA, 2008; MECCHI, *et al.* 2005; DONADEL *and* PRUDÊNCIA-FERREIRA, 1999). Com relação aos outros vegetais analisados, todos apresentaram baixas concentrações, com valores inferiores à 1g/L evidenciando a pouca presença de proteínas do tipo macromoleculares. Cita-se como destaque a medição realizada para o abacate que apresentou valor de 1,1g/L (entrada 11, tabela 18), valor este que indica falso positivo, pois como em sua composição há uma elevada quantidade de matéria graxa (MASSAFERA *et al.*, 2010), que é um dos interferentes para este teste, não pode-se mencionar este valor como confiável. Com base no teor protéico as espécies mais indicadas para o estudo de biocatálise foram as de feijão (F1 e F-2).

#### 4.1.2.2 Método de Bradford

No método de Bradford, as leituras são feitas a 595 nm (BRADFORD, 1976) e o limite de detecção é de  $2 \times 10^{-5}$  mg.L<sup>-1</sup> (WILSON *and* WALKER, 1995). Nesse processo ocorre ligação do corante azul de Coomassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para que isto aconteça, a proteína deve ter estrutura macromolecular, ou seja, de 8-9 ligações peptídicas no mínimo. Este corante se liga principalmente a resíduos de aminoácidos básicos ou aromáticos, especialmente arginina (figura 42). A ligação ocorre em dois minutos e esta dura aproximadamente duas horas (Bradford, 1976). Segundo Zaia et al (1998), no pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA *et al*, 1998; LUCARINI *and* KILIKIAN, 1998).

FIGURA 42 – Estruturas dos aminoácidos lisina, arginina, histidina, aspartato e glutamato



Este método está sujeito a um número bem menor de interferentes, porém apresenta algumas desvantagens, tais como variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade. Outra desvantagem é que a ligação com o corante vai depender sensivelmente do tamanho da proteína e da sua composição de aminoácidos. Relata-se que este corante interage fracamente com resíduos de tirosina, fenilalanina, e triptofano. A tabela 19 apresenta alguns dos interferentes na determinação de proteínas pelo método de Bradford (SILVA *and* ARRUDA, 2006; ZAIA *et al*, 1998).

TABELA 19 – Interferentes no método de Bradford

<b>Entrada</b>	<b>Interferente</b>	<b>Tipo de Interferência</b>
1	Cloreto de Sódio e Potássio	Fornecem Falso negativo acima de 1M
2	Detergente	Reage com o corante, resultando em Falso Positivo
3	Ciclodextrinas	Formam um complexo com o corante, resultando em falso positivo
4	Polifenóis e Polifenóis Oxidases	Reagem com as proteínas impedindo a formação delas com o corante
5	Glicerol	Provoca falso positivo
6	Lipídeos	Causam turbidez na amostra
7	Fluoreto	Diminui a absorção da amostra

Todas as amostras foram analisadas usando o mesmo procedimento experimental, descrito no item 5.4.4. Os valores de concentração obtidos através da análise pelo referido método estão apresentados na tabela 20.

TABELA 20 – Concentração de proteínas nos materiais vegetais utilizados pelo método de Bradford

<b>Entrada</b>	<b>Vegetal</b>	<b>Concentração</b>
1	Feijão de Corda (F1)	2,0 g/L
2	Feijão carioca (F2)	1,1 g/L
3	Feijão Preto (F3)	1,2 g/L
4	Feijão Fava Branca (F4)	1,5 g/L
5	Feijão Verde (F5)	1,8 g/L
6	Beterraba	17,4 mg/L
7	Batata doce	14,8 mg/L
8	Inhame	28,1 mg/L
9	Maxixe	6,2 mg/L
10	Quiabo	32 mg/L
11	Abacate	552,5 mg/L
12	Abacaxi	43,8m g/L
13	Mamão	31,7 mg/L

De acordo com os resultados exibidos, as espécies de feijão foram as que apresentaram os melhores valores de concentração de proteínas, corroborando com os dados obtidos através do método de Lowry, merecendo destaque as espécies de feijão do tipo corda e fava branca. As outras amostras analisadas apresentaram índices de concentração bem inferiores, também de acordo com a análise feita através do outro método. As amostras F-1 e F-5, que se tratam da mesma espécie, mas em estados maturacionais distintos, apresentaram valores de concentração semelhantes, confirmando também resultado obtido em experimento anterior. Em situação semelhante e já descrita, merece destaque a concentração protéica apresentada pelo abacate. E também neste caso, trata-se de um dado não-confiável, tendo em vista que sua constituição há substâncias que são consideradas como interferentes nessa análise e que causam um falso positivo.

Os valores obtidos por essa metodologia apresentaram-se inferiores quando comparados à metodologia de Lowry, visto que, ambos identificam proteínas diferentes. Pode-se então com base nesses resultados sugerir, que tais materiais analisados têm um perfil protéico mais compatível com as proteínas identificadas através do método de Lowry.

De acordo com a literatura, os feijões apresentam basicamente a mesma composição química, diferenciando apenas nos valores (MESQUITA *et al*, 2007; TEIXEIRA *et al*, 1985; FROTA *et al*, 2008). Isto confirma o elevado valor de proteínas encontrados para as espécies analisadas. Ainda de acordo com a literatura, o aminoácido lisina é comum à todas as proteínas de leguminosas, sendo estas também deficientes em aminoácidos sulfurados. Como a lisina é um aminoácido identificado pelo método de Lowry, pode-se usar esse dado como justificativa, para os altos valores de concentração obtidos por este método.

Diversos fatores devem ser analisados antes da escolha da metodologia adequada para determinação de proteínas totais em qualquer tipo de amostra. Segundo Zaia *et al* (1998), o principal deles é o conhecimento mais preciso possível dos constituintes da amostra e de suas concentrações, o que facilita na identificação de possíveis interferentes e ajuda na escolha do método mais apropriado. O método de Lowry foi o escolhido para este tipo de amostra, pois além de ter reagente específico, mede, de acordo com Lowry *et al* (1951), moléculas tão pequenas quanto os dipeptídeos, revelando ser um ensaio interessante, pois não superestima as concentrações de proteínas. As substâncias que poderiam interferir na quantificação de proteínas através deste método seriam compostos fenólicos, lipídeos, detergentes, carboidratos, cálcio, magnésio entre outras (PETERSON, 1979; ZAIA *et al*, 1998).

A presença de carboidratos na composição das amostras de F-1 a F-5, poderia resultar em um interferente, porém como estes foram retirados da amostra antes de sua análise, pode-se inferir na adequação do método para este tipo de análise. O método de Bradford não foi muito adequado apesar do baixo custo de reagentes e porque detecta somente moléculas de proteínas com 8-9 ligações peptídicas (BRADFORD, 1976) e, portanto, subestima as concentrações protéicas. Nesta pesquisa, a maior concentração obtida com o método de Bradford foi 2g/L, enquanto que no método de Lowry, a maior concentração foi 10,6 g/L.

## **4.2 Seleção dos vegetais e obtenção dos extratos aquosos**

Baseado nos valores de concentração de proteínas obtidos pelos métodos já apresentado e discutidos, selecionou-se então as espécies que apresentaram os melhores índices protéicos para serem utilizados nos processos de biorredução. Nesse caso foram selecionadas as amostras: F-1 F-2, F-3, F-4, F-5.

A obtenção dos extratos aquosos ocorreu conforme procedimento descrito no item 5.4.1.

## **4.3 Screening de feijões**

### ***4.3.1 Reações em meio aquoso***

As biotransformações mediadas por espécies de feijão, foram realizadas reações de biorredução com o substrato acetofenona, reações de hidrólise com benzoato de metila e redução de grupo nitro com o substrato cloro-nitrobenzeno, conforme mostra o esquema reacional da figura 43. A metodologia empregada encontra-se descrita no item 5.5.1, do capítulo procedimento experimental. As amostras foram analisadas por CG/EM e revelou a bioconversão dos substratos utilizados. Os cromatogramas obtidos encontram-se nas figuras 44 e 45. A figura 46 apresenta o cromatograma da resolução do álcool 1-fenil-etanol. A tabela 21 apresenta os valores de conversão e de excesso enantiomérico obtidos para os procedimentos realizados.

FIGURA 43 – Estruturas de acetofenona (1), *p*-cloro-nitrobenzeno (2) e benzoato de metila (3)

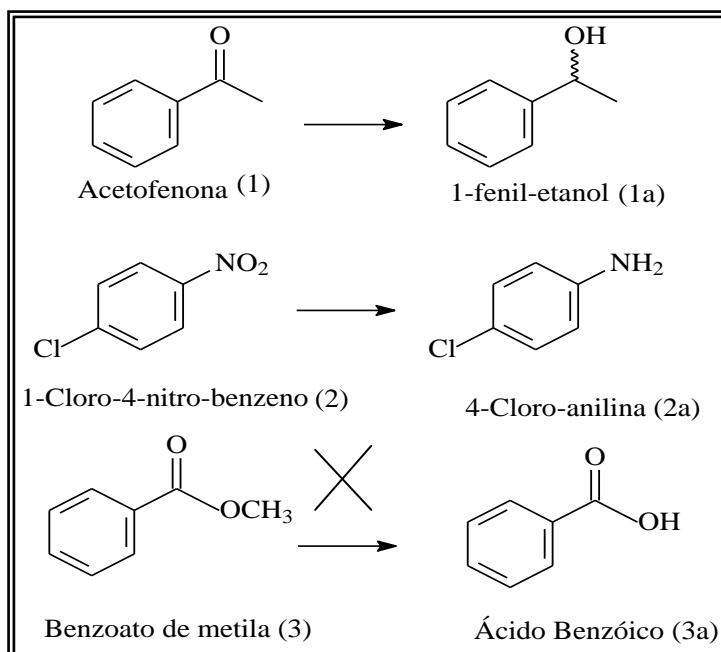


TABELA 21 – Resultados do primeiro screening de reações realizado com espécies de feijão

Entrada	Feijão	1-fenil-etanol (%)	e.e(%)	Cloro-anilina (%)	Ácido Benzóico (%)
1	F-1	87,3	63,1 ( <i>S</i> )	27,1	N.R
2	F-2	98,5	61,4 ( <i>R</i> )	19,7	N.R
3	F-3	79,1	38,1 ( <i>R</i> )	10,0	N.R
4	F-4	62,7	25,1 ( <i>S</i> )	11,3	N.R
5	F-5	62,5	29,3 ( <i>S</i> )	32,1	N.R

N.R – Não reagiu

FIGURA 44 – Separação cromatográfica em CG/EM de 4-cloro-1-nitro-benzeno e 4-cloro-anilina

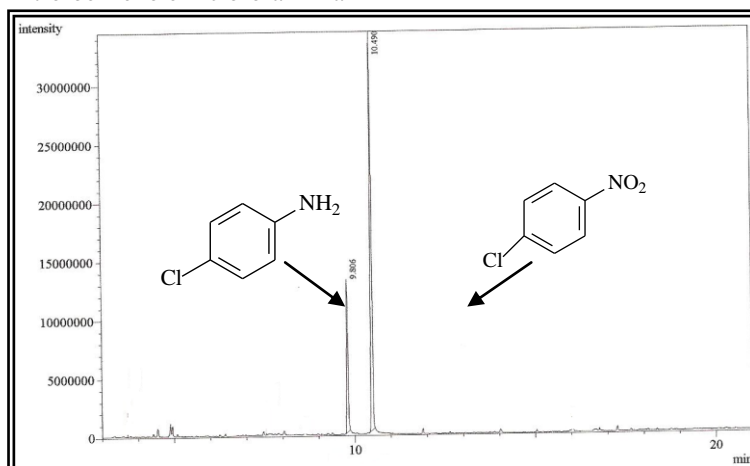




FIGURA 45 – Separação cromatográfica em CG/EM de 1-fenil-etanol e acetofenona

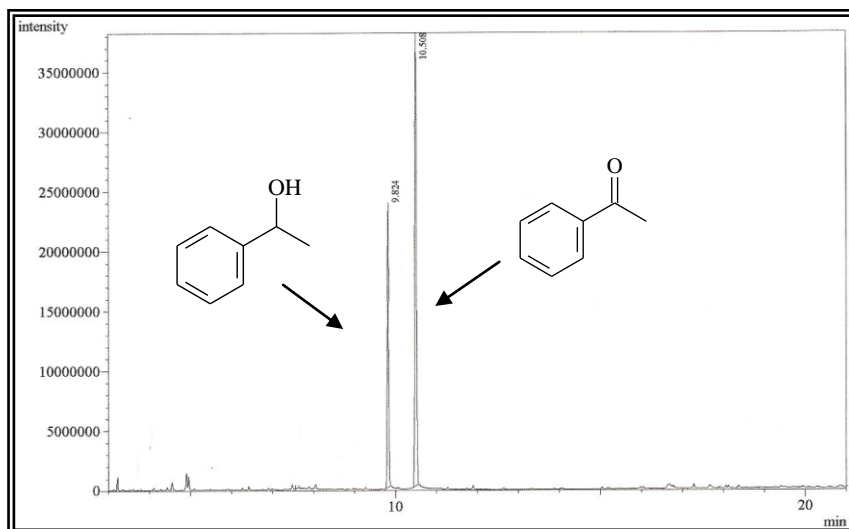
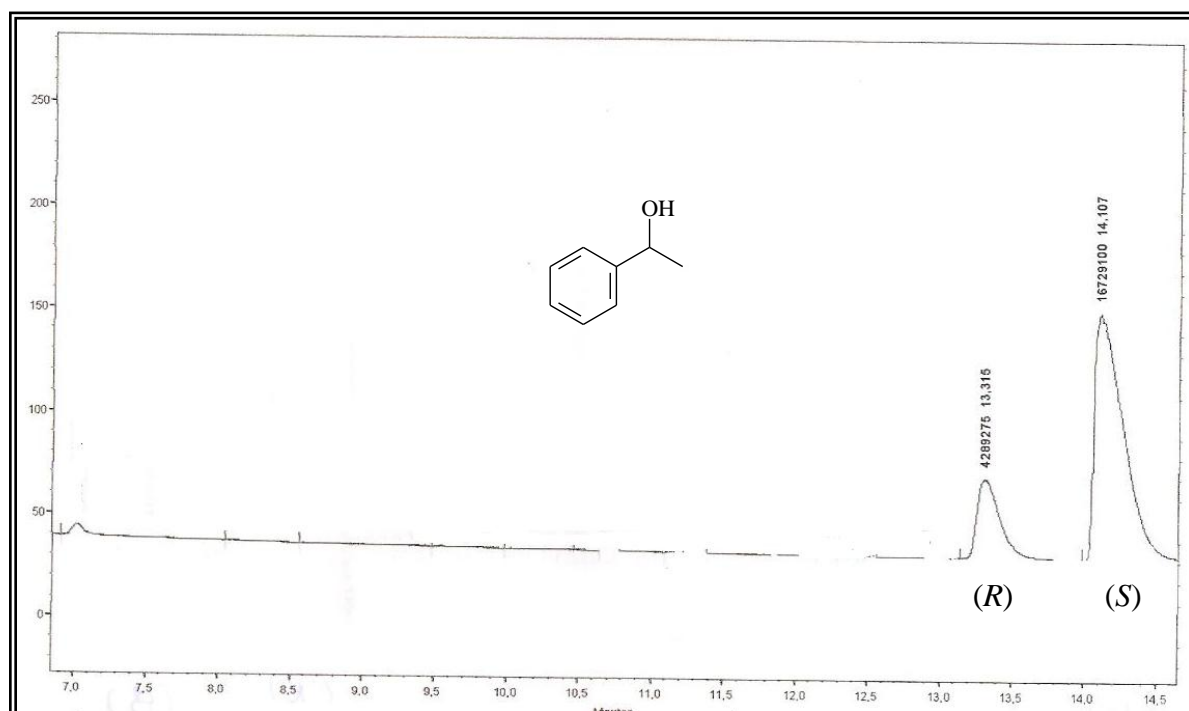


FIGURA 46 – Cromatograma de resolução dos enantiômeros do 1-fenil-etanol (1a) em CG/DIC



De acordo com os resultados exibidos na tabela 21, verifica-se que para as reduções da acetofenona apresentaram-se entre moderadas e excelentes. Vale destaque para a reação com F-2, a qual apresentou praticamente conversão total, já no caso das espécies F-4 e F-5, os resultados obtidos podem ser considerados moderados. Em se tratando de excesso enantiomérico, todas as espécies exibiram resultados não satisfatórios. Confirmando a não

eficiência nesse tipo de reação, as espécies F-4 e F-5, também apresentaram baixos valores de excesso (entrada 4 e 5) para o enantiômero (*S*) do álcool obtido. As espécies F-1 e F-2, foram as que exibiram os melhores valores de *e.e* (entradas 1 e 2), e com configurações opostas, o primeiro, originou o isômero (*S*), e o segundo o isômero (*R*), entretanto estes valores ainda são considerados baixos, pois o objetivo é a obtenção de um enantiômero puro.

Nas reduções de 1-cloro-4-nitro-anilina, objetivou-se a redução do grupamento nitro. De acordo com a tabela 21, todas as espécies apresentaram-se ativas para este tipo de redução, entretanto mostraram baixos valores de conversão. Muito embora, sejam baixos os percentuais obtidos para o produto desejado, é um fator positivo, visto que as reduções de grupamento nitro não são muito fáceis de serem realizadas, inclusive quimicamente, em virtude disso, não há muitos relatos na literatura para esse tipo de biorredução. Observa-se ainda que, nesse caso, como no anterior, a espécie mais ativa foi F- (ver entrada 1) para obtenção do produto amino. Sugere-se então, que essa espécie seria mais indicada para esse tipo de redução, necessitando estudos mais aprofundados para otimização desses resultados.

Para as reações de hidrólise do éster benzoato de metila, nenhuma das espécies apresentou a formação do produto desejado, portanto, estas não são adequadas para este tipo de reação.

#### 4.3.2 Reações em tampão fosfato

Com o objetivo de melhorar as conversões e os *e.e* observados no procedimento anterior, resolveu-se então realizar as reduções de acetofenona (1) com o extrato enzimático em tampão fosfato pH 6,5. Para extração dessas enzimas utilizou-se metodologia adaptada, que encontra-se no item 5.5.2. Utilizando nesse caso como biocatalisador, somente o extrato enzimático da espécie F-1, as reações foram executadas e em seguida analisadas as amostras obtidas. O procedimento adotou metodologia descrita no item 5.5.2. A tabela 22 apresenta os volumes de reação utilizados e os resultados obtidos.

TABELA 22 – Resultados obtidos para reações realizadas em meio tamponante

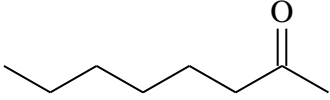
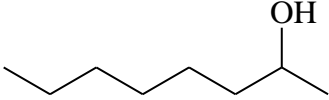
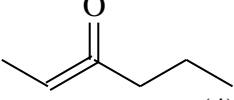
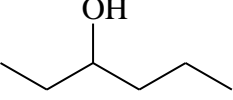
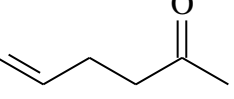
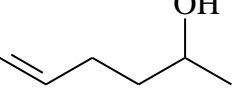
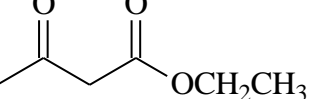
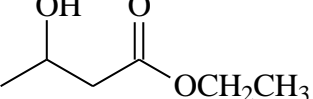
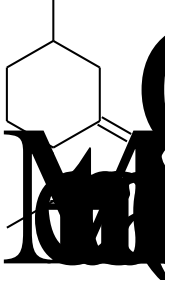
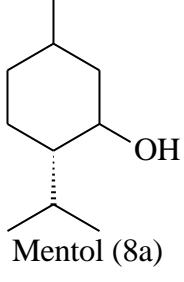
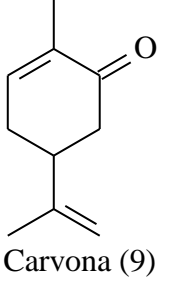
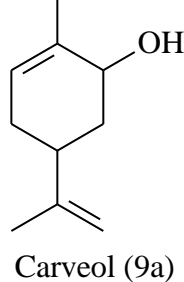
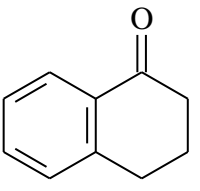
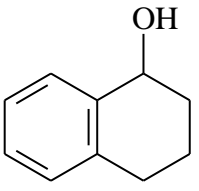
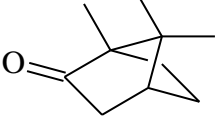
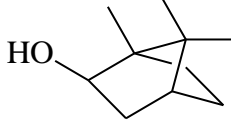
<b>Entrada</b>	<b>Volume do tampão (mL)</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b><i>e.e</i>(%)</b>
1	5	10,8	88,5 ( <i>S</i> )
2	10	8,9	91,8 ( <i>S</i> )
3	25	16,6	95,7 ( <i>S</i> )

Conforme dados da tabela 22, foram obtidos valores de conversão bem inferiores ao procedimento descrito anteriormente. Muito embora se tenha utilizado volumes bem menores (entre 5 e 10 mL), observou-se uma redução nos valores de conversão, que não ultrapassaram 16,6%. Caso contrário ocorreu quando relacionou-se o valor de *e.e.*, onde foi notório o seu aumento, que também aconteceu à medida que se aumentou o volume utilizado nas reações. Chegando ao máximo de 96% (entrada 3) para o enantiômero *S*. O isômero obtido ainda foi o mesmo observado para as reações descritas anteriormente em meio aquoso, ou seja, a utilização do meio tamponante não afetou as características de formação do isômero (*S*) das enzimas presentes no extrato dessa espécie. Em virtude do trabalho dispendioso requerido por esse procedimento, e das baixas conversões obtidas, mesmo com as significativas melhoras nos valores de *e.e.*, essa metodologia não foi mais utilizada como parte deste trabalho.

#### **4.4 Preparo dos padrões via química**

Após verificada a eficiência das enzimas presentes nas espécies vegetais utilizadas em processos de biorredução, seguiu-se o estudo ampliando essa atividade na redução de outros compostos. Para isso, utilizou-se como substratos, compostos de diversas classes funcionais, entre elas: cetonas aromáticas, cetonas alifáticas, cetonas  $\alpha,\beta$  insaturadas e  $\beta$ -ceto-éster, (figura 47).

FIGURA 47 – Estruturas das cetonas e seus respectivos produtos de redução usadas nas biotransformações

 <p>Octan-2-ona</p>	 <p>Octan-2-ol (4a)</p>
 <p>hexan-2-ona (4)</p>	 <p>hexan-2-ol (5a)</p>
 <p>5-hexen-2-ona (6)</p>	 <p>5-hexen-2-ol (6a)</p>
 <p>3-oxo-butanoato de etila (6)</p>	 <p>3-hidróxi-butanoato de etila (7a)</p>
	 <p>Mentol (8a)</p>
 <p>Carvona (9)</p>	 <p>Carveol (9a)</p>
 <p>Tetralona (10)</p>	 <p>Tetralol (10a)</p>
 <p>Cânfora (11)</p>	 <p>Cânferol (11a)</p>

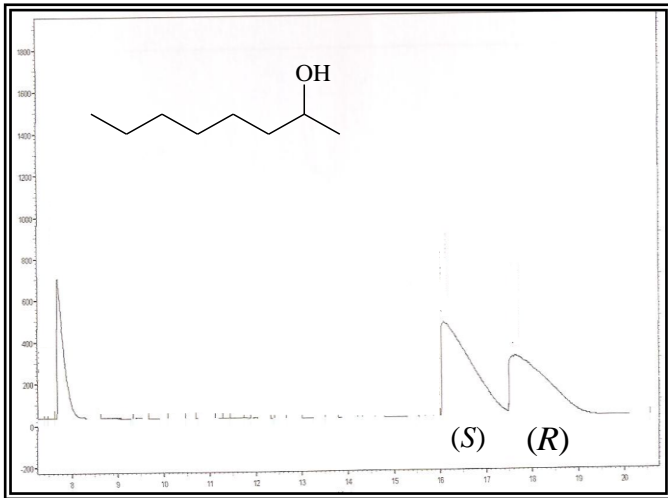
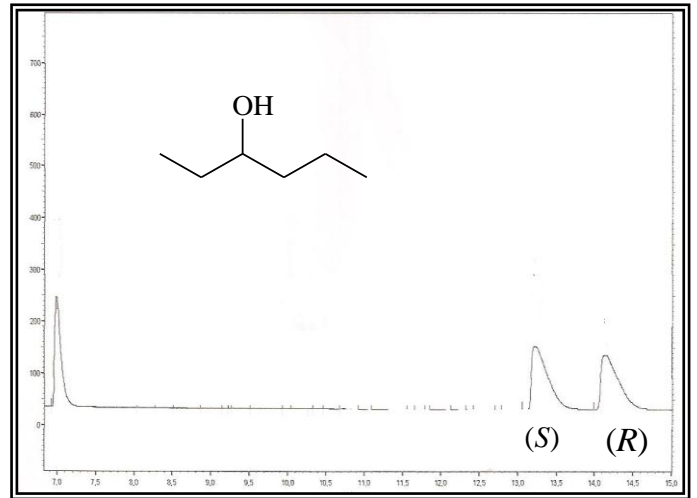
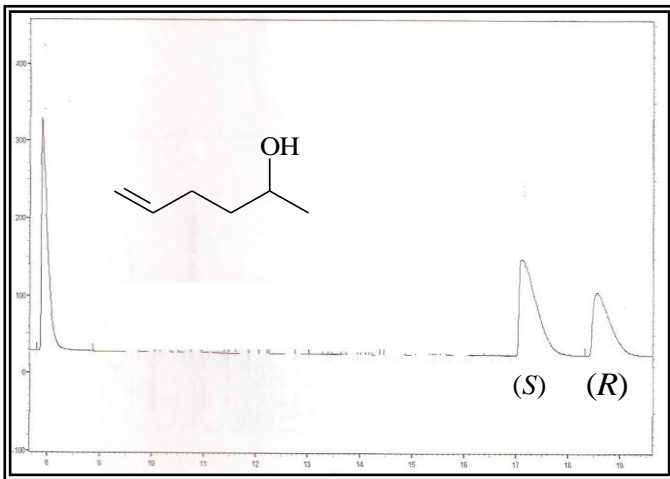
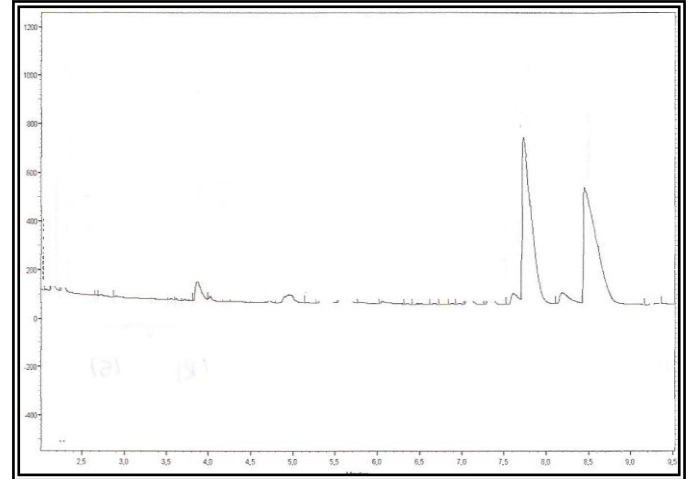
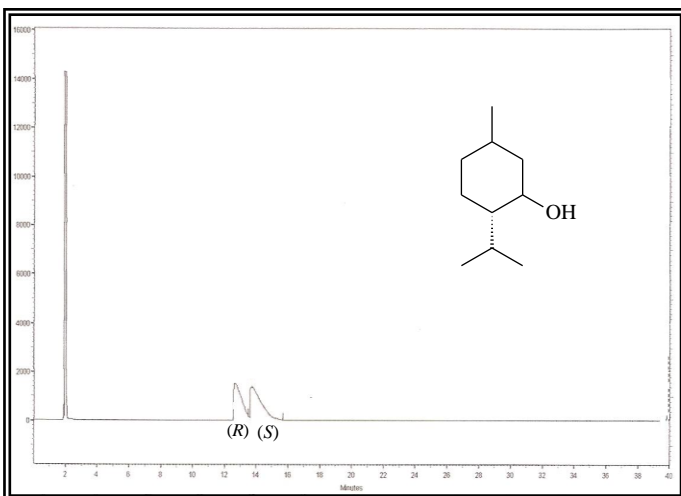
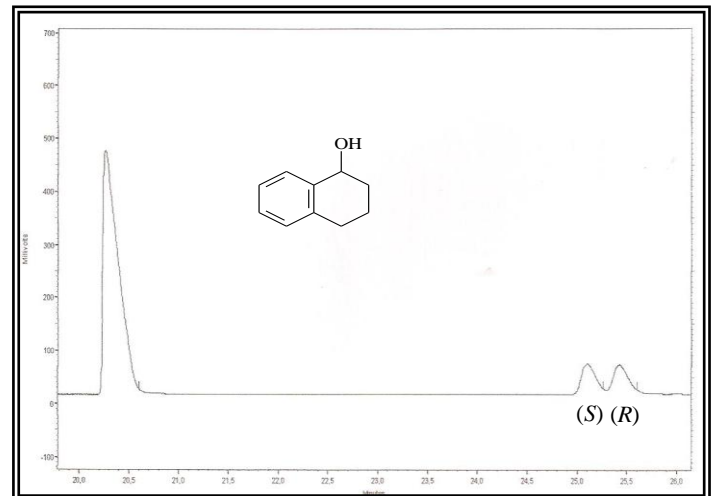
Esses substratos foram submetidos inicialmente ao processo de redução química, conforme procedimento descrito no item 5.6. A tabela 23 apresenta os valores de rendimentos obtidos após as reações químicas e purificação dos produtos.

TABELA 23 – Rendimento das reações químicas do preparo de padrões

<b>Entrada</b>	<b>Reagente</b>	<b>Produto</b>	<b>Rendimento (%)</b>
1	Octan-2-ona	Octan-2-ol	76
2	Hexan-2-ona	Hexan-2-ol	53
3	5-hexen-2-ona	5-hexen-2-ol	51
4	3-oxo-butanoato de etila	3-hidróxi-butanoato de etila	92
5	Mentona	Mentol	63
6	Carvona	Carveol	57
7	Tetralona	Tetralol	65
8	Cânfora	Borneol	75

Conforme os rendimentos reacionais da tabela 23, verifica-se que os produtos foram obtidos com rendimentos considerados entre bons e excelentes. O substrato mais reativo foi o  $\beta$ -ceto-éster, com rendimento de 92% (entrada 4, tabela 23). As reações químicas apresentaram rendimentos razoáveis, mas com formação de adequada quantidade de produto para uso como padrão químico. Os produtos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

Os cromatogramas das figuras 48- 51 referem-se a resolução dos álcoois octan-2-ol, hexan-2-ol, 5-hexen-2-ol e 3-hidróxi-butanoato de etila, respectivamente. No caso dos álcoois 4a, 5a e 6a foi necessário realizar a acetilação desses compostos pois não foi possível a separação dos seus enantiômeros. Os cromatogramas da resolução dos álcoois mentol e tetralol encontram-se respectivamente nas figuras 52 e 53.

FIGURA 48 – Resolução do acetato de (*RS*)-2-octanolFIGURA 49 – Resolução do acetato de (*RS*)-3-hexanolFIGURA 50 – Resolução do (*RS*)-acetato de 5-hexen-2-olFIGURA 51 – Resolução do (*RS*)-3-hidróxi-butanoato de etilaFIGURA 52 – Resolução do (*RS*)-MentolFIGURA 53 – Resolução do (*RS*)-Tetralol

## 4.5 Reações de biorredução

### 4.5.1 Reações de biorredução com F-1

Continuando com o estudo das biorreduções, ampliou-se o número de substratos para as reações com F-1. O procedimento adotado encontra-se descrito no item 5.7. A tabela 24 apresenta os resultados obtidos após análise das reações.

TABELA 24 – Reações de biorredução de diferentes cetonas com F-1

<b>Entrada</b>	<b>Reagente</b>	<b>Produto</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b><i>e.e</i> (%)</b>
1	Octan-2-ona	Octan-2-ol	44,7	22,8 ( <i>S</i> )
2	Hexan-2-ona	Hexan-2-ol	69,2	34,5( <i>S</i> )
3	5-hexen-2-ona	5-hexen-2-ol	58,2	38,7( <i>S</i> )
4	3-oxo-butanoato de etila	3-Hidróxi-butanoato de etila	95,5	>99 ( <i>S</i> )
5	Mentona	Mentol	14,6	77,1( <i>S</i> )
6	Carvona	Dihidrocarvona	32,8	-
7	Tetralona	Tetralol	23,9	82,2 ( <i>S</i> )
8	Cânfora	Borneol	N.R	-
9	<i>m</i> -MeO-acetofenona	<i>m</i> -MeO-fenil-etanol	72,7	45,4( <i>S</i> )
10	Ciclohexanona	Ciclohexanol	98,1	-
11	Ciclopentanona	Ciclopentanol	19,1	-

De acordo com os resultados apresentados na tabela 24 percebe-se uma grande diferença de valores de conversão para as cetonas utilizadas, bem como para seus excessos enantioméricos. Com relação, às cetonas alifáticas, as conversões mostraram-se moderadas (entradas de 1 – 3), e no caso dos *e.e*, os valores obtidos são considerados baixos, especialmente para a cetona de cadeia maior (entrada 1). Cabe destaque para a 5-hexen-2-ona, onde observou-se apenas a redução da carbonila cetônica, não havendo redução da dupla ligação isolada. Todos os enantiômeros obtidos apresentaram configuração do tipo *S*.

Dentre os substratos apresentados, a redução do aceto-acetato de etila (entrada 4) apresentou a maior conversão com o biocatalisador utilizado. Nesse caso, tanto conversão

como excesso enantiomérico, tiveram valores excelentes, superiores à 95% (entrada 4, tabela 24). Comparando esses valores, com os obtidos por Machado *et al* (2006) para o mesmo substrato, que foi de 70,4% de conversão com *ee* de 97% para o isômero *S*, pode-se sugerir que o biocatalisador aqui utilizado é um bom redutor para esse tipo de substrato, inclusive apresentando desempenho superior à outras fontes de biocatalisador. Como esse substrato apresenta dois grupos funcionais, para este caso, também pode-se constatar a quimiosseletividade das enzimas presentes no material vegetal utilizado. Isto porque houve apenas redução do grupamento carbonila da cetona, não sendo afetada a carbonila do grupamento éster.

Para as cetonas dos monoterpenos: mentona, carvona, tetralona e cânfora, (entradas 5-8), houve muita discrepância em relação à redução do grupamento carbonila. Somente as carbonilas da mentona e da  $\alpha$ -tetralona (entradas 5 e 7), apresentaram reduções discretas, com valores inferiores à 25%. Os valores de *e.e* obtidos foram melhores, sendo de 77% e 82%, respectivamente, com formação do enantiômero (*S*). O monoterpeno cânfora (entrada 8), não apresentou redução. Pode-se sugerir que nesses casos, onde a redução da carbonila não foi muito eficiente, que o fato das cetonas serem cíclicas e com grupamentos substituintes, dificultou acesso do substrato ao sítio ativo das enzimas, não ocorrendo redução.

Porém, o processo mais interessante ocorreu com o substrato 6 (carvona) que possui uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Não ocorreu redução da carbonila, mas sim da dupla ligação, formando o composto di-hidrocarvona. O produto foi obtido com um valor de conversão de 32%, o que pode ser considerado bom, diante da redução diferenciada que foi apresentada. Os autores Machado *et al* (2006) e Fonseca *et al* (2009), também realizaram a biorredução da carvona, utilizando as espécies *Manihot* e água de *Cocos nucifera*, respectivamente, e em ambos casos, obtiveram a redução da carbonila, com conversões moderadas, e *ee* excelentes, superiores a 93% para o isômero *S*. Destaca-se nesse caso, a quimioseletividade distinta para as enzimas aqui utilizadas.

Para a biorredução da 3-metóxi-acetofenona, o valor de conversão pode ser considerado bom, porém o *e.e*, não foi muito satisfatório, de apenas 45% para o enantiômero *S* (entrada 9). Comparando esses valores com aqueles da biorredução da acetofenona nas mesmas condições (entrada 1, tabela 21), estes apresentam-se um pouco inferiores. Pode-se sugerir que esse decréscimo, pode ser atribuído a presença do grupamento metóxi no anel aromático. Esse mesmo composto foi submetido à biorredução por Machado *et al* (2006) e Fonseca *et al* (2009), e nos dois casos as biorreduções tiveram conversões excelentes, de 88% e 98%, respectivamente com *ee* superiores a 90% para o isômero *S*. Isso demonstra uma



menor eficiência da espécie F-1 nesse tipo de biorredução quando comparada com outras fontes biocatalíticas. Além disso, nesses casos, o grupo metóxi, influenciou de forma positiva quando comparado com a acetofenona, pois houve um aumento na conversão, o que não ocorreu quando se utilizou F-1 como biocatalisador.

Finalmente para as cetonas cíclicas com anéis de 5 e 6 membros (entradas 10 e 11), os valores de conversão foram bem diferentes, sendo a melhor delas para a ciclohexanona, com valor de 98% para o produto, enquanto que a ciclopentanona obteve conversão de 19%. Comparando esse desempenho com o obtido pela biocatálise com água de coco (FONSECA *et al*, 2009), ocorreram processos semelhantes, pois nesse caso, a redução da ciclohexanona também obteve maior valor de conversão. Sugere-se uma melhor eficiência da biorredução para cetonas cíclicas com seis átomos de carbono.

#### 4.5.2 Reações de biorredução com F-2

Os mesmos substratos utilizados com a espécie F-1 nas reações de biorredução também foram utilizados com F-2, com a finalidade de fazer um comparativo entre as atividades redutoras das duas espécies. A tabela 25 apresenta os valores de conversão e *e.e* obtidos nas reações biocatalisadas com esta espécie.

TABELA 25 – Reações de biorredução de diferentes cetonas com F-2

<b>Entrada</b>	<b>Tipo de Substrato</b>	<b>Produto</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b>e.e (%)</b>
1	Octan-2-ona	Octan-2-ol	27,4	31,2(R)
2	Hexan-2-ona	Hexan-2-ol	60,2	22,5(R)
3	5-hexen-2-ona	5-Hexen-2-ol	76,4	28,9(R)
4	Aceto-acetato de etila	3-Hidróxi-butanoato de etila	92,7	>99(R)
5	Mentona	Mentol	19,9	76,7 (R)
6	Carvona	Dihidrocarvona	38,2	-
7	Tetralona	Tetralol	17,5	16,3(R)
8	Cânfora	Borneol	N.R	-
9	<i>m</i> -MeO-acetofenona	<i>m</i> -MeO-fenil-etanol	35,1	83,3(R)
10	Ciclohexanona	Ciclohexanol	69,4	-
11	Ciclopentanona	Ciclopentanol	53,4	-

Para as reduções das cetonas alifáticas das entradas 1-3, as conversões apresentaram-se entre moderadas e boas, com valores de 27 à 76%. Nesses casos os excessos enantioméricos, apresentaram-se baixos. Nota-se que este tipo de substrato não é muito viável para reações com essa fonte de biocatalisador. A cetona octan-2-ona (entrada 1) apresentou valor de obtenção do álcool de 27%, o que pode ser considerado baixo, termo que pode ser aplicado também ao seu *e.e.*, de acordo com o valor obtido. Para as cetonas de seis carbonos, os valores de obtenção do álcool, foram semelhantes, com conversões consideradas boas, e em ambos os casos os *e.e.*, podem ser considerados baixos. No caso da cetona que possui insaturação isolada (entrada 3), a dupla ligação não foi afetada em nenhum momento do processo de biorredução.

Para a redução do aceto-acetato de etila (entrada 4), tanto valores de conversão como de excesso enantiomérico, podem ser considerados excelentes, pois estão acima de 95%. No caso do *e.e.*, esse dado é muito positivo para o processo, pois nestas reações, o principal objetivo é obter um único enantiômero do produto desejado.

Para as cetonas cíclicas monoterpênicas, os valores de conversão são considerados baixos, pois em nenhum dos casos o produto obtido foi superior à 33%. Na biorredução da mentona (entrada 5), a conversão chegou a 19,9%, com *e.e.* de 76,7% para o enantiômero *R*. Isso é de fato um tanto surpreendente, já que a maioria dos processos de biorredução leva ao enantiômero (*S*). O produto da biorredução da  $\alpha$ -tetralona também apresentou esse mesmo enantiômero, mas com baixo valor, de apenas 16%. Valor semelhante foi obtido para a conversão, sendo esta de apenas 17,5%. Esses valores são considerados ruins, o que faz-se sugerir que este processo não é favorecido.

Para a redução da carvona, fato igual ao que ocorreu com a espécie F-1, também se deu aqui. Neste caso, houve a redução da dupla ligação  $\alpha,\beta$ -carbonila, não havendo nenhuma evidência da redução da carbonila cetônica. O valor de conversão para o produto dihidrogenado, foi de aproximadamente 33%, valor este que pode ser considerado bom, tendo em vista a dificuldade do processo. E finalmente para a cânfora, a biorredução não foi bem-sucedida, pois nesse caso, não houve formação do produto desejado. Sugere-se que a conformação rígida do composto dificulta o acesso deste à enzima, não possibilitando portanto a formação do produto.

Na redução da cetona aromática com grupamento metóxila na posição *meta* à carbonila, obteve-se baixo valor de conversão, de apenas 35,1% e satisfatório valor de *e.e.*, de 83,8% para o enantiômero *R*, o que corrobora com resultados obtidos anteriormente com outras cetonas. Comparando-se esse resultado com o observado para a redução de acetofenona

não substituída (tabela 21, entrada 2), a conversão diminuiu em seu valor acentuadamente, de 98% para 35,1% para a acetofenona metoxilada (entrada 21, tabela 2). Observando-se o valor do *e.e.*, processo contrário ocorreu, este sofreu acréscimo de 61% para 83%, ambos para o isômero (*R*). Sugere-se que nesse caso, a adição do grupamento metóxi, na posição *meta*- à carbonila, não favoreceu a formação do produto em potencial, porém a formação do isômero (*R*), foi favorecida significativamente, quando comparada com a cetona aromática não-substituída.

Finalmente, para as cetonas cíclicas, observou-se uma melhor conversão para a ciclohexanona, com 69% de formação do álcool. Ambas reduções das cetonas cíclicas podem ser consideradas boas, pois formam o produto com valor acima de 50%.

Fazendo-se uma comparação entre as conversões e os *e.e.* obtidos nas reduções das cetonas com as duas espécies, pode-se constatar que na maioria dos casos, os valores obtidos foram semelhantes. Para a biorredução das cetonas alifáticas: octanona, hexanona e 5-hexen-2-ona, houve melhor desempenho das enzimas presentes na espécie F-1, exceto na redução desta última, onde a espécie F-2 apresentou o melhor valor de conversão. Em ambos os casos, os resultados obtidos podem ser considerados moderados ou bons, sendo os mais baixos valores para a redução da octanona pelas duas espécies. Em relação aos valores de *e.e.*, em todos os casos, estes apresentaram-se baixos, diferindo apenas na formação do enantiômero, para F-1, com formação do isômero (*S*) e para F-2 formando o isômero (*R*).

Comparando a redução do  $\beta$ -ceto-éster pelas espécies, os resultados obtidos foram bem semelhantes, sendo considerados excelentes, pois estão acima de 90%. Melhor ainda foi o valor dos *e.e.* dos enantiômeros obtidos, nos dois casos >99%, com formação de isômeros de configuração oposta. Para as cetonas monoterpênicas (mentona, carvona, tetralona e cânfora), houve também muita semelhança no desempenho das enzimas nas biorreduções. O produto da mentona foi obtido com baixo valor de conversão e moderado valor de *e.e.* em ambos os casos, com formação de isômeros opostos, como já relatado para outras cetonas. Quando se utilizou a carvona, mesma ocorrência da redução da dupla ligação conjugada ocorreu com as duas espécies, também com conversões significativas para o processo. Com nenhuma das espécies foi possível a obtenção do produto da cânfora, pode-se atribuir a dificuldade do processo de biorredução à rigidez da molécula, dificultando o acesso do substrato à enzima.

Para a redução das cetonas cíclicas, o melhor desempenho foi obtido através de F-1, para a ciclohexanona e ambas apresentaram bom desempenho para a ciclopentanona, sendo a melhor a espécie F-1.

Pelos resultados apresentados, sugere-se que há um melhor desempenho das enzimas presentes na espécie F-1, muito embora essa diferença entre os valores obtidos, não seja tão significativa.

#### 4.6 Otimização de biorredução de acetofenona

Como os resultados obtidos até então, ainda não podem ser considerados satisfatórios, foi realizado mais um *screening* de biorredução de acetofenona, mas em diferentes condições reacionais. A maior modificação foi na redução das quantidades de biocatalisador, substrato e solvente do meio, suas respectivas quantidades foram reduzidas visando um trabalho menos dispendioso e demorado, além disso, influenciando também na economia de reagentes. Nesse primeiro *screening*, todas as reações ocorreram a temperatura controlada de 30°, diferente do método feito anteriormente onde a temperatura da reação era a ambiente, pois o agitador orbital utilizado não possuía controle de temperatura. A figura 54 apresenta as condições gerais das reações que à medida que se avançaram nos estudos, foram sendo modificadas e estas encontram-se dispostas na tabela 26.

FIGURA 54 – Esquema de redução de acetofenona

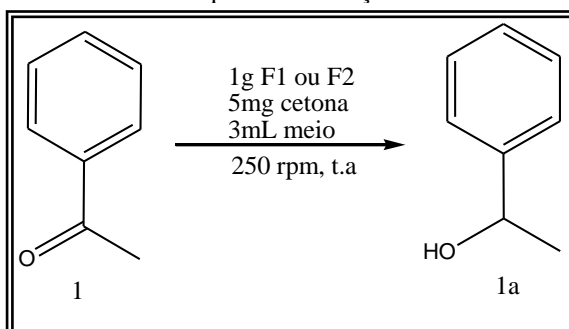


TABELA 26– Reações de biorredução de acetofenona com F-1 em diferentes meios reacionais

<b>Entrada</b>	<b>Espécie</b>	<b>t (dias)</b>	<b>Meio</b>	<b>Conv. (%)</b>	<b>e.e (%)</b>	<b>Config.</b>
1	F1	1	H <sub>2</sub> O	20,4	95,0	<i>S</i>
2	F1	2	H <sub>2</sub> O	32,7	95,2	<i>S</i>
3	F1	3	H <sub>2</sub> O	34,5	94,0	<i>S</i>
4	F1	1	Tampão pH 7,5	16,0	92,3	<i>S</i>
5	F1	2	Tampão pH 7,5	27,6	91,9	<i>S</i>
6	F1	3	Tampão pH 7,5	31,0	92,1	<i>S</i>
7	F1	1	H <sub>2</sub> O + DMSO (5%)	19,9	96,4	<i>S</i>
8	F1	2	H <sub>2</sub> O + DMSO (5%)	29,4	96,4	<i>S</i>
9	F1	3	H <sub>2</sub> O + DMSO (5%)	32,3	96,4	<i>S</i>
10	F1	1	H <sub>2</sub> O + IPA (3%)	11,4	98,4	<i>S</i>
11	F1	2	H <sub>2</sub> O + IPA (3%)	21,5	98,6	<i>S</i>
12	F1	3	H <sub>2</sub> O + IPA (3%)	32,6	98,5	<i>S</i>

Como pode ser observado na tabela 26, as reações foram acompanhadas em intervalos de 1 dia, através de retiradas de alíquotas e análises das mesmas. Observa-se nas entradas de 1 a 3, onde o meio reacional usado foi apenas água, que as conversões aumentam à medida que se aumenta o tempo de reação. Porém se houver uma comparação com o experimento executado anteriormente (tabela 21 entrada 1), o álcool foi obtido com menor conversão, caindo de 87% para 34% ao fim dos três dias. Processo inverso ocorreu com o *e.e.*, pois no experimento realizado anteriormente este atingiu valor máximo de 63%, enquanto que, nesse caso o isômero (*S*) foi obtido com 94% nesse mesmo intervalo de tempo. Como a preferência é sempre pela obtenção de um composto enantiomericamente puro, essa condição reacional é a que representa a melhor opção para este tipo de reação se comparada com a realizada anteriormente.

Ainda foram realizadas outras mudanças no meio reacional, uma delas, foi a substituição do solvente água por tampão pH 7,5 (entradas 4 - 6) A reação também foi acompanhada através de retiradas de alíquotas e suas análises por CG-DIC. Percebe-se nesse caso, quando comparado com as reações onde o meio foi aquoso, que os resultados foram um pouco inferiores. A redução da cetona chegou ao máximo de 31% com obtenção do isômero (*S*) com 92%, valores estes discretamente inferiores ao obtido anteriormente. Pode-se fazer uma breve conclusão, de que nesses casos o meio não afetou significativamente a atividade das enzimas, nem a estereoseletividade, pois, foi obtido o isômero de mesma configuração.

Diante desses resultados, resolveu-se então adicionar um co-solvente ao meio reacional, visando otimizar os valores de conversão.

O primeiro co-solvente usado foi DMSO (dimetil-sulfóxido), em um percentual de 5% v/v. Os resultados também apresentaram-se bem semelhantes aos obtidos anteriormente em meio aquoso e tampão pH 7,5, com a conversão atingindo valor máximo de 32% ao fim de três dias com obtenção do isômero (*S*) com 96%. Sugere-se que nesse caso, o co-solvente utilizado não exerceu influência na atividade enzimática, visto que, os resultados obtidos foram bem semelhantes.

Como o primeiro co-solvente usado não teve muita influência na reação, utilizou-se isopropanol (IPA) em vez de DMSO. O isopropanol atua no meio reacional reciclando o cofator e concomitantemente aumentando a solubilidade do substrato da reação principal em água, facilitando a interação substrato-enzima (BON *et al.*, 2008). A reação também foi acompanhada a cada 24h, ao fim dos três dias, obteve-se o álcool com conversão de 32% com *e.e* de 98% do isômero (*S*). Mais uma vez pode-se verificar que os resultados apresentam-se muito semelhantes, com mudanças muito discretas que nesse caso, foi o aumento do *e.e*, com obtenção quase que completa do único enantiômero.

Diante dos resultados obtidos com a espécie F-1, repetiu-se os procedimentos executados anteriormente com as mesmas variações de condição, porém utilizando a espécie F-2 como fonte de biocatalisador. As reações realizadas também foram acompanhadas em intervalos de 24h, mas diante dos baixos resultados obtidos, a tabela 27 apresenta apenas os valores apresentados com 3 dias de tempo reacional.

TABELA 27 – Reações de biorredução de acetofenona com F-2 em diferentes meios reacionais

<b>Entrada</b>	<b>Meio</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b><i>e.e</i> (%)</b>	<b>Config.</b>
1	H <sub>2</sub> O	6,1	8,8	<i>R</i>
2	Tampão pH 7,5	18,7	65,3	<i>S</i>
3	H <sub>2</sub> O + DMSO (2%)	26,3	75,9	<i>S</i>
4	H <sub>2</sub> O + IPA (2%)	3,9	76,0	<i>S</i>

De acordo com a tabela 27, os resultados apresentados são discrepantes. Todas as reações apresentaram baixos valores de conversão, com excessos enantioméricos variando entre bons e ruins, e com configuração variando de acordo com o solvente utilizado. Quando o meio reacional usado foi água, obteve-se o respectivo álcool com pequenos valores de conversão e *e.e* para o isômero de configuração *R* (tabela 27, entrada 1). Observa-se nesse caso, uma redução nos valores de conversão e *e.e*, quando comparados com aqueles do *screening* feito inicialmente (tabela 21, entrada 2), isso mostra praticamente uma inatividade

da enzima neste tipo de reação. Não se pode afirmar ao certo, mas talvez o controle da temperatura utilizado nesse procedimento tenha interferido de alguma maneira na atividade das enzimas presentes nesse material, levando a resultados menos expressivos.

Quando o meio utilizado passou a ser o tampão pH 7,5, houve certa melhora nos resultados, porém ainda podem ser considerados como baixa conversão e moderado *e.e.*, com valores de 18% e 65% respectivamente (entrada 2, tabela 27). Nesse caso observa-se também um fato controverso, a obtenção do isômero de configuração oposta ao já obtido anteriormente, nesse caso, o de configuração *S*. Para reações com o uso de co-solvente, percebeu-se uma melhora significativa no *e.e.*, mas o mesmo efeito não foi observado nas conversões. No caso do uso de DMSO, como co-solvente a conversão e *e.e.*, obtiveram valores de 26% e 76%, para o isômero *S*, respectivamente (tabela 27, entrada 3). Valores estes se comparados, quando do uso apenas de água, podem ser ditos que apresentaram-se melhores. Ou seja, aqui, o uso deste co-solvente afetou de forma positiva e bem significativa a atividade das enzimas presentes na espécie em questão.

Porém, o mesmo efeito não pôde ser observado quando do uso de IPA como co-solvente, pois houve redução no valor da conversão, atingindo um valor de 3,9% e valor de *e.e.*, o qual atingiu valor de 76%, para o isômero *S*. Sugere-se nesse caso que o uso do co-solvente influenciou de forma positiva no valores de *ee*, em ambos casos onde utilizados. Porém também constata-se que houve alteração da conformação do isômero do produto obtido, o qual foi de configuração *S*. O meio reacional é um fator que afeta a estereoseletividade da enzima, qualquer mudança realizada no meio, poderá exercer uma influência de maior ou menor grau em determinadas propriedades enzimáticas. De acordo com a literatura, há vários estudos acerca da influência do meio reacional em características específicas das enzimas, podendo afetar sua quimio-, regio- e inclusive a enantiosseletividade. Um dos fatores mais citados e mais estudado também, é a influência do solvente. Relata-se o uso de co-solventes, diferentes solventes hidrofóbicos ou hidrofílicos e inclusive o uso de tampões que são utilizados como meios reacionais, e que a depender do uso podem alterar para melhor ou pior a atividade das enzimas em determinadas condições de reações de biocatálise. Esse é um estudo ainda em contínuo processo e que sem dúvida tem um longo caminho a ser percorrido, pois como este é um fator que influencia diretamente na atividade enzimática e que existem diferentes formas de ser realizado, estudos muito aprofundados ainda se fazem necessários para que se determine como realmente se dá a interação solvente-enzima.

Diante de todo o exposto e dos resultados obtidos com F-2, sugere-se então que este possui complexos enzimáticos que são sensíveis ao meio reacional, diante disso, preferiu-se não levar adiante as pesquisas de biocatálise com esse material.

#### 4.6.1 Biorredução de acetofenona com variação de co-solvente

De acordo com os resultados apresentados anteriormente para a espécie F-1, o uso do co-solvente afetou a atividade enzimática de forma positiva, em especial quando utilizou-se isopropanol. Dessa maneira, seguiram-se experimentos que o utilizaram como co-solvente variando-se apenas a sua concentração no meio que variou entre 2% e 100%. O procedimento adotado encontra-se descrito no item 5.7.1.1. As reações foram acompanhadas a cada 24h e a tabela 28 apresenta os resultados.

TABELA 28 – Resultados de biorredução com o uso de IPA como co-solvente no meio reacional

<b>Entrada</b>	<b>Tempo (dias)</b>	<b>IPA (%)</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b><i>e.e</i> (%)</b>	<b>Configuração</b>
1	1	2	18,3	95,7	<i>S</i>
2	2	2	27,8	95,9	<i>S</i>
3	3	2	34,8	95,2	<i>S</i>
4	1	5	16,7	98,9	<i>S</i>
5	2	5	25,5	99,2	<i>S</i>
6	3	5	32,3	99,9	<i>S</i>
7	1	10	12,5	99,6	<i>S</i>
8	2	10	18,0	99,9	<i>S</i>
9	3	10	23,7	99,9	<i>S</i>
10	1	30	0,5	99,9	<i>S</i>
11	2	30	1,2	94,7	<i>S</i>
12	3	30	1,6	99,9	<i>S</i>
13	1	100	14,5	98,1	<i>S</i>
14	3	100	39,2	89,3	<i>S</i>

Para todos os casos, foram observados aumentos muito significativos nos valores de *e.e*, com mesma configuração, o que é um fator muito positivo, pois, o principal objetivo é a obtenção de um isômero enantiomericamente puro. A começar da utilização do co-solvente no percentual de 2% (entradas 1-3), as conversões foram sofrendo aumento gradativo no decorrer dos dias, chegando à um máximo de 34,8% (entrada 3) ao final de 72h. Nesse mesmo intervalo ao serem observados os valores de *e.e*, este praticamente não sofreu alterações,



obtendo-se de imediato valores superiores a 95% para o isômero *S*. Nota-se neste caso que, o fator tempo para a conversão afetou de forma positiva, pois observa-se um aumento regular desse valor, porém ao final do intervalo o valor final obtido, pode ser considerado moderado.

Esse mesmo comportamento foi observado quando o valor de IPA passou a ser 5%, inclusive valores semelhantes de conversão e *e.e* foram obtidos. Para os intervalos descritos a conversão duplicou seu valor, o que é positivo. Com relação ao *e.e*, assim como no caso anterior, não ocorreu alteração nos seus valores, pois de início já foi obtido o isômero *S*, do isômero praticamente puro, o que é extremamente relevante.

Alterando-se o valor do co-solvente para 10%, percebe-se que a melhoria nos valores de conversão começam a não ser mais tão significativas. Há redução nos valores de conversão, porém é obtido apenas um único enantiômero. Quando o percentual de isopropanol aumentou para 30%, a obtenção do produto foi reduzida drasticamente, levando praticamente à inatividade do complexo enzimático, porém não foi afetada a estereoseletividade, pois obteve-se apenas o isômero *S* do álcool.

Estes resultados tendem a confirmar a sequência que vinha sendo observada no procedimento: que ao ser aumentado o percentual do co-solvente IPA, reduz-se o valor de conversão para o produto obtido, porém o *ee* não sofre alteração, mantendo-se elevado. Isto de fato é muito positivo, pois descobre-se um fator de otimização para a reação. Sugere-se que, nesse caso, a concentração ideal é de 2% de IPA a ser utilizado como solvente nas reações posteriores.

#### ***4.6.2 Biorredução de acetofenona com variação de solvente ou biocatalisador***

Os últimos parâmetros a serem avaliados com o objetivo de obter os melhores valores de conversão para os produtos desejados, incluíram: alteração da quantidade de solvente do meio e/ou alteração da quantidade de biocatalisador, bem como a temperatura. A tabela 29 apresenta as condições modificadas bem como os valores de conversão e *ee* obtidos. O procedimento realizado encontra-se descrito no item 5.1.1.2.

TABELA 29 – Resultados de biorredução variando as quantidades de solvente ou biocatalisador

<b>Entrada</b>	<b>Solvente (mL)</b>	<b>F1 (g)</b>	<b>Temp.(°C)</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b><i>e.e</i> (%)</b>	<b>Config.</b>
1	3	1	30	29,4	92,8	<i>S</i>
2	15	1	30	7,6	70,4	<i>S</i>
3	3	0,2	30	6,8	60,7	<i>S</i>
4	3	1	45	18,8	97,7	<i>S</i>
5	6	1	30	13,9	94,6	<i>S</i>
6	3	1	20	16,8	99	<i>S</i>
7	3	1	20	35,3	99	<i>S</i>
8	3	1	37	19,0	99	<i>S</i>
9	3	1	37	27,7	99	<i>S</i>

Obs: as entradas 6 e 8 correspondem a intervalos de tempo de 24h.

A entrada 1 apresenta as condições gerais empregadas anteriormente, onde o tempo reacional foi de 72h, levando a um máximo de conversão aproximadamente 30%, com *ee* de 92,8% de configuração *S*. Quando a quantidade do solvente é aumentada para 15 mL, a conversão cai drasticamente, para um máximo de 7,6% e *ee* de 70,4% (entrada 2). Sugere-se que este comportamento está de acordo com a lei de Michaelis-Menten, que diz que, uma enzima atuará melhor, conforme aumenta a concentração do substrato do meio reacional, sendo que esta possui um máximo de atividade para uma determinada concentração, onde, acima desta a enzima começa a perder sua eficiência. Então nesse caso, como houve um acréscimo de solvente e a quantidade do substrato permaneceu a mesma, ocorreu uma redução em sua concentração. Havendo também portanto, uma redução na atividade da enzima, resultando um decréscimo no valor de conversão da reação. O mesmo comportamento foi observado quando a alteração do solvente foi de 3mL para 6mL (entrada 5), ou seja, também houve diminuição do valor de conversão, mas no caso do *ee*, este não sofreu uma redução, mas um aumento pouco significativo, obtendo-se um valor de 94,6% para isômero de configuração *S*.

Em uma outra tentativa de se otimizar os valores de conversão, reduziu-se a quantidade de biocatalisador do meio, desta vez ao invés de ser utilizado 1g, usou-se 0,2g deste. E mais uma vez, como esperado, se notou a redução drástica dos valores de conversão e *ee* obtidos nessas condições - (entrada 3). O resultado obviamente era esperado pois, ao ser reduzida a quantidade de biocatalisador, se reduz seguramente a eficiência do poder de redução das enzimas contidas nesse material.

A próxima mudança realizada, incluiu o aumento da temperatura (entrada 4). Neste caso, usou-se 45°C e percebeu-se também um queda no valor de conversão, sugerindo que essa temperatura não é ideal para a atividade enzimática. Já com relação a obtenção do *ee*

nessas mesmas condições, houve um acréscimo suave, obtendo-se um máximo de 97,7% para o isômero de configuração *S*. Muito embora esse acréscimo não tenha sido muito elevado, trata-se de fator positivo, porém, essa temperatura não será adotada quando de reações realizadas com outros substratos, pois essa mudança exige um aumento no consumo de energia para o andamento da reação, como a variação não foi muito significativa, não merece ser levado em consideração para uma possível aplicação prática.

Em uma outra situação, quando a temperatura foi reduzida para 20°C (entradas 6 e 7) ao final das 72h houve um aumento tanto na conversão como no *ee*, isso sugere que essas enzimas possuem um melhor comportamento à temperaturas mais brandas. Porém, a diferença não foi muito significativa quando comparada com os resultados obtidos para a reação à 30°C. Vale ressaltar que nessa condição não houve redução do *ee*, que se manteve com valor >99% para o isômero de mesma configuração.

Finalmente, quando utilizou-se 37°C como temperatura da reação (entradas 8 e 9), ocorreu mais uma vez a redução no valor de conversão, obtendo-se um valor de 27,7% ao final das 72h, o que sugere que essa condição não é adequada para este tipo de experimento. O valor de *ee*, bem como a sua configuração não sofreram alteração com a mudança da temperatura.

Sugere-se então, a partir das observações e conclusões feitas acerca dos procedimentos experimentais realizados, que a temperatura adequada para atividade das enzimas presentes na espécie *Vigna unguiculata*, identificada como F-1, é de 30°C.

Diante desses resultados obtidos, deu-se continuidade os estudos de biorredução, ampliando-se a diversidade de substratos, e aplicando-se as melhores condições reacionais obtidas até então. Estas condições adequadas incluem:

- Quantidade de biocatalisador: 1g
- Quantidade de solvente: 3mL
- Percentual de IPA: 2%
- Temperatura reacional: 30°C
- Quantidade de substrato: 5mg
- Tempo reacional: 72h

#### **4.7 Redução química de cetonas e nitrocompostos**

Depois de realizado um estudo completo sobre as melhores condições a serem utilizadas nas reações de biorredução mediadas pelas enzimas presentes em *Vigna*

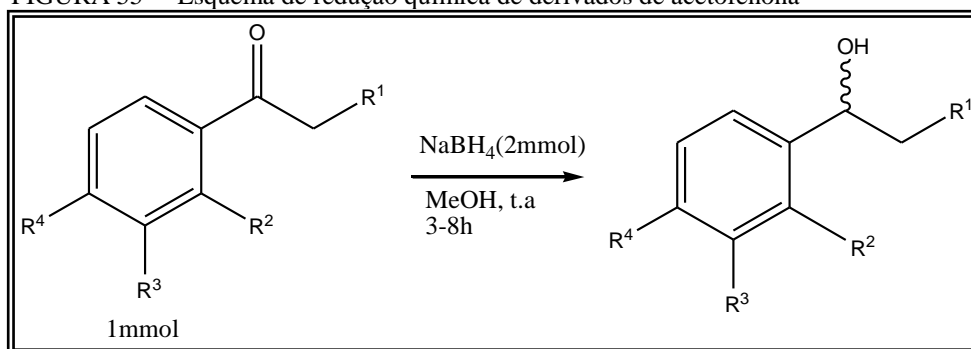
*unguiculata*, resolveu-se ampliar a quantidade de substratos. Foram utilizadas cetonas aromáticas derivadas de acetofenona, nitrocompostos e compostos alifáticos. De início foram realizadas as reações de redução química para obtenção dos padrões dos respectivos álcoois que não se tinha o produto de origem comercial.

As reações de redução química foram realizadas conforme procedimento descrito no item 5.8.1. Todos os produtos obtidos foram devidamente separados e purificados em coluna cromatográfica, analisados através de técnicas adequadas, separados e/ou resolvidos através CG-DIC ou CLAE para a devida caracterização dos tempos de retenção e posterior quantificação das bioconversões.

#### 4.7.1 Derivados de acetofenona

Na redução dos derivados da acetofenona utilizou-se  $\text{NaBH}_4$  como fonte de hidreto, o solvente do meio reacional foi metanol e as reações foram acompanhadas por CCD através da retirada de alíquotas. Estas foram finalizadas após observar-se apenas a formação de um único “spot” na placa de CCD. Os tempos reacionais variaram conforme o substrato utilizado, apresentando-se entre 3 e 8h. A figura 55 apresenta o esquema reacional geral com as condições empregadas para obtenção dos produtos desejados. Conforme apresentado no esquema foram utilizadas diversas cetonas aromáticas derivadas da acetofenona, com os mais diversos grupos substituintes, incluindo substituintes na parte alifática da molécula.

FIGURA 55 – Esquema de redução química de derivados de acetofenona



A tabela 30 apresenta os grupos R substituintes dos substratos utilizados, bem como os rendimentos obtidos para cada reação de redução química.

TABELA 30 – Rendimentos das reações químicas para obtenção dos padrões

Substrato	Rendimento (%)	Substrato	Rendimento (%)
R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> =NO <sub>2</sub> (14)	85,2	R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> = NO <sub>2</sub> , R <sup>4</sup> = H (12)	94,3
R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> = NO <sub>2</sub> , R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> = H (13)	90,2	R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =OMe, R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> =H (15)	92,5
R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> = OMe, R <sup>4</sup> =H (16)	88,8	R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> = OMe (17)	93,1
R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =Me, R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> =H (19)	55,4	R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> =Me (18)	89,7
R <sup>1</sup> =Cl, R <sup>2</sup> =Cl, R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> =Cl (24)	98,6	R <sup>1</sup> =Cl, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =Cl, R <sup>4</sup> =Cl (25)	96,6
R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> =Cl (21)	94,8	R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =Br, R <sup>4</sup> =H (22)	86,4
R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> =Cl (23)	95,4	R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> =CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (20)	88,0

Todos os produtos obtidos foram devidamente caracterizados por RMN <sup>1</sup>H, assim como foram separados em condições adequadas em CLAE ou CG/DIC equipado ou não com coluna quiral. Os respectivos cromatogramas de separação bem como os espectros de RMN encontram-se nas figuras de 56 a 90.

FIGURA 56 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 12 e 12a

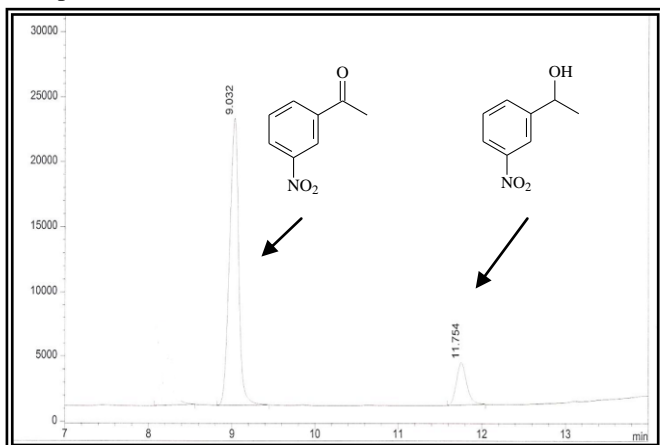
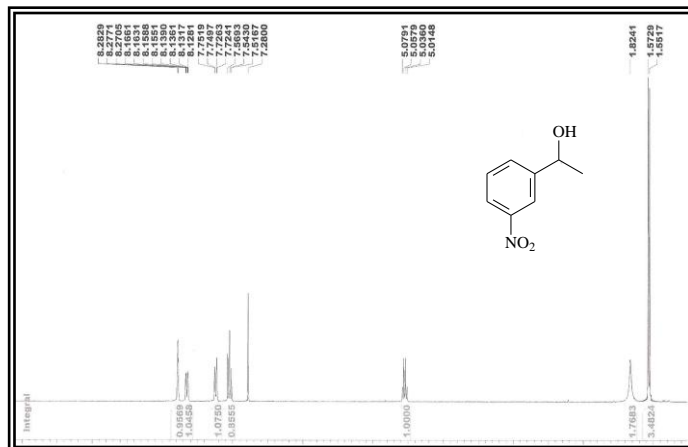
FIGURA 57 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) do composto 12a

FIGURA 58 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 12a

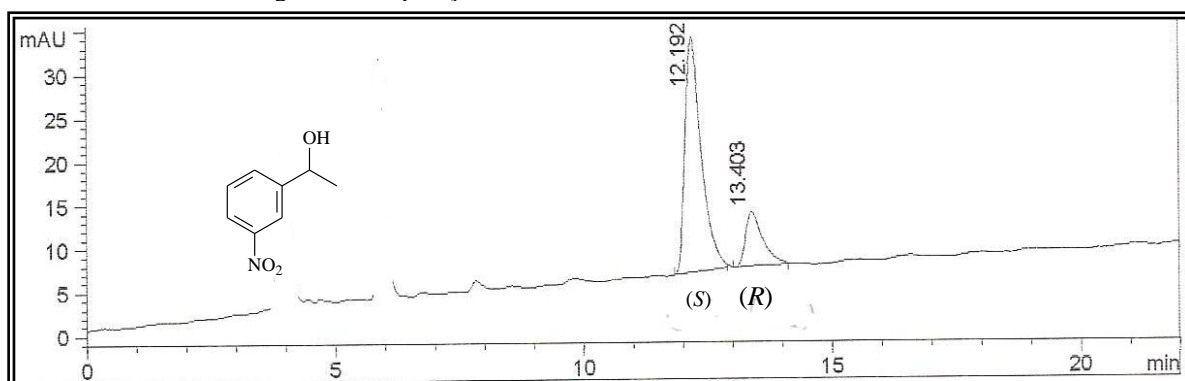


FIGURA 59 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 13 e 13a

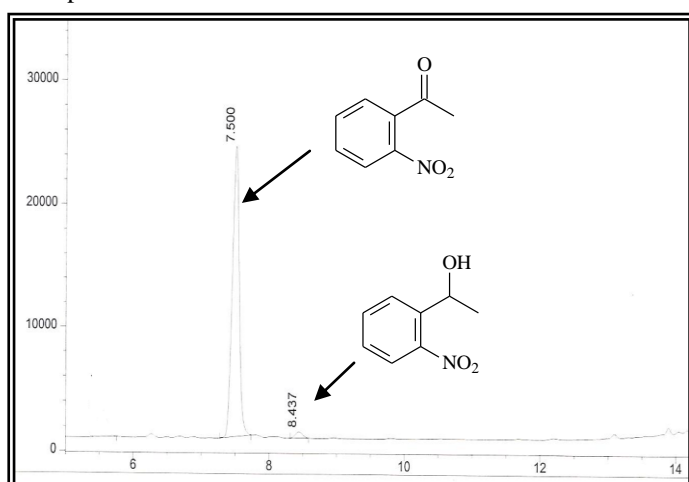
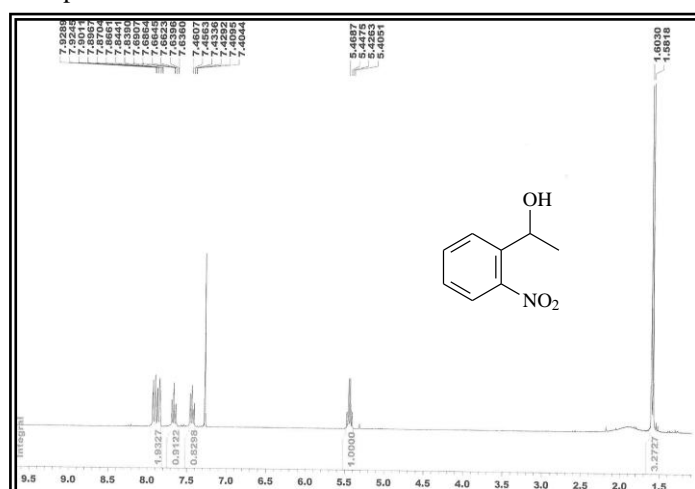
FIGURA 60 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) do composto 13a

FIGURA 61 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 13a

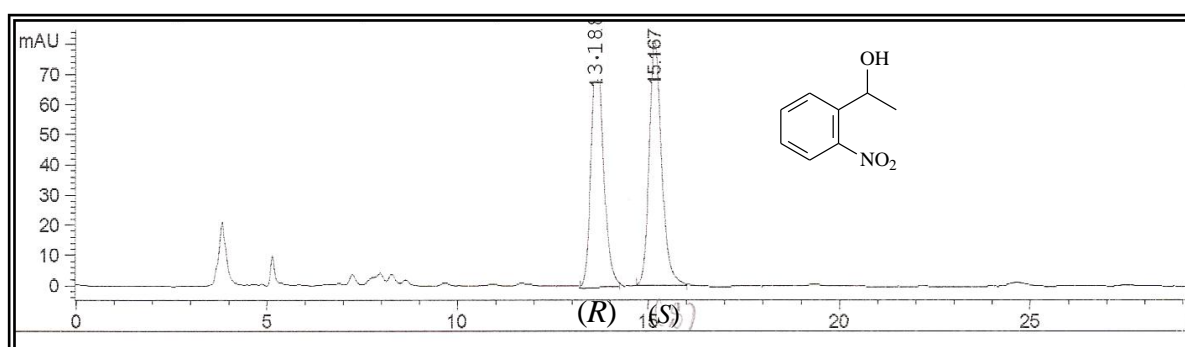


FIGURA 62 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 14 e 14a

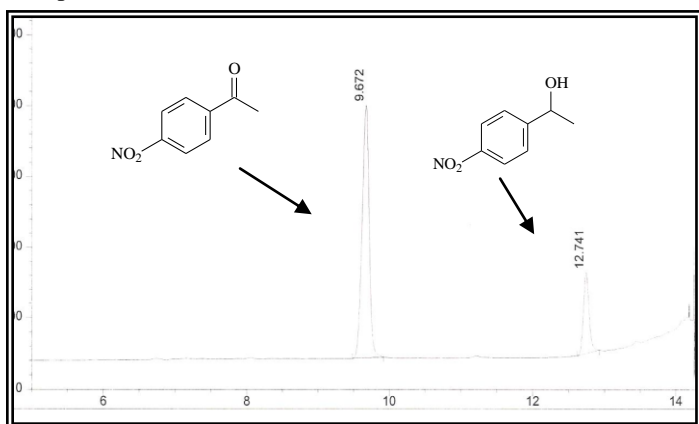


FIGURA 63 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) do composto 14a

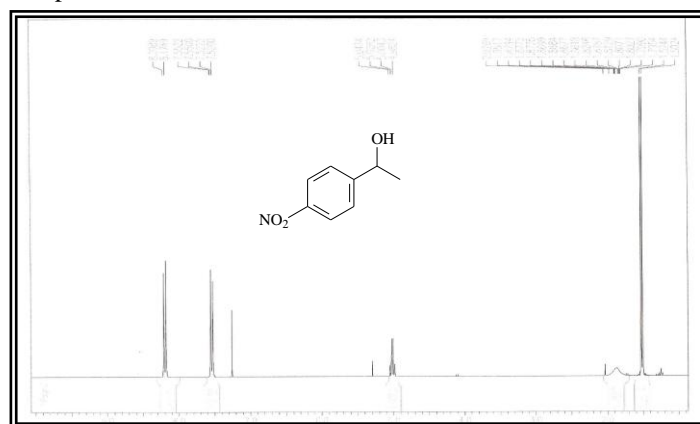


FIGURA 64 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 14a

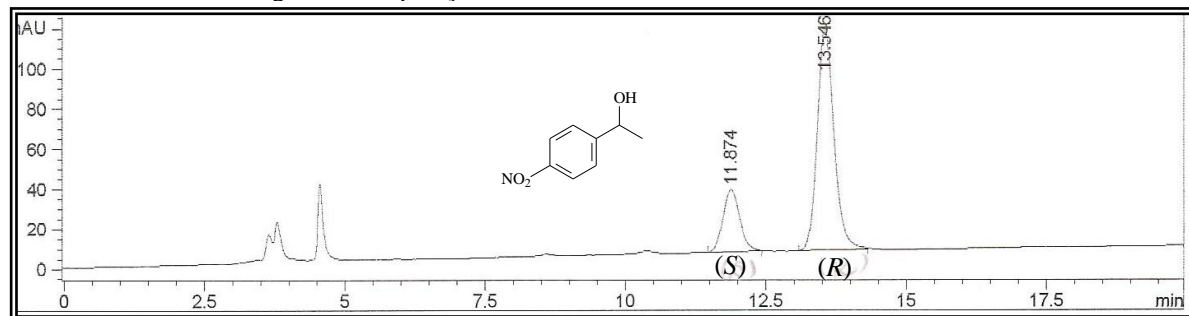


FIGURA 65 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 15 e 15a

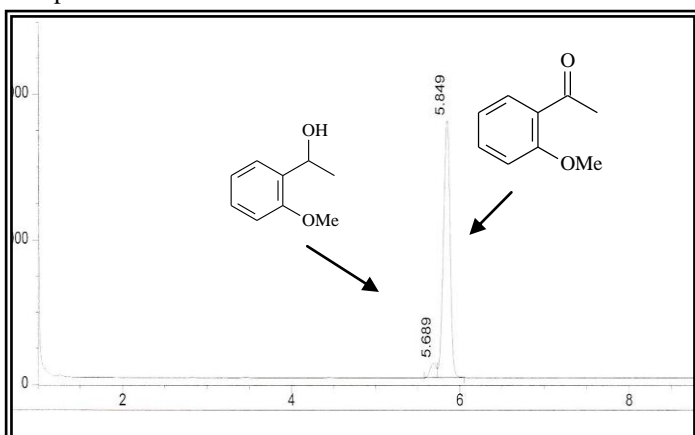


FIGURA 66 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) do composto 15a

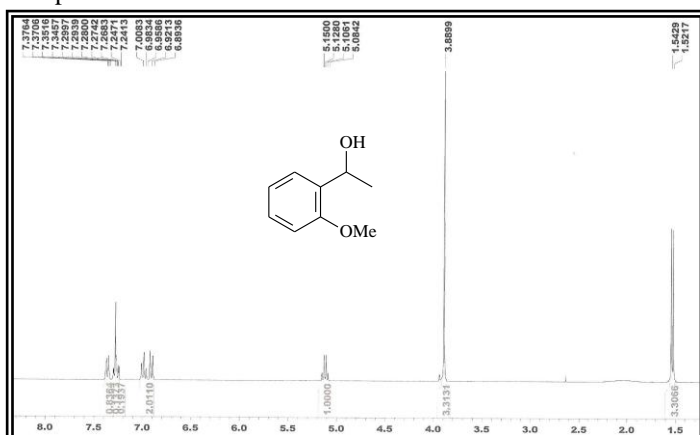


FIGURA 67 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 15a

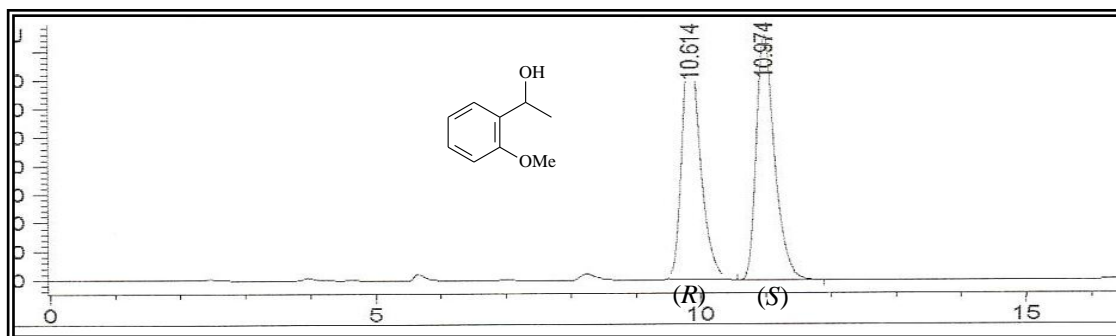


FIGURA 68 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 16 e 16a

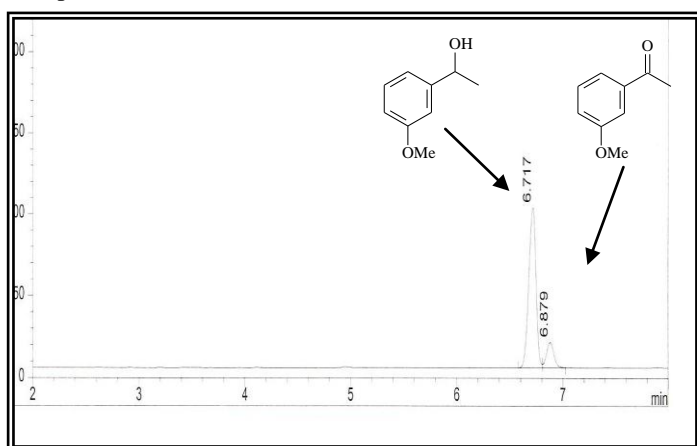
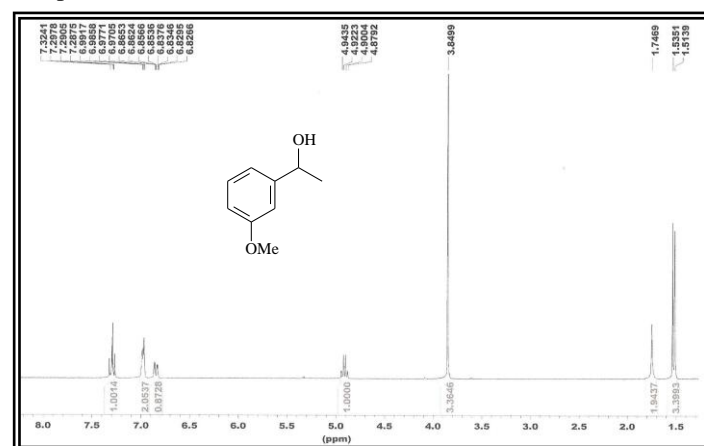
FIGURA 69 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) do composto 16a

FIGURA 70 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 16a

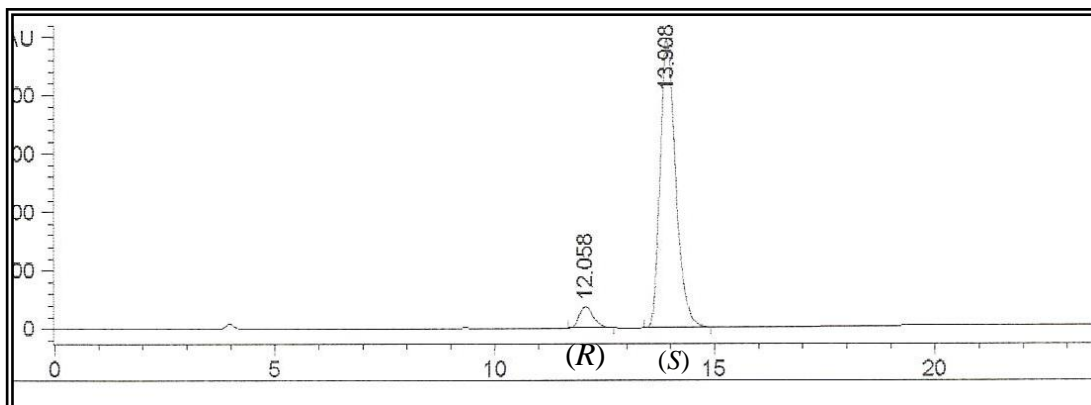




FIGURA 71 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 17 e 17a

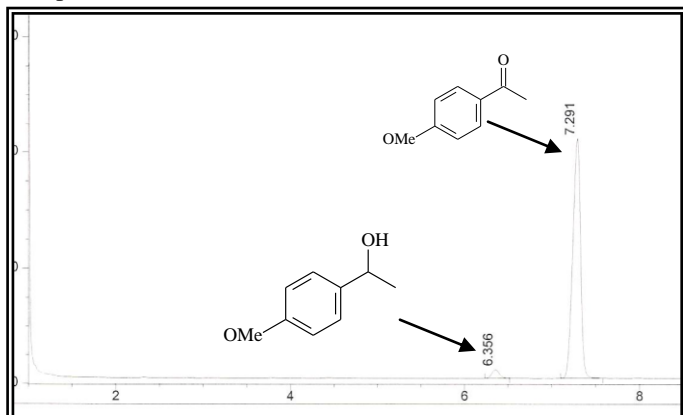


FIGURA 72 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) do composto 17a

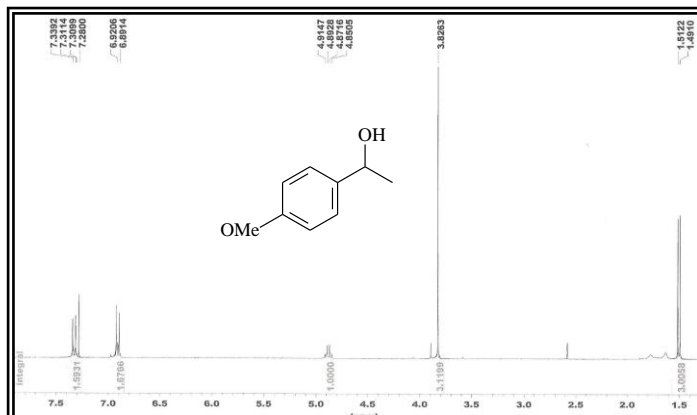


FIGURA 73 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 17a

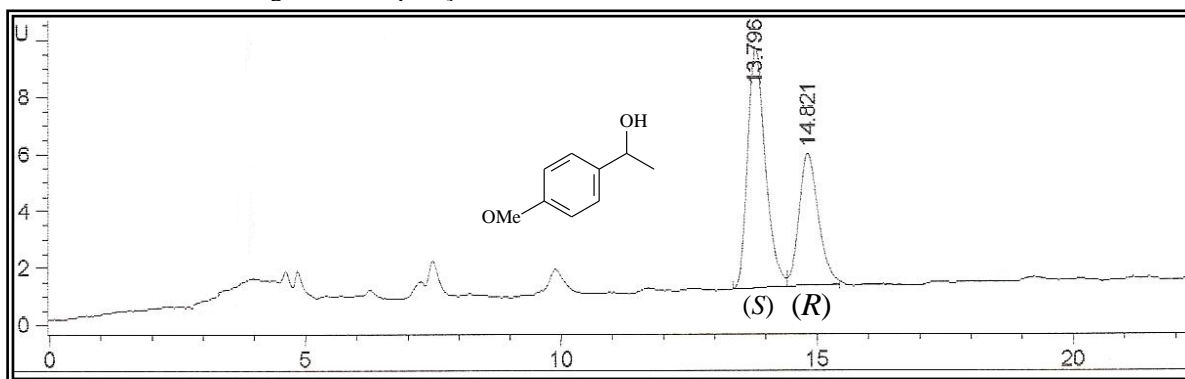


FIGURA 74 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 18 e 18a

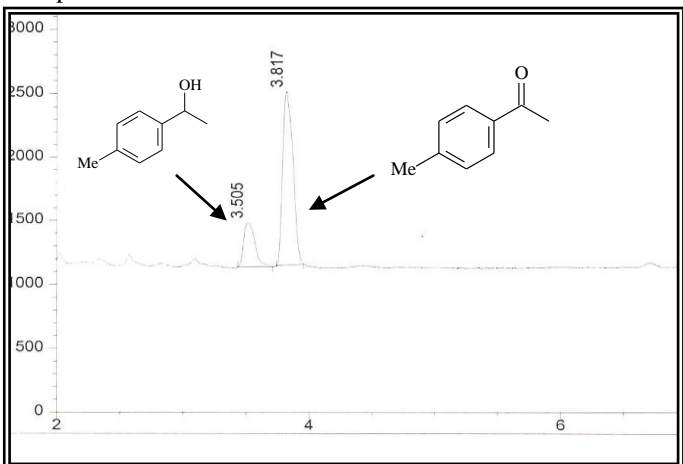


FIGURA 75 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) do composto 18a



FIGURA 76 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 18a

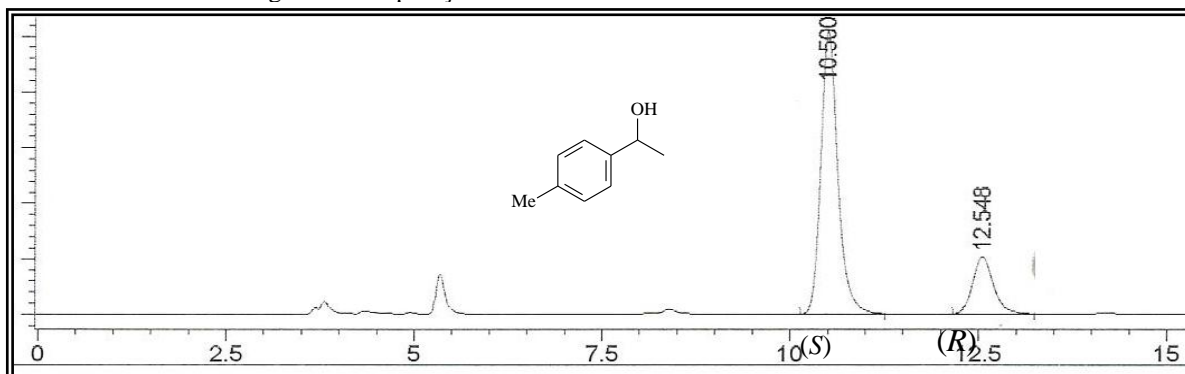


FIGURA 77 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 19 e 19a

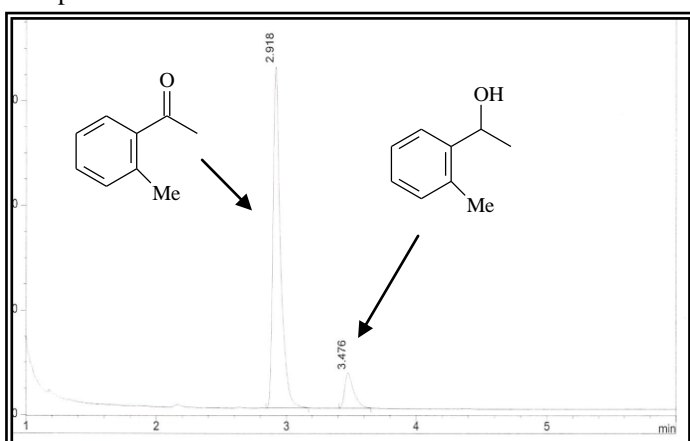
FIGURA 78 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) do composto 19a

FIGURA 79 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 19a

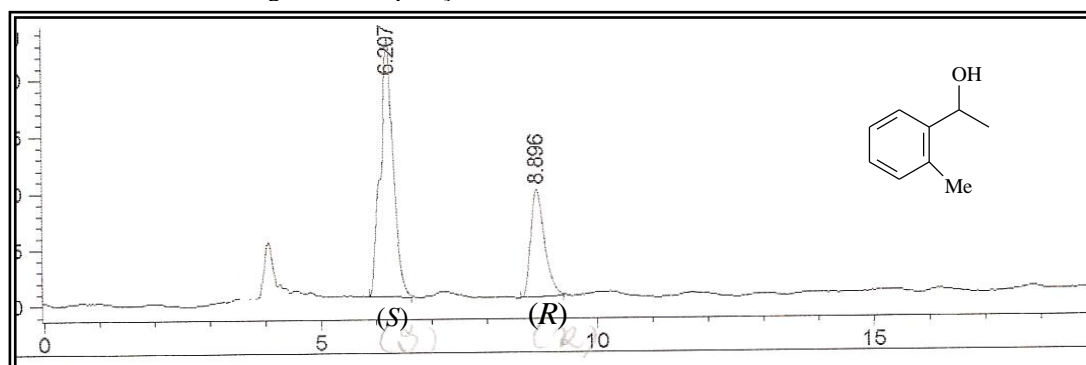


FIGURA 80 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 20 e 20a

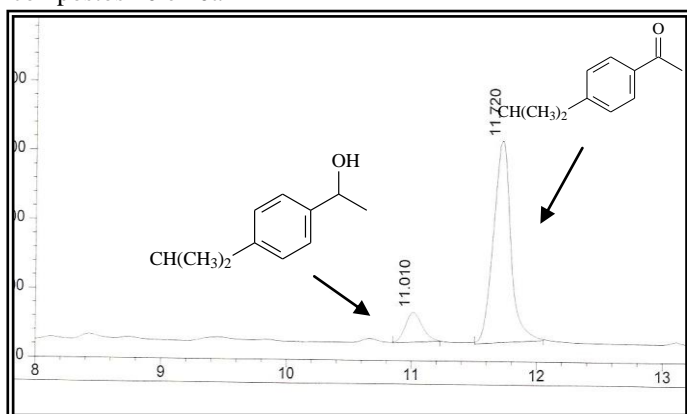


FIGURA 81 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 20a

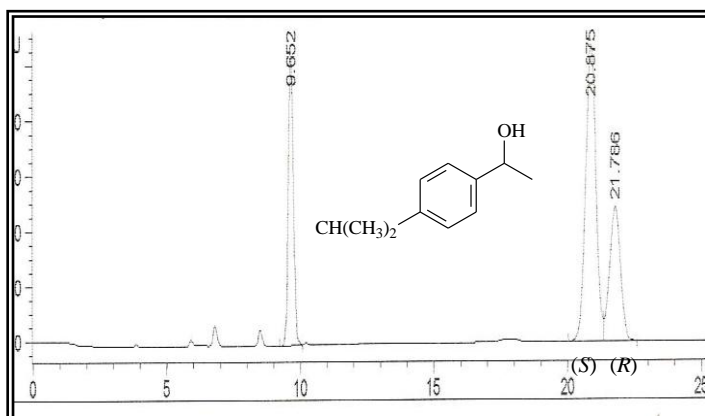


FIGURA 82 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 21 e 21a e dos enantiômeros de 21a

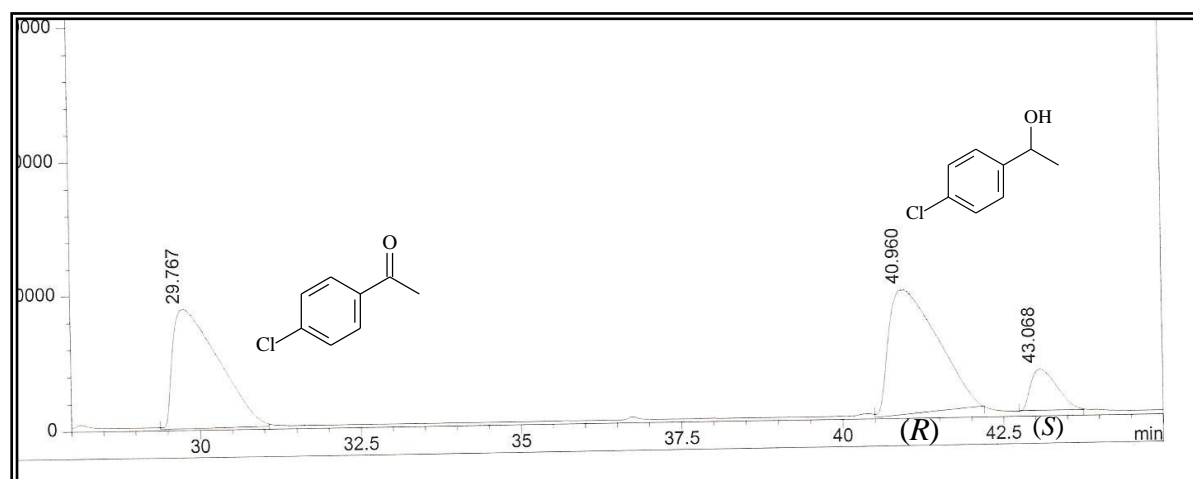


FIGURA 83 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 22 e 22a

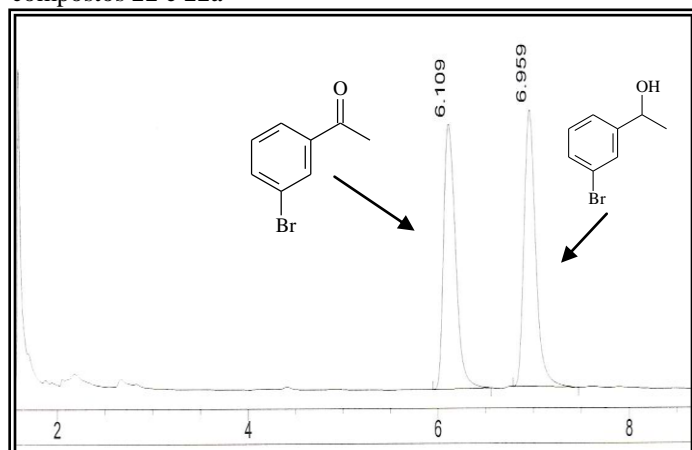


FIGURA 84 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 22a

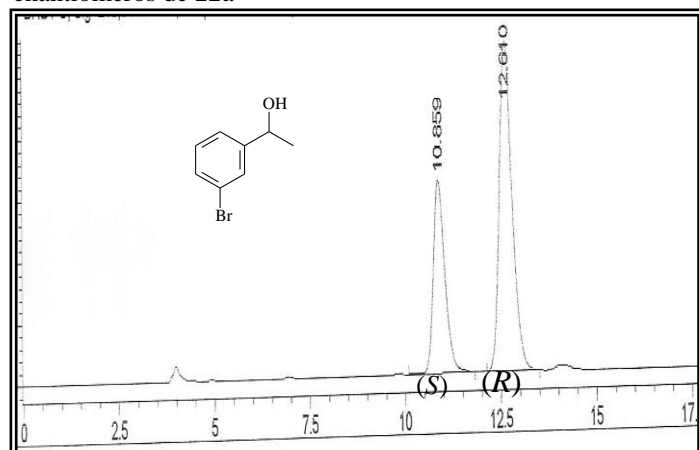


FIGURA 85 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 23 e 23a

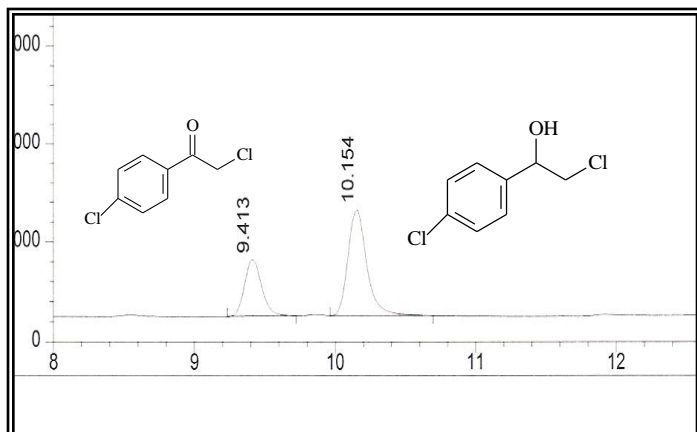


FIGURA 86 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 23a

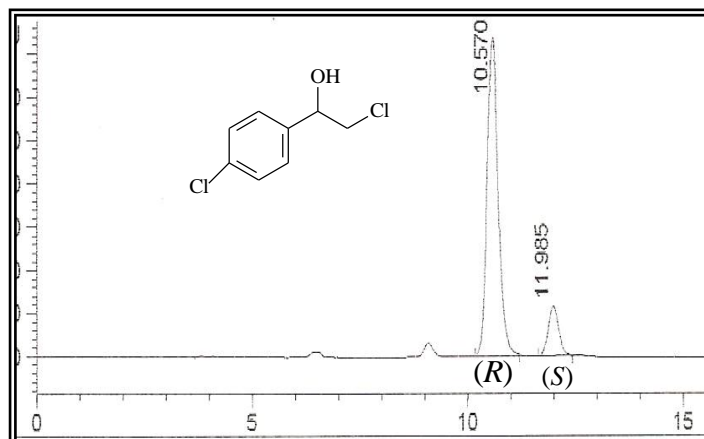


FIGURA 87 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 24 e 24a

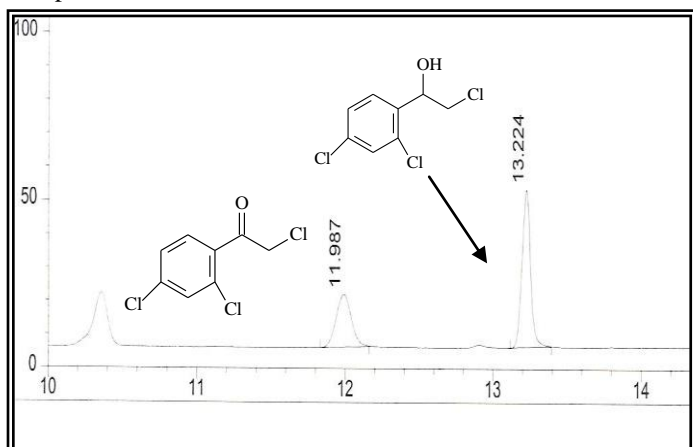


FIGURA 88 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 24a

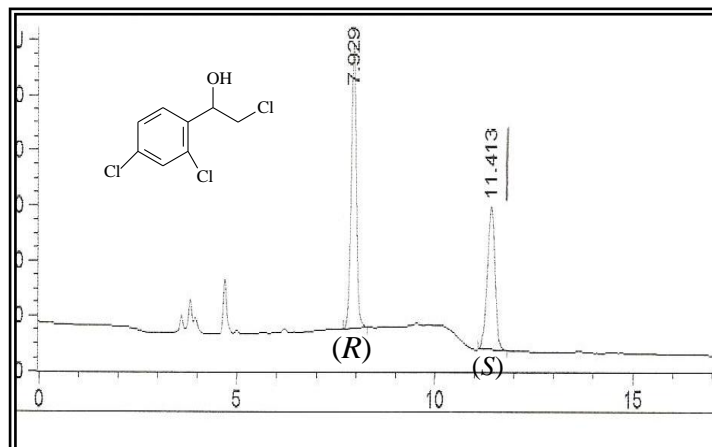


FIGURA 89 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 25 e 25a

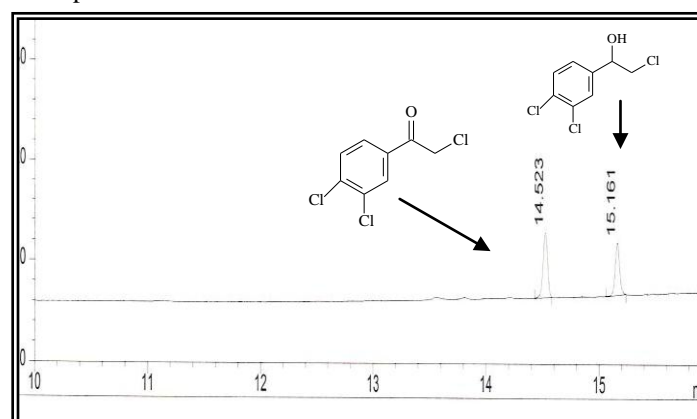
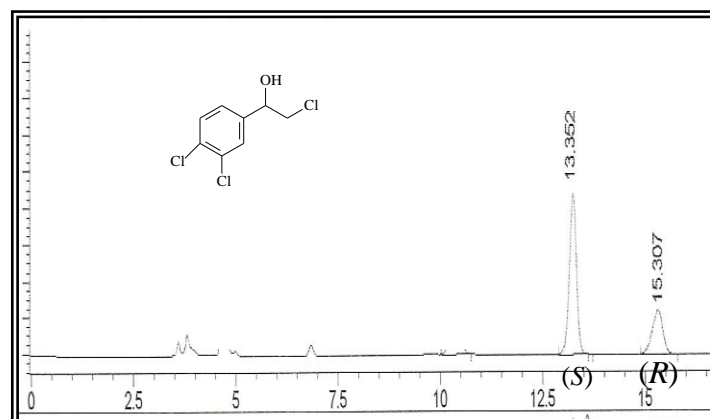


FIGURA 90 – Cromatograma de separação em CLAE dos enantiômeros de 25a

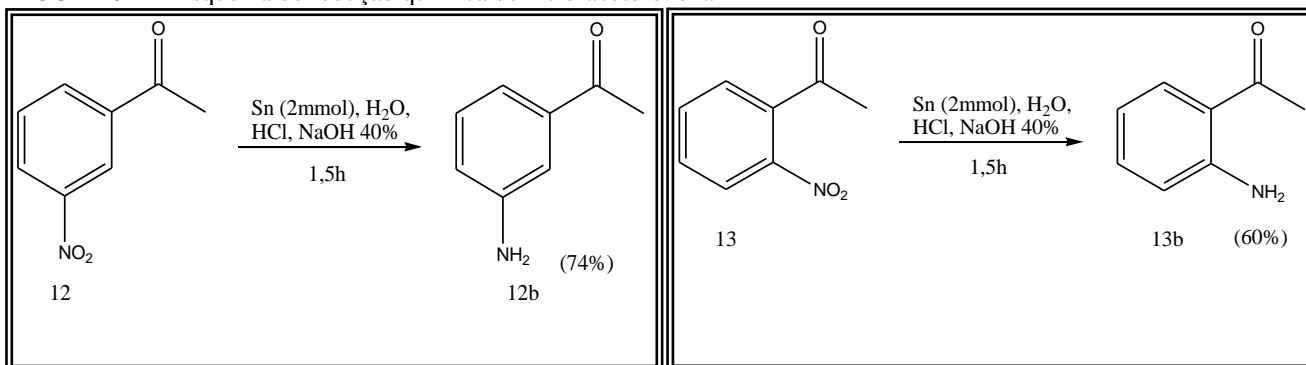


#### 4.7.2 Nitrocompostos

As reduções dos compostos nitrados tiveram metodologia diferente da adotada até então, visto que o reagente  $\text{NaBH}_4$  não reduz o grupo nitro. Com essa finalidade, utilizou-se para a redução desse grupo, redutores de estanho, conforme procedimento da literatura. As condições utilizadas encontram-se descritas no item 5.8.2.

O esquema reacional apresentado na figura 91 mostra as condições empregadas, e os rendimentos das reações.

FIGURA 91 – Esquema de redução química de nitro-acetofenona



De acordo com os resultados experimentais observados, os rendimentos das reações apresentaram-se entre moderados e bons, com uma redução quimiosseletiva, ou seja, apenas o grupo nitro sofreu redução, gerando a respectiva amina, não sendo o grupo carbonila da cetona.

Para a cetona aromática com o grupo nitro na posição *para* (14) já se tinha disponível o padrão do reagente químico, não sendo necessário portanto, realizar a reação de redução química com estanho.

Os compostos foram devidamente caracterizados através de métodos espectroscópicos. Logo após as análises, estes foram submetidos a separação em CLAE ou CG-DIC, conforme metodologia adequada para a devida quantificação das biorreduções. As figuras 92-94 apresentam os cromatogramas das separações em CG-FID das cetonas aromáticas nitradas, juntamente com os álcoois e as aminas.

FIGURA 92 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 12, 12a e 12b

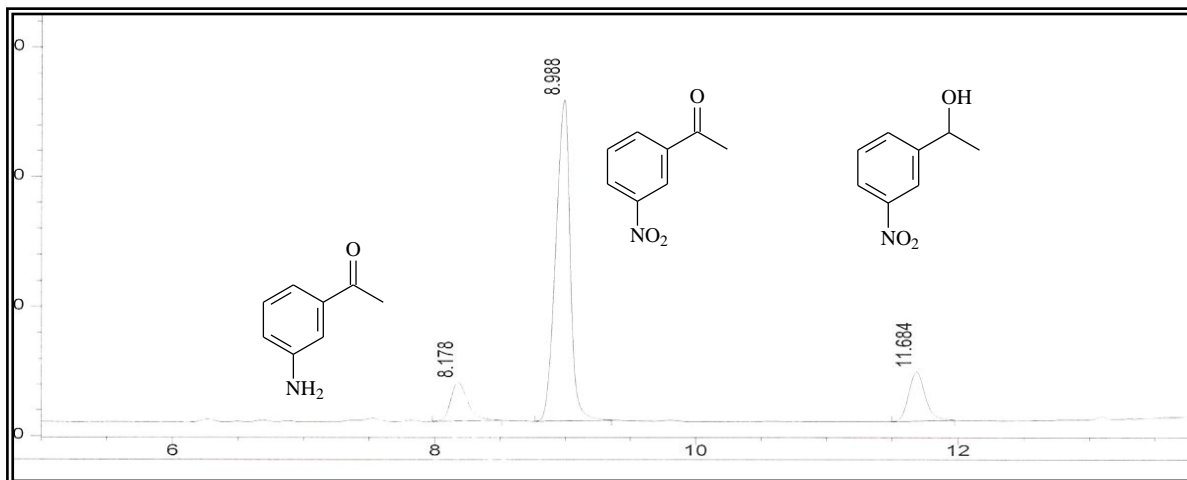


FIGURA 93 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 13, 13a e 13b

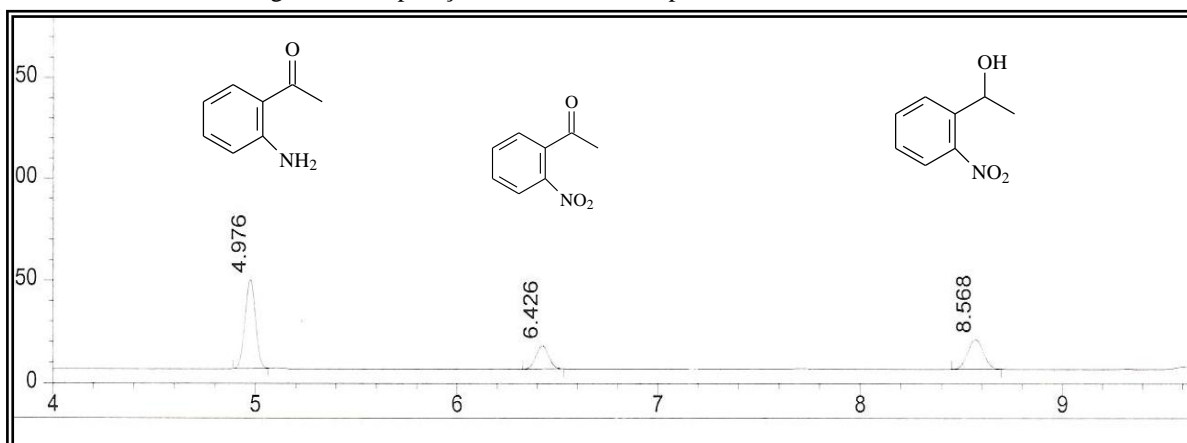
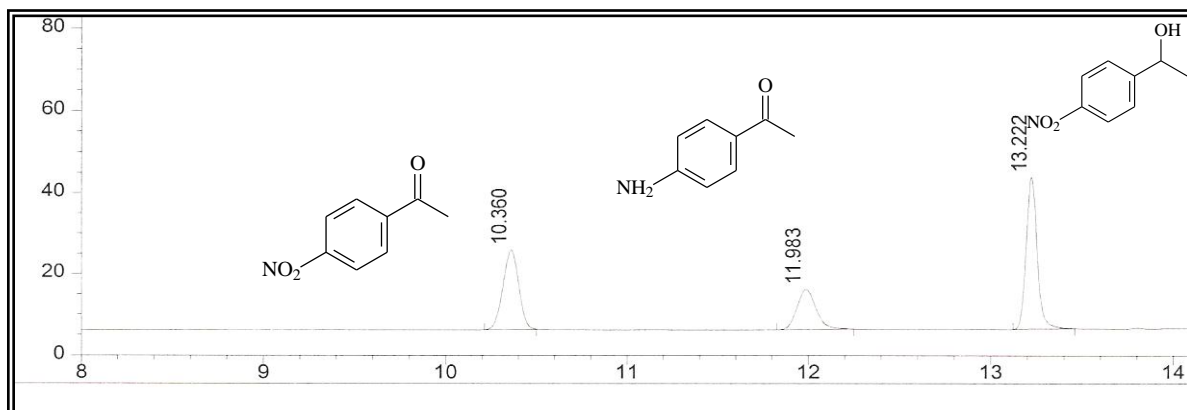


FIGURA 94 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 14, 14a e 14b



## 4.8 Biorreduções

Logo após a obtenção dos compostos via redução química e devidas separações e caracterizações, deu-se continuidade às biorreduções com grãos de F-1. A metodologia empregada encontra-se descrita no item 5.7 do capítulo de procedimento experimental. Todas as reações foram realizadas em triplicata e os resultados aqui apresentados, referem-se a média aritmética dos valores.

Os substratos derivados de cetonas aromáticas foram agrupados conforme os tipos de substituintes no anel aromático. A seguir a discussão dos resultados obtidos para a biorreduções desses compostos encontra-se dividida conforme os grupos substituintes e suas posições no anel benzênico.

### 4.8.1 Cetonas aromáticas com grupos ativantes

Substituintes presentes no anel aromático são agrupados em grupos ativantes e desativantes. Os grupos ativantes são aqueles que possuem um átomo com par de elétrons livres ligado diretamente ao anel e que podem ser doados à este por efeito mesomérico, a exceção para esta regra refere-se à átomos de halogênios, que, embora possuam pares de elétrons livres, são classificados como grupos desativantes. Portanto, nesse grupo encaixa-se os substituintes: metoxilados e alquilados que serão discutidos separadamente nos próximos itens.

#### 4.8.1.1 Metoxilados

As reações realizadas utilizaram esse substrato nas posições *orto*, *meta* e *para*-, e com os resultados obtidos pôde-se observar como a posição do substituinte pode afetar a atividade enzimática. A figura 95 apresenta o esquema reacional bem como as condições utilizadas no experimento e a tabela 31 apresenta os resultados obtidos.

FIGURA 95 – Esquema de biorredução de cetonas aromáticas metoxiladas

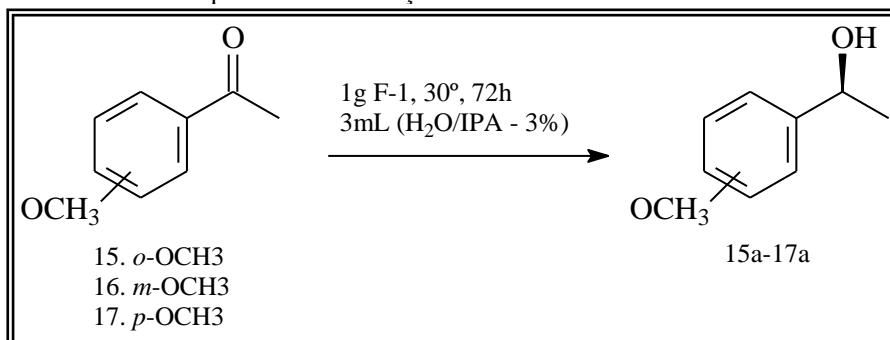


TABELA 31 – Resultados das biorreduções das cetonas aromáticas metoxiladas

Entrada	Substrato	Conv. (%)	ee (%)	Configuração
1	<i>o</i> -metoxi-acetofenona - 15	5,7	> 99	<i>S</i>
2	<i>m</i> -metoxi-acetofenona - 16	87,0	> 99	<i>S</i>
3	<i>p</i> -metoxi-acetofenona - 17	5,0	> 99	<i>S</i>

De acordo com os resultados apresentados na tabela, percebe-se que os 2' e 4' metoxi-derivados apresentaram baixas conversões depois das 72h de reação (entradas 1 e 3), enquanto que o substituinte na posição 3' (entrada 2), favoreceu a obtenção do álcool, apresentando um valor de conversão considerado bom (87%). Para a reação com o grupo metoxi na posição *orto*, pode justificar o baixo valor de conversão, pelo acesso dificultado do sítio enzimático à carbonila, visto que ambos os grupos estão próximos, configura-se aí uma situação de impedimento estérico. No caso do substituinte na posição *para* o par de elétrons da carbonila encontra-se envolvido na ressonância com os elétrons tanto do anel, como do oxigênio do grupo metóxi. Esse fator, pode influenciar na atividade da enzima, levando-a redução de seu desempenho na reação. Essa ressonância essa não ocorre quando o substituinte encontra-se na posição *meta*, daí este substrato, possuir o melhor valor de conversão e *ee*, pois nesse caso, não estão envolvidos, nem fatores estéricos, já que o grupo está afastado da carbonila e nem fatores eletrônicos, pois seus elétrons não estão envolvidos em ressonância com a mesma. Assim, essa observação será usada, como justificativa para a redução da atividade enzimática o derivado metoxilado na posição *para*. Em todos os produtos obtidos, observou-se a presença de apenas um único enantiômero com configuração do tipo *S*, sendo este um forte indicativo da enantiosseletividade das enzimas presentes no material vegetal utilizado.



### 4.8.1.2 Alquilados

Os seguintes substratos a serem utilizados nas reações de biorredução foram aqueles com grupamentos alquila ligados ao anel aromático. Nesse caso, os grupos substituintes foram o grupo metila, nas posições *orto*- e *para*-, e o grupo isopropil na posição *para*. A figura 96 apresenta o esquema reacional com as condições empregadas e a tabela 32, os resultados obtidos.

FIGURA 96 – Esquema de biorredução de cetonas aromáticas alquiladas

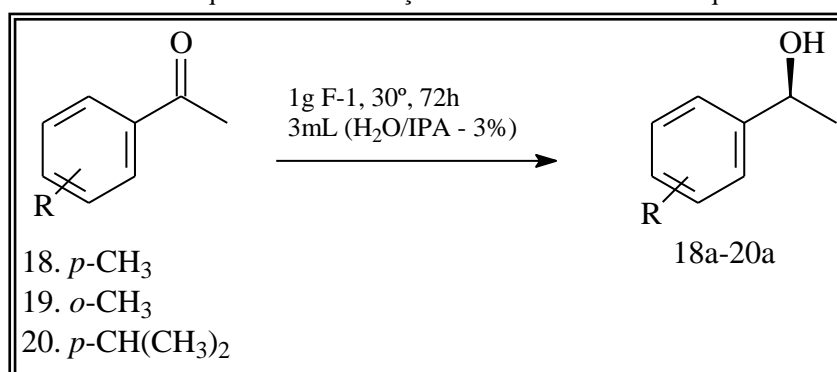


TABELA 32 – Resultados das biorreduções das cetonas aromáticas alquiladas

Entrada	Substrato	Conv. (%)	<i>ee</i> (%)	Configuração
1	<i>p</i> -metil-acetofenona – 18	13	96	<i>S</i>
2	<i>o</i> -metil-acetofenona – 19	11	>99	<i>S</i>
3	<i>p</i> -isopropil-acetofenona – 20	13	87	<i>S</i>

De acordo com dados apresentados pode-se perceber que as reduções com esses grupos apresentam baixas conversões, independente da posição e do tamanho do substituinte. Quando o substituinte no anel foi o grupo metila, nas posições *orto*- e *para*-, embora as conversões tenham sido baixas, a pureza enantiomérica do produto gerado foi excelente. A baixa redução observada na posição *orto*-, pode ser justificada pela proximidade na posição dos grupos, dificultando o acesso da enzima, e no caso do substituinte na posição *para*-, justifica-se a baixa conversão por fatores eletrônicos já mencionados e discutidos, quando na reação com o *p*-metoxi-acetofenona (item 4.8.1.1). O que também pode ser utilizado para o caso do substrato com o grupo *p*-isopropil, o qual também apresentou baixa conversão.

#### 4.8.2 Cetonas aromáticas com grupos desativantes

Os grupos desativantes do anel aromático, são aqueles que possuem uma carga positiva ou parcial positiva, no átomo que está diretamente ligado à ele. Esses grupos causam redução da atividade do anel por retirada de elétrons por efeito indutivo atrator. Nesse grupo, encontram-se os substituintes: halogênios que são desativantes fracos, e o grupo nitro, que é classificado como desativante forte. As características das biorreduções de cada um, serão discutidas logo em seguida.

##### 4.8.2.1 Halogenados

Foram utilizados também como substratos cetonas com substituintes de halogênio. Estes podem estar presente tanto na parte alifática, bem como na parte aromática da cadeia.

A figura 97 apresenta o esquema reacional com os substratos halogenados utilizados e a tabela 33 traz os resultados obtidos.

FIGURA 97 – Esquema de biorredução de cetonas aromáticas halogenadas

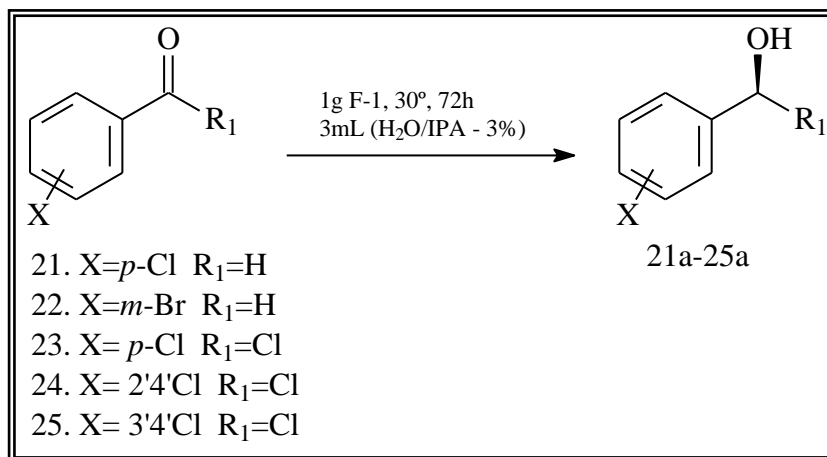


TABELA 33 – Resultados das biorreduções das cetonas aromáticas halogenadas

Entrada	X	R <sub>1</sub>	Substrato	Conv. (%)	ee (%)	Configuração
1	4'Cl	H	21	24	>99	<i>S</i>
2	3'Br	H	22	56	>99	<i>R</i>
3	4'Cl	Cl	23	69	>99	<i>R</i>
4	2',4'Cl	Cl	24	78	>99	<i>R</i>
5	3',4'Cl	Cl	25	78	89	<i>R</i>

As entradas 1 e 2 correspondem as cetonas aromáticas substituídas apenas no anel aromático. O substrato com o grupo cloro na posição *para*- sofreu conversão moderada de 24% e excelente *e.e.*, com obtenção do álcool enantiopuro de configuração *S* (entrada 1). Justifica-se esse valor de conversão por fatores eletrônicos já discutidos anteriormente, pois muito embora, hologênios sejam desativantes fracos, são eletro-doadores. Com o substrato bromo-derivado (entrada 2), na posição *meta*-, a conversão sofre aumento de valor, o que pode ser justificado tanto por não haver impedimento estérico, como pela ausência de fator eletrônico. Observa-se a formação do enantiômero de configuração *R*, o que é de certa forma surpreendente, pois a mudança do haleto, causou alteração no sítio enzimático, de forma que o outro isômero foi obtido.

Uma série de  $\alpha$ -cloro-cetonas (entradas 3-5) também foram testadas como substratos nos processos de biorredução. A redução desses compostos leva à formação das correspondentes halodrinhas que são intermediários versáteis na preparação de compostos bioativos. Quando o 2,4'-dicloroacetofenona (entrada 3) foi submetido a biorredução com F-1, o correspondente álcool de configuração Prelog, foi obtido, com boa conversão e excelente *ee*, com formação de apenas um enantiômero. Mesma situação ocorreu para a biorredução de 2,2',4' tricloroacetofenona e 2,3',4' tricloroacetofenona, ambos sofreram conversão ao álcool desejado e com enantiosseletividades excelentes. Nota-se que a presença do grupo cloro na posição  $\alpha$ -carbonila, trata-se de um fator positivo, pois melhora sensivelmente os valores de conversão, o que pode ser justificado pelo efeito de eletronegatividade do halogênio deixando a carbonila mais susceptível à redução.

Os produtos correspondentes às entradas 3-5, possuem configuração absoluta oposta (*R*), devido à troca do substituinte de maior prioridade de acordo com as regras de CIP.

#### 4.8.2.2 Nitradados

Os próximos substratos utilizados nas reações de biorredução foram as cetonas aromáticas nitradas. O grupamento nitro é considerado forte desativante do anel pois possui em sua estrutura átomos de nitrogênio e oxigênio, que são bastante eletronegativos. Além disso esse grupo, também se apresenta sensível nos processos de biorredução, e a redução desses substratos se faz importante para verificação da quimiosseletividade dessas reações.

A figura 98 apresenta o esquema reacional dessas biorreduções e a tabela 34, os resultados encontrados.

FIGURA 98 – Esquema reacional das biorreduções das cetonas aromáticas nitradas

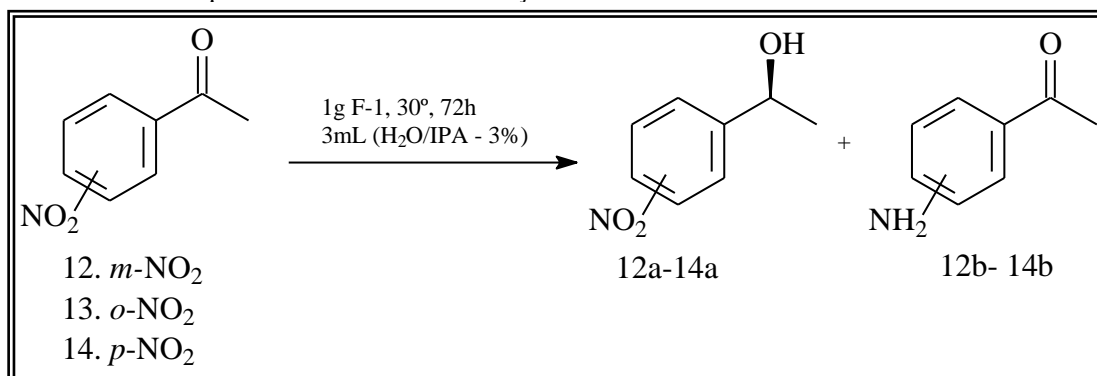


TABELA 34 – Resultados das biorreduções das cetonas aromáticas nitradas

Entrada	Substrato	Produto	Conversão (%)	<i>e.e</i> (%)
1	<i>o</i> -NO <sub>2</sub> -acetofenona – 13	Álcool – 13a	2,5	99( <i>S</i> )
2		Amina – 13b	85,9	-
3	<i>m</i> -NO <sub>2</sub> -acetofenona – 12	Álcool – 12a	26,7	89 ( <i>S</i> )
4		Amina – 12b	68,6	-
5	<i>p</i> -NO <sub>2</sub> -acetofenona – 14	Álcool – 14a	40,3	99 ( <i>R</i> )
6		Amina – 14b	56,2	-

Pode-se observar com base na tabela 34 que nessas biorreduções houve a formação de dois produtos, um, obtido a partir da redução da cetona e o outro obtido a partir da redução do grupo nitro. Em nenhum momento foi observada a formação de produto oriundo da redução desses dois grupos concomitantemente.

Para a redução da *orto*-nitro-acetofenona, verifica-se a formação majoritária do produto amina, com aproximadamente 86% (entrada 2), e com conversão de apenas 2,5% ao respectivo álcool enantiopuro de configuração (*S*). Isso é de fato interessante, visto que os grupo encontram-se muito próximos, mas parece que há um melhor acesso do grupo nitro, sendo este que sofre uma maior redução.

No caso da biorredução da *m*-NO<sub>2</sub>-acetofenona (entradas 3 e 4), o produto amina, também foi obtido com maior conversão, de 68%, quando comparado com a obtenção do álcool, o qual foi de 26%. Observa-se uma redução de valores de produto amina e aumento de produto álcool, quando comparado à reação com o *orto*-nitro. Pode-se justificar esse fator, por um melhor acesso da enzima ao grupo carbonila, já que os substituintes encontram-se mais

afastados. Finalmente com a redução da *p*-nitro-acetofenona (entradas 5 e 6), observa-se uma menor formação da correspondente amina, se comparada aos demais substratos. Nesse caso, houve conversão de 56% para a amina e de 40% para o álcool de configuração oposta aos demais obtidos até então. Observa-se nessa sequência que à medida que o grupo nitro se afasta da carbonila, a conversão para amina vai reduzindo, enquanto que a conversão do grupo carbonila ao respectivo álcool vai aumentando, justifica-se os valores de aumento da conversão do álcool por fatores estéricos.

### 4.8.3 Nitrocompostos

Uma vez que, foi encontrada uma atividade nitroreductora pouco comum das cetonas aromáticas nitradas, obtendo-se as correspondentes aminas, decidiu-se testar então outros nitrocompostos como substratos para esse sistema biocatalítico.

Foi realizado inicialmente um estudo de condições reacionais com o nitrobenzeno, variando parâmetros como solvente, quantidade de biocatalisador ou temperatura. A figura 99 apresenta o esquema reacional e a tabela 35, os resultados obtidos com a mudança de cada parâmetro.

FIGURA 99 – Esquema reacional das biorreduções para o nitrobenzeno

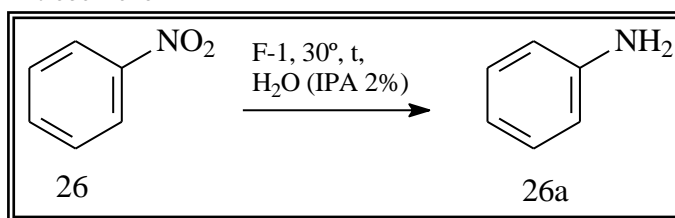


TABELA 35 – Resultados das biorreduções para o nitrobenzeno

Entrada	Substrato (mg)	Solvente (mL)	F1 (g)	Tempo (h)	Conv. (%)
1	5	3	1	72	14,0
2	10	10	4	72	28,7
3	5	12	4	72	7,9
4	5	12	4	120	29,5
5	5	10	4	72	14,2
6	5	10	4	120	38,6

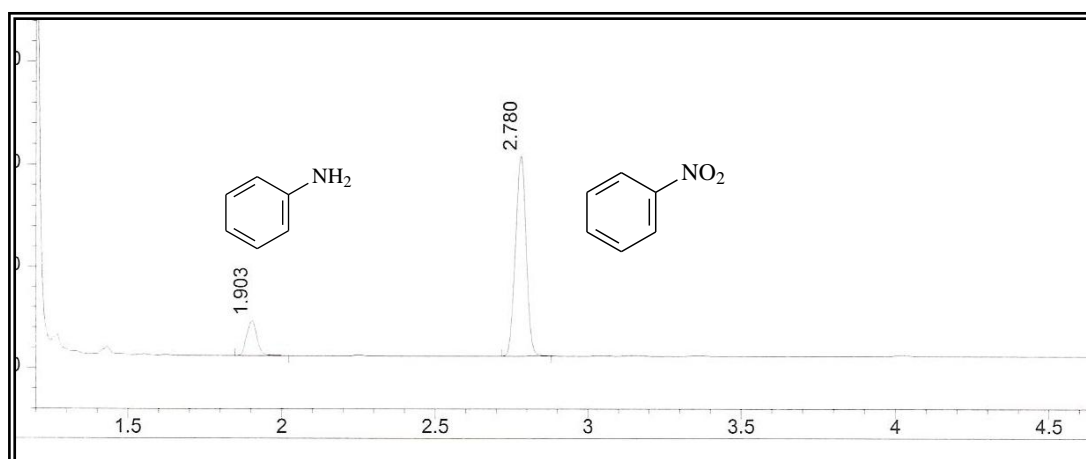
Ao se reduzir o nitrobenzeno nas mesmas condições utilizadas para acetofenona, observou-se a formação de 14% da respectiva amina (entrada 1). Aumentando-se as quantidades de substrato, solvente e de biocatalisador, observou-se que houve um aumento significativo na redução do grupo nitro, gerando a correspondente amina com 28,7% com 72h de reação (entrada 2). Isto era de certa forma esperado pois, aumentou-se no meio a quantidade de enzimas para uma menor quantidade de substrato, favorecendo dessa maneira a atuação dessas no meio reacional.

Uma outra mudança foi realizada no intuito de melhorar a conversão do grupo nitro, dessa vez reduziu-se a quantidade do substrato para 5mg (entrada 3), a quantidade de biocatalisador também foi aumentada, bem como a quantidade de solvente. Nesse caso, houve uma redução drástica na obtenção da amina, que caiu para 7,9% com 72h de reação, quase metade do valor obtido nas condições da entrada 1. Essa redução pode ser atribuída a pequena quantidade de substrato no meio, diminuindo sua concentração, o que não favorece a via enzimática. Essa mesma reação com um intervalo reacional de 120h, chegou a um máximo de obtenção de amina de 29,5%, valor semelhante ao da entrada 1, porém com um maior tempo de reação. Percebe-se portanto que essa condição não é adequada para esse tipo de reação.

Diminuindo-se dessa condição acima citada, a quantidade do solvente, ou seja, aumentando a concentração do substrato, percebe-se que há uma melhoria na conversão do grupo nitro, chegando-se a uma conversão para a amina de 14,2% para 72h de reação. Este valor foi melhorado ao se aumentar o tempo reacional para 120h (entrada 6), chegando a um máximo de 38,6%. Mesmo com a obtenção desses valores, essa condição não se mostra adequada, pois o tempo de reação é muito longo.

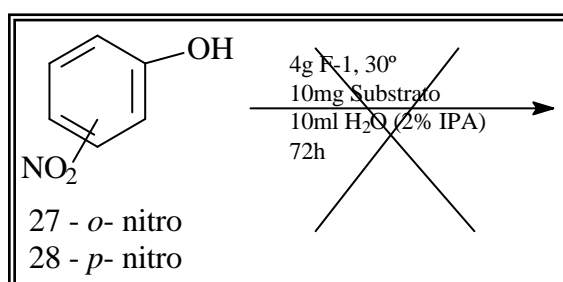
A figura 100 apresenta o cromatograma de separação do nitrobenzeno e da anilina.

FIGURA 100 – Cromatograma de separação em CG/DIC compostos 26 e 26a



De acordo então com os dados exibidos, dentre as condições testadas, aquela que melhor pareceu para ser utilizada com outros nitroderivados, corresponde a entrada 2, onde se utiliza 10mg do substrato, 10mL de solvente (H<sub>2</sub>O/IPA 2%), 4 g de F-1 com um tempo reacional de 72h. Utilizou-se então como substratos, *o*-nitrofenol e o *p*-nitrofenol, conforme mostra a figura 101.

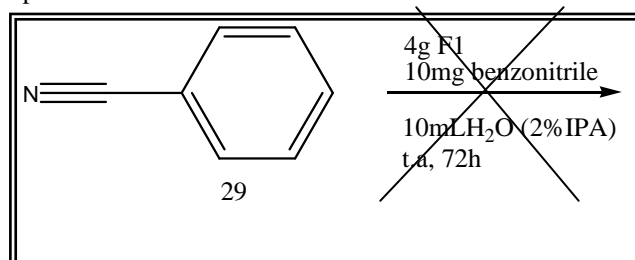
FIGURA 101 – Esquema reacional das biorreduções para o hidróxi-nitrobenzeno



Utilizando esses dois substratos, não foi observada nenhuma reação, mesmo depois de longo tempo. Isso mostra que grupos substituintes doadores de elétrons, como a hidroxila, desfavorecem a biotransformação. Esse fato pode explicar o porquê na redução das cetonas aromáticas nitradas, não foi observada a formação de produtos oriundos da redução carbonila e do grupo nitro.

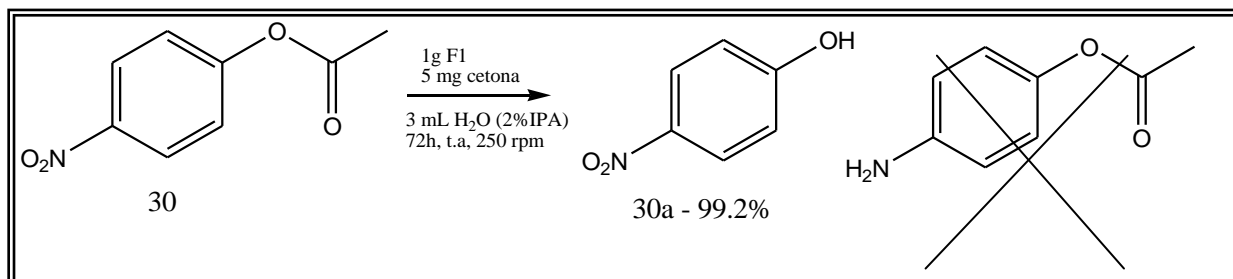
A benzonitrila também foi submetida a biorredução, conforme esquema da figura 102, e nesse caso também não foi observada formação de produto.

FIGURA 102 – Esquema reacional das biorreduções para a benzonitrila



Finalmente também foi testada, a biorredução do etanoato de 4-nitro-fenila, conforme figura 103 que apresenta as condições da reação.

FIGURA 103 – Esquema reacional da biorredução nitro-acetato



De acordo com o esquema apresentado na figura 103, foi obtida a formação quase completa (99,2%) do produto da hidrólise do grupo acetato, não havendo formação do produto da redução do grupo nitro. Essa mesma reação foi realizada sem a presença do biocatalisador, ou seja, um teste em branco, nessa condição, apenas 36% do produto da hidrólise foi obtido. Isso comprova a eficiência das enzimas de *V. unguiculata* de realizar esse tipo de reação à uma taxa moderada.

#### 4.8.4 Compostos alifáticos e $\beta$ -ceto-ésteres

Cetonas alifáticas e  $\beta$ -ceto-éster também foram submetidas à reações de biorredução biocatalisadas com as enzimas presentes em *Vigna unguiculata*. A figura 104 apresenta o esquema reacional e as condições empregadas e a tabela 36, os resultados obtidos.

FIGURA 104 – Resultados das biorreduções para cetonas alifáticas e  $\beta$ -ceto-ésteres

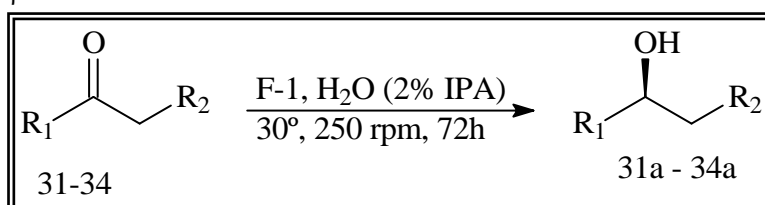




TABELA 36 – Resultados das biorreduções para cetonas alifáticas e  $\beta$ -ceto-ésteres

Entrada	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Substrato	Tempo (h)	Conv. (%)	ee (%)	Config.
1	-CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	H	31	72	16	>99	S
2	-CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	H	32	72	19	>99	S
3	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>	H	33	48	83	>99	S
4	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>	Cl	34	48	88	>99	R

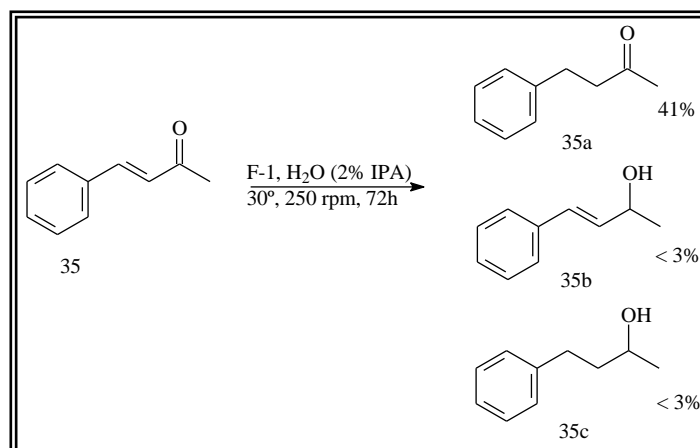
Como pode ser observado na tabela 36, os resultados para as reduções de composto de cadeia alifática não são muito satisfatórios. Para a biorredução da octan-2-ona (entrada 1) o álcool foi obtido com apenas 16% de conversão. Um valor um pouco maior foi alcançado, quando se usou a undecan-2-ona (entrada 2) para obtenção do seu respectivo álcool, nesse caso, um valor de 19%. Em ambos casos as conversões podem ser consideradas baixas, e os valores de *ee* encontrados foram excelentes, mostrando apenas a formação de um único enantiômero de configuração *S*. Verifica-se que esses substratos não são adequados para este tipo de biotransformação.

No caso das reduções de  $\beta$ -ceto-ésteres levou a produção dos respectivos  $\beta$ -hidróxi-ésteres quirais, que são considerados importantes *síntons* na química. Para a redução do acetoacetato de etila, o produto foi obtido com alta conversão, 83% em 48h (entrada 3), havendo formação total do produto com 72h reacionais, isso indica uma alta atividade da espécie testada para esse tipo de composto. Resultado semelhante foi obtido, quando se utilizou o 4-cloro-acetoacetato de metila, nesse caso, foi observada, conversão de 88% em 48h reacionais (entrada 4), chegando a obtenção do produto com conversão máxima nas 72h de reação. As configurações dos  $\beta$ -hidróxi-ésteres obtidos, seguem a regra de Prelog, mesmo no caso do 4-cloro-acetoacetato de metila, onde se obtém o álcool com configuração invertida. Essa inversão ocorre devido à mudança das ordens de prioridade dos grupos substituintes conforme as regras de CIP. Esse álcool é muito importante na rota de obtenção de diferentes fármacos.

#### 4.8.5 Redução de uma cetona $\alpha,\beta$ -insaturada

Um último substrato ainda foi testado nas reações de biorredução, uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada, a 4-fenil-but-3-en-2-ona (35), como mostra o esquema reacional da figura 105, que apresenta também os produtos obtidos e seus valores de conversão.

FIGURA 105 – Resultados das biorreduções para fenil-butanona



A redução de alcenos assimétricos é muito atrativa para os químicos orgânicos, pois oferece uma nova possibilidade de criar dois centros assimétricos do tipo  $sp^3$  em uma única etapa. De acordo com o esquema apresentado na figura 105, percebe-se a formação de 3 produtos, oriundos da biotransformação do substrato mencionado. A conversão maior foi alcançada para o produto obtido pela redução da insaturação, gerando o respectivo composto saturado, num percentual de 41%. Percebe-se então uma grande habilidade das enzimas presentes nesse material para esse tipo de redução. Os outros dois produtos formados em bem menor quantidade, são oriundos da redução carbonila e da redução da dupla e cetona, concomitantemente. Ressalta-se dessa maneira, a habilidade diferenciada na redução de duplas ligações pela enzimas presentes em *V. unguiculata*.

#### 4.9 Procedimento realizado com lipases comerciais

Nesse item são descritos e discutidos todos os resultados obtidos nas reações de acilação do fármaco cloranfenicol, utilizando diversos agentes acilantes e lipases comerciais para obtenção de seus derivados.

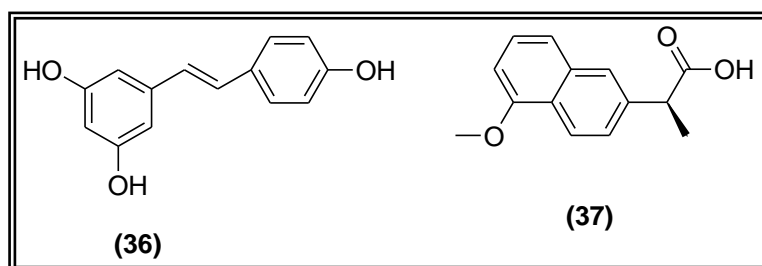
#### 4.9.1 Screening de enzimas

Inicialmente, foi realizada a reação de esterificação do cloranfenicol com as lípases comerciais: *Candida antarctica* (CAL) do tipo A e B; e *Pseudomonas cepacia* (PSL-C) do tipo I e Amano, pois estas possuíam atividades comprovadas na literatura.

Enzimas do tipo CAL-A são descritas na literatura participando de inúmeras reações e etapas de síntese, em meios reacionais variados. Pode-se citar a hidrólises de aminas (LILJEBLAD *et al*, 2010), a resolução cinética de N-heterociclos  $\alpha$ -amino-ésteres (LILJEBLD *et al*, 2004), a resolução cinética de cis- e trans-  $\beta$ -hidroxi-ésteres (LEVY *et al*, 2003), as esterificações enantioseletivas de alcoóis terciários (KRISHNA *et al*, 2002) e na obtenção de derivados enantioseletivos do ácido chiquímico (ARMESTO *et al*, 2003).

Para a enzima CAL-B, também são descritas diversas atividades na literatura. Merecendo destaque a catálise de mono-acilações regioseletivas de 1,5-dióis (OGER *et al*, 2010), a síntese regioseletiva de 3-O-acil- derivados de resveratrol (36) – figura 106 – (TORRES *et al*, 2010), a esterificação do fármaco naproxen (37) – figura 106 – (MORRONE, *et al*, 2010), a síntese quimioenzimática de nucleosídeos (RODRÍGUES-PEREZ *et al*, 2010) e a epoxidação de terpenos (TZIALLA *et al*, 2009).

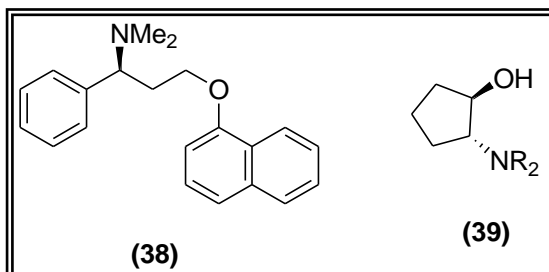
FIGURA 106 – Estruturas de Resveratrol (36) e *S*-naproxen (37)



Com relação a atividade das enzimas de *Pseudomonas cepacia* imobilizada e não imobilizada existem vários relatos em reações orgânicas. Relata-se seu uso na síntese quimioenzimática de dapoxetina (38) - figura 107 - numa etapa de hidrólise de grupamento éster (RODRIGUEZ-MATA *et al*, 2010), sendo também empregada na síntese de derivados de trans-2-aminociclopentanol (39) – figura 107 - (GONZÁLEZ-SABÍN, 2009), em transesterificações e hidrólises em líquidos iônicos (VIDYA *et al*, 2009), acilação

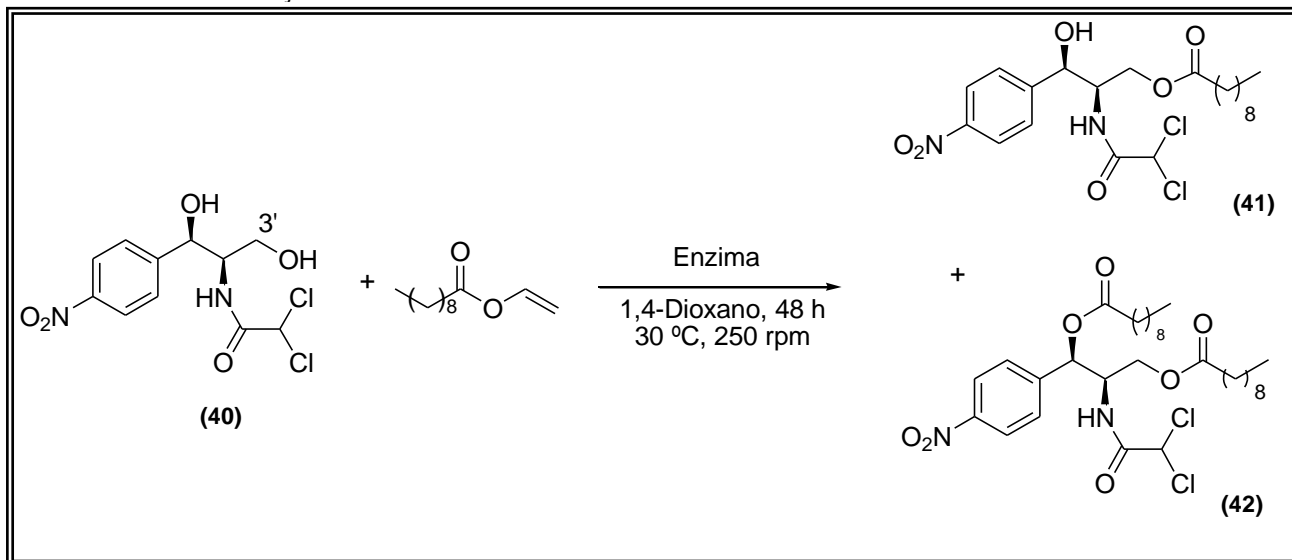
enantiosseletiva de compostos racêmicos (PCHELKA *et al*, 2001) e também na síntese de heterociclos oticamente ativos (RÍOS-LOMBARDÍA *et al*, 2010).

FIGURA 107 – Estruturas de Dapoxetina (38) e 2-trans-amino-ciclopentanol (39)



Em virtude destas enzimas serem ativas e bastante relacionadas em reações de hidrólise e acilação, foram testadas inicialmente na reação de acilação de cloranfenicol utilizando o decanoato de vinilo, como doador de fragmento acila, nas condições descritas no capítulo 5, item 5.10.1 e conforme esquema reacional apresentado na figura 108.

FIGURA 108 – Esterificação enzimática de cloranfenicol com decanoato de vinilo



Ao final de cada reação os produtos reacionais foram analisados por CLAE e comparados seus tempos de retenção com padrões dos derivados mono- (41) e diacilado (42) do cloranfenicol. Os padrões utilizados na análise foram obtidos da reação química clássica realizada anteriormente com cloranfenicol e o respectivo cloreto de ácido, cuja descrição

encontra-se no item 5.11.1 Nas reações enzimáticas observou-se a formação dos compostos 41 e 42 (figura 108), conforme apresentado na tabela 37.

TABELA 37– Resultados das reações iniciais de acilação do cloranfenicol

<b>Entrada</b>	<b>Enzima</b>	<b>41 (%)</b>	<b>42 (%)</b>
1	CAL-A	22,2	11,3
2	CAL-B	72,0	4,9
3	PSL-C (Amano)	87,3	-
4	PSL-C (I)	94,3	-

Todas as enzimas testadas foram ativas para este tipo de reação, entretanto exibiram atividades diferenciadas. As enzimas PSL-C (I) e PSL-C Amano, apresentaram os melhores resultados de conversão, com formação do composto mono-acilado (41) com valores de 94% e 87%, respectivamente (entradas 3 e 4, tabela 37), que são considerados excelentes. Sendo portanto selecionadas para continuidade do estudo de obtenção dos derivados. Além disso, não foi detectada a presença do composto di-acilado (42), destacando-se a regioseletividade das mesmas.

Já o uso de CAL-B embora tenha formado um percentual baixo do produto di-acilado (42), produziu também em boa conversão o produto mono-acilado (41). Podendo também ser selecionada para a obtenção dos ésteres, pois há possibilidade de minimizar a formação do produto diacilado em outras condições, visto que, este foi obtido em pequena quantidade. CAL-A apresentou resultado insatisfatório, com baixo rendimento e seletividade, sendo inviável sua utilização em novos procedimentos.

#### **4.9.2 Otimização das condições reacionais**

Para otimizar as condições das reações de acilação de cloranfenicol com ésteres vinílicos biocatalisadas por enzimas comerciais, foram adotadas mudanças no meio reacional, como variação de solvente e temperatura. As reações adotaram o mesmo procedimento descrito anteriormente.

#### 4.9.2.1 Variação de solvente

A influência desse parâmetro foi avaliada com os solventes THF (tetrahidrofurano), acetonitrila (solventes polares apróticos) e TBME (terc-butil-metil-éter), devido às suas baixas toxicidades, e, portanto serem solventes menos poluentes, agredindo menos ao homem e ao meio ambiente. Todas as reações utilizaram a mesma metodologia e suas alíquotas foram analisadas com tempos de 24 e 48h ( tabela 38 ).

TABELA 38 – Resultados das reações de acilação com mudança de solvente

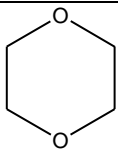
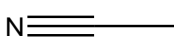
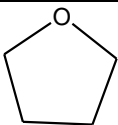
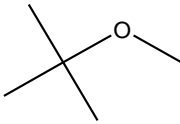
<b>Entrada</b>	<b>Enzima</b>	<b>Solvente</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>41 (%)</b>
1	CAL-B	THF	24	30,5
2			48	37,2
3	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	24	73,5
4			48	80,1
5	CAL-B	TBME	24	27,2
6			48	28,4
7	PSL-C (Amano)	THF	24	14,8
8			48	20,7
9	PSL-C (Amano)	CH <sub>3</sub> CN	24	51,0
10			48	61,6
11	PSL-C (Amano)	TBME	24	41,5
12			48	50,9
13	PSL-C (I)	THF	24	12,0
14			48	16,8
15	PSL-C (I)	CH <sub>3</sub> CN	24	32,6
16			48	49,8
17	PSL-C (I)	TBME	24	37,3
18			48	43,0

De acordo com os resultados exibidos na tabela 38, a variação de solvente alterou significativamente os valores de conversão, se comparados àqueles da tabela 37, que apresenta os resultados das reações iniciais. No entanto, baseado nos dados obtidos até então,

não se pôde atribuir um parâmetro quantitativo confiável que possa refletir as múltiplas interações entre solvente orgânico-enzima, que permita prever com sucesso a atividade catalítica ótima em meio não aquoso. Há descrito na literatura, a relação entre atividade enzimática com a polaridade do solvente, sua constante dielétrica ou o logaritmo do solvente de partição, também chamado Log P. Propondo uma justificativa para os resultados aqui apresentados, utiliza-se nesse trabalho a relação entre a enzima e a constante dielétrica do solvente ou seu momento dipolar.

A constante dielétrica ( $\epsilon$ ) de um meio uniforme é definida de pela relação entre a força entre as cargas das moléculas e a distância que as separa. Assim, quanto maior a  $\epsilon$  do meio, menor a força de atração entre as cargas, o que em outras palavras significa que, um líquido com alta constante dielétrica é capaz de solvatar bem íons mantendo-os dissociados em solução. Dessa constante depende também a interação do solvente com os substratos que estão no meio reacional. Assim esses dois parâmetros são os escolhidos para serem discutidos com relação a influência do solvente no meio reacional. A tabela 39 apresenta dados de ponto de ebulição, constante dielétrica e momento dipolar dos solventes utilizados.

TABELA 39 – Constantes físicas dos solventes utilizados nas reações de esterificação de cloranfenicol

Solvente	Estrutura	Ponto de Ebulição (°C)	Constante dielétrica ( $\epsilon$ )	Momento dipolar ( $\mu$ )
1,4-Dioxano		101	2,3	0,45D
Acetonitrila		82	37,5	3,92D
THF		66	7,58	1,75D
TBME		55	2,6	1,4D

Em reações com a enzima CAL-B, houve significativa redução de conversão quando os solventes THF e TBME foram utilizados, pois estas foram de 28% e 37% respectivamente (entradas 2 e 6, tabela 38) se comparados ao valor da reação preliminar, realizada em dioxano (tabela 1, entrada 38). Entretanto quando se utilizou CH<sub>3</sub>CN, a conversão atingiu 80% (entrada 4, tabela 38), um valor superior ao apresentado na reação com dioxano. Além disso, em nenhum dos casos houve formação do composto decanoato diacilado (42), indicando que o solvente tem influência na regioselectividade da enzima.

Uma relação entre os solventes que não foram ideais para a atividade desta enzima permite destacar que THF, TBME e dioxano, apresentam baixas constantes dielétricas e momentos dipolares, valores estes quando comparados aos da acetonitrila. Pode-se sugerir que, uma melhor atividade desta enzima é proporcionada pelo uso de solventes com altas constantes dielétricas e momentos dipolar, como é o caso da acetonitrila. Portanto, usa-se como justificativa para esses resultados, esses dois parâmetros, escolhendo assim o uso de acetonitrila como solvente ideal para ser usado com a enzima CAL-B nas reações posteriores.

A alteração do solvente em reações que utilizaram PSL-C Amano e PSL-C(I) como biocatalisadores, apresentaram redução significativa da atividade enzimática quando comparados às reações realizadas em dioxano. Resultados semelhantes foram observados com as mesmas variações para as duas enzimas. O solvente que mais influenciou na perda de atividade de ambas, foi o THF, o qual levou a grande redução nos valores de conversão, de 87% e 94% para 20,7% e 16,8%, quando do uso de PSL-C Amano e (I), respectivamente. Os outros dois solventes (TBME e CH<sub>3</sub>CN) usados também levaram a perda de atividade das enzimas, em menor proporção que no caso anterior. Quando CH<sub>3</sub>CN foi usada com PSL-C Amano, a conversão em 48h foi de 61,6% (entrada 10, tabela 38), enquanto que para PSL-C (I) foi de 49,8% (entrada 16, tabela 38). Percebe-se nesse caso que esse solvente teve maior influência na atividade de PSL- C(I), pois houve maior decréscimo na conversão. Mesma conclusão pode ser estendida ao uso de TBME com as enzimas, pois também houve significativa redução de conversão, sendo esta mais acentuada quando do seu uso com PSL-C(I).

Vale destacar que essas comparações são feitas com as reações preliminares, cujos resultados estão descritos na tabela 37 e que correspondem a 48h reacionais e formação do produto decanoato mono-acilado (41). Relacionando os valores de constantes dielétricas e momentos dipolares dos solventes utilizados, pode-se sugerir que o solvente que possui os menores valores para esses parâmetros, no caso, 1,4-dioxano, foi o que proporcionou uma melhor atividade para essas enzimas.



Esse fato está de acordo com o que define Lima (1999), pois segundo o autor, as ligações intramoleculares que conferem estabilidade, rigidez e maior atividade à enzima são definidas por ligações de hidrogênio, sendo, portanto eletrostáticas. Logo, a estabilidade dessas ligações deve aumentar em solventes com baixa constante dielétrica. Vale lembrar que a enzima CAL-B neste caso, não correspondeu à essa informação. Isso então pode ser utilizado para justificar as respectivas atividades e, portanto a escolha desse solvente para atuar como meio enzimático.

Em nenhuma das reações realizadas foi detectada a presença do composto diacilado, destacando-se assim a regiosseletividade enzimática. Com base nesses experimentos pode-se afirmar que para as reações de esterificação de cloranfenicol, biocatalisadas por CAL-B, o solvente adequado é acetonitrila, enquanto que para as lípases PSL-C (I) e Amano, o solvente ideal é 1,4-dioxano.

#### ***4.9.2.2 – Variação da temperatura***

Sabe-se da literatura, que as enzimas têm suas atividades fortemente influenciadas pela temperatura a qual estão submetidas, onde altas temperaturas podem levar a perda total ou parcial de sua atividade causada pela desnaturação da mesma. A exposição à elevadas temperaturas por tempos prolongados levam a processos de desenrolamento da estrutura da enzima que expõe os grupos reativos e áreas hidrofóbicas internas da proteína, acarretando em modificações químicas irreversíveis que levam a inativação da enzima. Entretanto, sabe-se também que elas possuem temperaturas ditas “ótimas” para atuarem, e cada uma tem uma determinada característica.

Nesse trabalho utiliza-se enzimas suportadas, onde esse suporte oferece uma maior resistência às enzimas que se encontram imobilizadas e, portanto protegidas por ele, para atuarem em maiores faixas de temperatura sem perda de sua atividade. Assim, foram testadas nessas reações temperaturas de 20°C, 40°C e 45°C. Algumas dessas variações também foram acompanhadas pela mudança de solvente, utilizando-se àqueles que foram previamente estabelecidos como adequados para cada enzima.

Os resultados obtidos apresentam-se nas tabelas 40 e 41, onde a primeira apresenta os resultados das variações realizadas apenas com a enzima CAL-B e a outra, traz resultados obtidos com o uso de PSL-C (I) e Amano. Além desses dados, as tabelas também apresentam resultados de reações já descritas anteriormente para efeito de melhor comparação entre os mesmos.

TABELA 40 – Resultados das reações de acilação com mudança de temperatura e solvente com CAL-B

Entrada	Enzima	Solvente	T (°C)	t (h)	41 (%)	42 (%)
1	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	24	85,9	-
2				48	94,2	-
3		CH <sub>3</sub> CN	30	24	73,5	-
4				48	80,1	-
5		CH <sub>3</sub> CN	40	24	72,4	-
6				48	59,1	10,1
7		Dioxano	20	24	5,7	-
8				48	6,4	-
9		Dioxano	30	48	72,0	4,9
10		Dioxano	40	24	41,5	-
11				48	46,8	

De acordo com os dados apresentados para as reações com diferentes temperaturas observou-se grande variação nos resultados de conversão. Reações com CAL-B à 20°C tiveram conversão excelente usando acetonitrila como solvente, chegando a um total de 94,2% com 48 horas de reação (entrada 2, tabela 40). À essa mesma temperatura, quando foi usado 1,4-dioxano como solvente ocorreu uma perda quase que total da atividade dessa enzima, levando à baixíssimo resultado de conversão, com 6,4% de produto (entrada 8, tabela 40). O que sugere que mudanças de temperatura aliadas a modificações de solvente, podem variar significativamente a atividade enzimática, variando os resultados entre excelentes e ruins.

Ainda com o objetivo de observar os efeitos de temperatura, realizou-se o experimento a 40°C. Quando nessa condição se usou 1,4-dioxano como solvente, percebeu-se atividade moderada com conversão de 46,8 % e 48h de reação (entrada 11, tabela 40). Mesmo sabendo que esse solvente não foi o ideal para esta enzima, esse valor foi inferior quando se usou na reação a temperatura de 30°, cuja conversão foi de 72% (entrada 9, tabela 38). Entretanto para este caso, a maior temperatura influenciou na regioselectividade da enzima,

pois à 40° não houve formação do composto di-acilado, havendo sua formação à 30°, embora em pequena conversão, 4,9% (entrada 9, tabela 40) do produto di-acilado (42) não-desejado.

No caso da reação à 40°C usando como solvente acetonitrila percebeu-se um efeito interessante na reação. Com 24h há um elevado valor de conversão para o produto, superior a 72% (entrada 5, tabela 40). Entretanto, esse valor sofre redução nas 24h seguintes, pois inicia-se o aparecimento do produto di-acilado. Sugere-se que, a esta temperatura há perda de regiosseletividade da enzima, onde o composto mono-acilado, começa a ser acilado novamente (entrada 6, tabela 40).

Efeito contrário é observado para essa mesma enzima, quando o aumento de temperatura ocorre quando se usa dioxano como solvente do meio. À temperatura de 20°C e uso deste solvente, a atividade desta enzima é mínima, com conversão de 6,4% (entrada 8, tabela 40). Na reação à 30° há uma melhoria na conversão, entretanto há perda de seletividade, ocorrendo a formação de produto di-acilado (entrada 9, tabela 40). Essa atividade continua reduzindo quando a reação ocorre a 40°C.

Através dos estudos realizados, pode-se estabelecer a influência dos solventes e da temperatura na regiosseletividade enzimática de CAL-B nesses processos. Define-se portanto, como temperatura ideal de 20°C em acetonitrila, as condições que levaram aos melhores resultados. O que é de fato surpreendente, pois de acordo com Gotor-Fernández e colaboradores a temperatura ótima de atividade desta enzima é entre 30-40°C (Gotor-Fernández *et al*, 2006b).

Para as reações realizadas com PSL-C (I) e Amano, com variações de condições reacionais, a tabela 41 apresenta os resultados obtidos.

TABELA 41– Resultados das reações de acilação de cloranfenicol com variação de temperatura e solvente com PSL-C (I) e Amano

<b>Entrada</b>	<b>Enzima</b>	<b>Solvente</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (h)</b>	<b>41 (%)</b>
1	PSL-C(I)	Dioxano	20	24	38,9
2				48	61,2
3		Dioxano	30	48	94,3
4		Dioxano	40	24	53,0
5				48	57,4
6		Dioxano	45	24	45,9
7				48	47,0
8	PSL-C Amano	Dioxano	30	48	87,3
9		Dioxano	40	24	4,9
10				48	5,8

Reações que utilizaram PSL-C(I) à diferentes temperaturas, pôde-se observar nitidamente a sua influência sobre a atividade enzimática. Para reações à 20°C e conversão de 61% (entrada 2, tabela 41), houve significativa perda de atividade, quando comparada à reação realizada à 30°C (entrada 3, tabela 41). Verifica-se que há contínua redução de atividade enzimática quando se eleva a temperatura do meio reacional. Nas reações à 40°C e 45°C foram obtidos valores de conversão de 57 e 47% respectivamente com 48h reacionais (entradas 5 e 7, tabela 41). Diferentemente do comportamento exibido pela enzima CAL-B, mudanças de solvente e temperatura não influenciaram na seletividade desta enzima, pois em nenhum momento foi detectada a presença do produto di-acilado.

Finalmente quando se usou PSL-C Amano como biocatalisador, uma grande perda de sua atividade foi observada quando se elevou a temperatura da reação de 30°C para 40°C. Houve queda de conversão de 94% (entrada 8, tabela 41) para 5,8% (entrada 10, tabela 41), que é justificada pelo aumento da temperatura. Pode-se ainda salientar que, no caso dessa enzima que não se encontra suportada, o efeito da temperatura é mais profundamente sentido por ela, já que esta não está protegida pelo suporte, e, portanto em contato direto com o aquecimento. Ressalta-se dessa maneira, uma grande vantagem de se trabalhar com enzimas imobilizadas, pois o suporte oferece uma maior resistência desta à fatores externos.

Diferentemente do observado com a enzima CAL-B, não foi detectado em nenhum momento quando do uso de PSL-C (I) e Amano, a formação do composto di-acilado.

Pode-se concluir com base nos experimentos realizados até então que, a temperatura ideal de atividade dessas enzimas para este tipo de reação, é de 20°C para CAL-B e 30°C para PSL-C (I) e Amano, pois à temperaturas mais elevadas obtêm-se baixos valores de conversão para o produto desejado, sugerindo assim perda de atividade enzimática.

As melhores condições de atuação das enzimas nos procedimentos realizados estão sumarizadas na tabela 42.

TABELA 42 – Condições ideais de atividade para as enzimas utilizadas

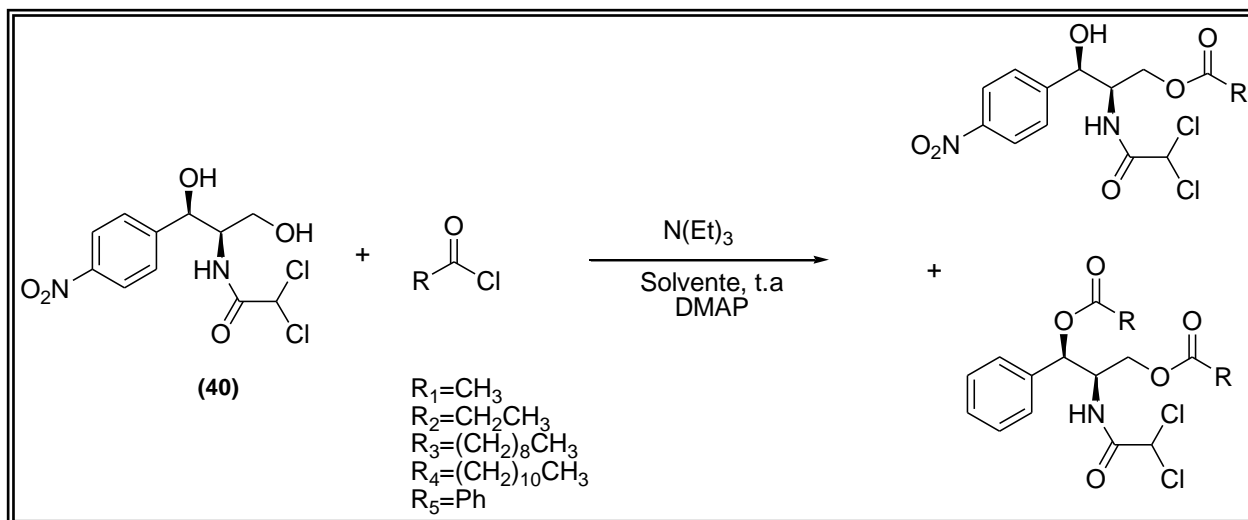
<b>Entrada</b>	<b>Enzima</b>	<b>Solvente</b>	<b>T (°C)</b>	<b>41 (%)</b>
1	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	94,2
2	PSL-C (I)	Dioxano	30	87,3
3	PSL-C (Amano)	Dioxano	30	94,3

#### **4.10 Obtenção dos padrões químicos**

##### ***4.10.1 Obtenção dos padrões com cloretos de ácido***

Depois de estabelecidas as melhores condições experimentais para as reações de acilação enzimática de cloranfenicol produziram-se quimicamente os seus derivados. Esse procedimento se faz necessário em virtude desses derivados não estarem descritos na literatura, bem como, para a devida caracterização dos mesmos e separação em CLAE. O procedimento de obtenção deles encontra-se descrito no item 5.11.1. No caso da metodologia que empregou os respectivos cloretos de ácido para as reações químicas, foram obtidos os derivados: decanoato (41), acetato (43), propanoato (44), laurato (45) e benzoato (46) de cloranfenicol. A figura 109 apresenta o esquema reacional de obtenção desses compostos.

FIGURA 109 – Esquema reacional para obtenção dos derivados de cloranfenicol



Todos os produtos obtidos foram submetidos à purificação e separação em coluna cromatográfica. A tabela 43 apresenta os valores dos produtos em peso após isolamento cromatográfico.

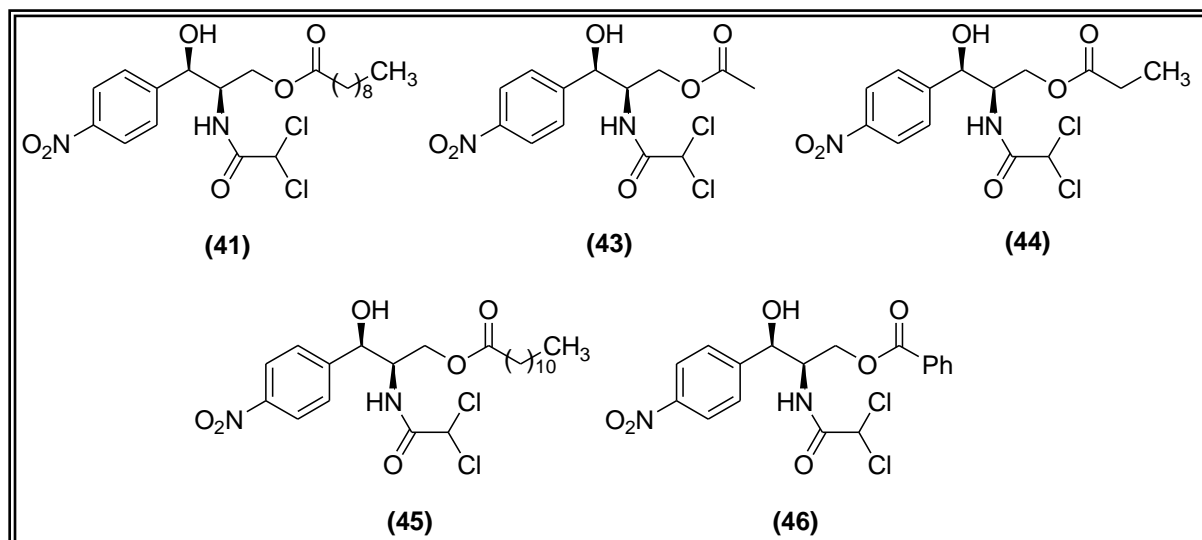
TABELA 43 – Rendimentos das reações químicas para obtenção dos padrões

Entrada	Produto	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	Acetato	52	46
2	Di-acetato	32	25
3	Propanoato	44	37
4	Di-propanoato	28	21
5	Decanoato	42	28
6	Di-decanoato	45	23
7	Laurato	126	81
8	Di-laurato	32	15
9	Benzoato	30	23
10	Di-benzoato	97	59

De acordo com a tabela, todas as reações apresentaram quantidades significativas de produtos formados. Observa-se em todos os casos, devido à alta reatividade do agente acilante, que os dois produtos possíveis, mono- e di-acilado foram formados em grandes quantidades. Após sua obtenção, cada um deles foi devidamente caracterizado através de

técnicas espectroscópicas e espectrométricas adequadas. Somente os produtos mono-acilados estão enumerados como produtos, visto que, nas reações enzimáticas não foram produzidos os derivados di-acilados. A figura 110 apresenta os produtos mono-acilados obtidos. Os espectros de IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  desses compostos encontram-se nos anexos.

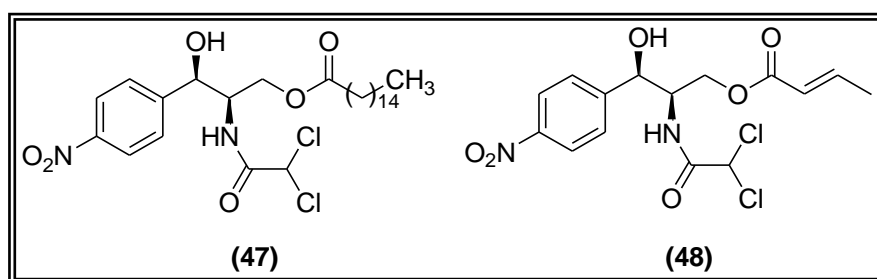
FIGURA 110 – Derivados monoacilados de cloranfenicol obtidos via reação química com cloretos de ácido



#### 4.10.2 – Obtenção de padrões via metodologia enzimática

Para obtenção dos padrões palmitato e crotonato de cloranfenicol, foi utilizada metodologia enzimática em virtude de não se dispor dos respectivos reagentes cloretos de ácido. A metodologia utilizada está descrita no item 5.11.2. Esses derivados após purificação apropriada através de cromatografia foram obtidos os produtos nas quantidades de 15mg para o crotonato e 107mg para o palmitato. No caso de obtenção do composto 48 (crotonato), foi observada baixa reatividade enzimática para sua formação. A figura 111 apresenta esses derivados obtidos.

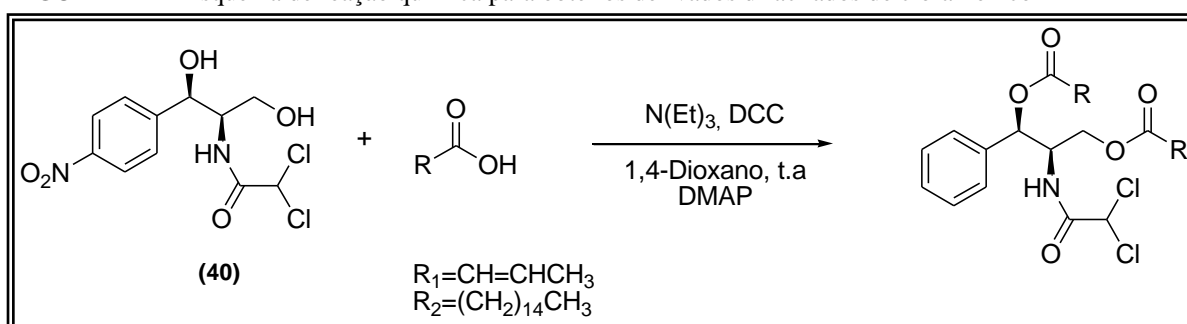
FIGURA 111 – Derivados monoacilados de cloranfenicol obtidos via reação enzimática



### 4.10.3 Obtenção dos padrões di-crotonato e di-palmitato de cloranfenicol

Em virtude da não disponibilidade dos reagentes para produzir os derivados químicos de crotonato e palmitato, e das reações enzimáticas para produção destes, haverem formado apenas o composto mono-acilado, os derivados di-acilados foram produzidos através de outra metodologia, descrita no item 5.11.3. A figura 112 apresenta o esquema reacional da metodologia empregada.

FIGURA 112 – Esquema de reação química para obter os derivados di-acilados de cloranfenicol



Para este tipo de metodologia só há formação do composto di-acilado, em virtude da alta reatividade dos reagentes utilizados. O derivado di-crotonato foi obtido numa quantidade de 97mg e o di-palmitato em 150mg, após purificados através de cromatografia em coluna.

### 4.11 Caracterização dos derivados por RMN <sup>13</sup>C

Os derivados de cloranfenicol são inéditos na literatura, exceto o palmitato, portanto faz-se necessária a caracterização espectroscópica destes compostos. São apresentados nas tabelas 44 e 45 os dados de carbono-13 obtidos. A figura 113 mostram as estruturas dos derivados caracterizadas e devidamente numeradas.



FIGURA 113 – Estruturas dos compostos cloranfenicol (40), acetato (43), propanoato (44) e crotonato (48) de cloranfenicol

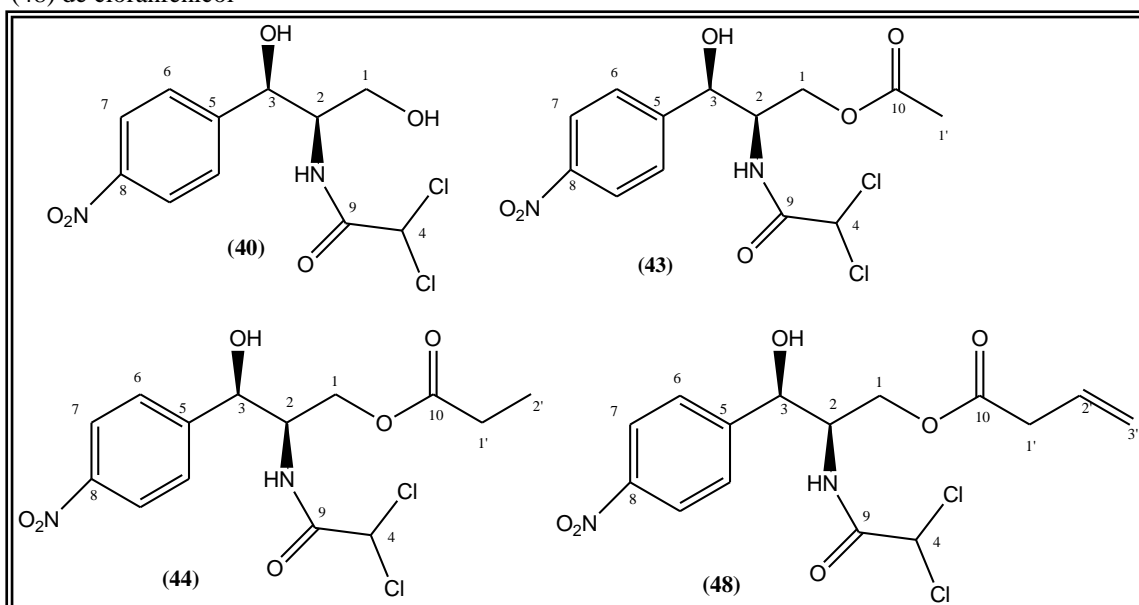


TABELA 44 – Dados de  $^{13}\text{C}$  dos compostos cloranfenicol (40), acetato (43), propanoato (44) e crotonato (48) de cloranfenicol

Entrada	$\text{CH}_3$	$\delta_{\text{C}}$ (40)	$\delta_{\text{C}}$ (43)	$\delta_{\text{C}}$ (44)	$\delta_{\text{C}}$ (48)
1	1'	-	20,8	-	-
2	2'	-	-	8,9	-
3	$\text{CH}_2$	-	-	-	-
4	1	62,4	62,6	27,4	63,9
5	1'	-	-	62,4	18,2
6	3'	-	-	-	122,8
7	$\text{CH}$	-	-	-	-
8	2	58,6	54,1	54,1	55,3
9	3	67,5	70,6	70,6	71,4
10	4	71,5	65,9	65,9	67,5
11	6	128,5	126,7	126,7	128,3
12	7	124,3	123,7	123,6	124,2
13	2'	-	-	-	147,1
14	$\text{C}$	-	-	-	-
15	5	148,7	147,1	147,1	148,5
16	8	151,0	147,6	147,5	150,3
17	9	166,7	164,4	164,3	165,2
18	10	-	171,5	174,9	166,9

Comparando-se os dados de  $^{13}\text{C}$  apresentados na tabela, pode-se perceber a presença de outros sinais quando comparados ao espectro do cloranfenicol, que caracterizam os compostos obtidos. Para o composto 43 (acetilado), percebe-se a existência dos sinais em  $\delta 20,8$  ppm e  $\delta 171,5$  ppm correspondentes à metila e à carbonila do éster respectivamente.

Para o éster 44 (propanoato de cloranfenicol), são evidentes os sinais em  $\delta 174,9$ , para a carbonila do éster, em  $\delta 62,4$  para o carbono metilênico ligado à carbonila e em  $\delta 8,9$  para o carbono metílico. Para o composto 48 (crotonato de cloranfenicol), ressalta-se a presença dos seguintes sinais:  $\delta 166,9$  para a carbonila do éster, em  $\delta 18,2$  para  $\text{CH}_2$  ligado à carbonila, em  $\delta 147,1$  para  $\text{CH}$  de olefina e  $\delta 122,8$  de  $\text{CH}_2$  terminal de olefina.

A figura 114 apresenta as estruturas dos derivados decanoato, laurato, palmitato e benzoato de cloranfenicol e a tabela 45, os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  destes compostos comparados com o padrão cloranfenicol.

FIGURA 114 – Estruturas dos compostos decanoato (41), laurato (45), palmitato (47) e benzoato (46) de cloranfenicol

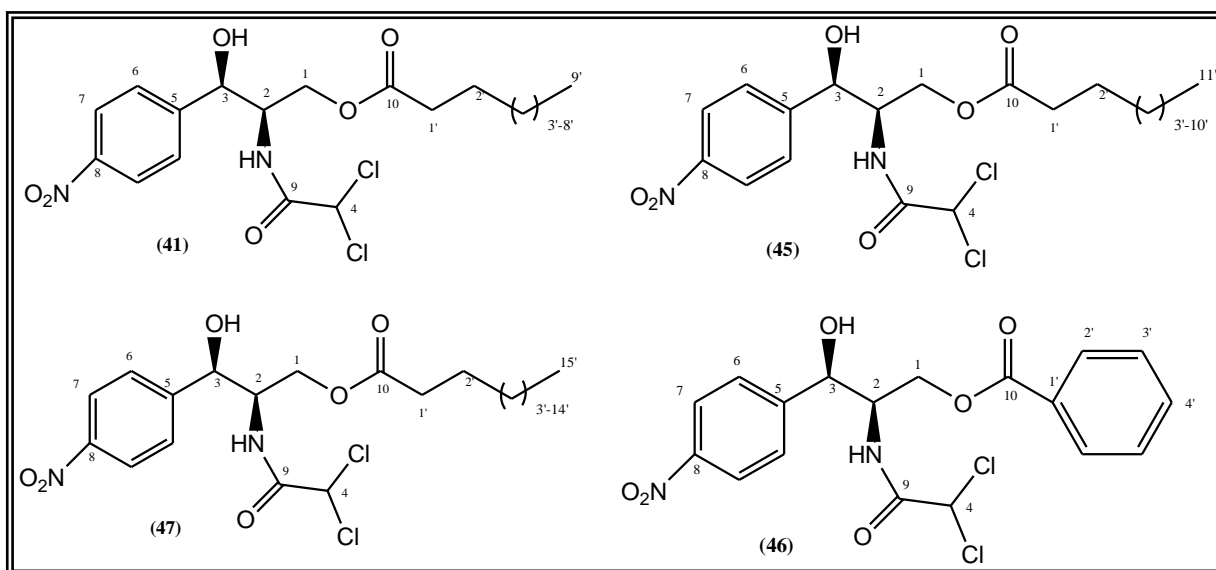


TABELA 45 – Dados de  $^{13}\text{C}$  compostos decanoato (41), laurato (45), palmitato (47) e benzoato (46) de cloranfenicol

<b>Entrada</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	$\delta_{\text{C}}$ (40)	$\delta_{\text{C}}$ (41)	$\delta_{\text{C}}$ (45)	$\delta_{\text{C}}$ (47)	$\delta_{\text{C}}$ (46)
1	9'	-	14,0	-	-	-
2	11'	-	-	14,0	-	-
3	15'	-	-	-	14,1	-
4	<b>CH<sub>2</sub></b>					
5	1	62,4	62,3	62,3	62,3	64,9
6	1'	-	34,0	34,0	34,1	-
7	2'	-	24,7	24,7	29,1	-
8	3'-8'	-	22,5 – 31,7	-	-	-
9	3'-10'	-	-	22,6 – 31,8	-	-
10	3'-14'	-	-	-	22,6 – 31,9	-
11	<b>CH</b>					
12	2	58,6	54,1	54,1	54,1	55,3
13	3	67,5	65,9	70,6	70,6	71,5
14	4	71,5	70,5	65,9	65,9	67,4
15	6	128,5	126,7	126,7	126,7	129,4
16	7	124,3	123,6	123,6	123,6	123,9
17	2'	-	-	-	-	130,4
18	3'	-	-	-	-	128,3
19	4'	-	-	-	-	134,1
20	<b>C</b>					
21	5	148,7	147,1	147,1	147,1	148,3
22	8	151,0	147,5	147,5	147,6	150,6
23	9	166,7	164,3	164,3	164,4	164,8
24	10	-	174,4	174,3	174,4	166,5
25	1'	-	-	-	-	130,4

A comparação entre os dados de  $^{13}\text{C}$  de cloranfenicol com os dados dos derivados ésteres de cadeia mais longa, permite afirmar que esses foram realmente obtidos. Iniciando a comparação dos dados de decanoato de cloranfenicol (41) percebe-se a presença dos sinais em:  $\delta$  174,4 da carbonila de éster,  $\delta$  34,0 de  $\text{CH}_2$  ligado à carbonila,  $\delta$  22,5-31,7, conjunto de sinais para  $\text{CH}_2$  da cadeia alifática para os carbonos 3' - 8' e  $\delta$  14,0 de  $\text{CH}_3$ .

Para o composto 45 (laurato de vinila) destaca-se o aparecimento dos seguintes sinais em:  $\delta$  174,3 da carbonila de éster,  $\delta$  34,0 para o carbono metilênico ligado à carbonila,  $\delta$  22,6 – 31,8, para o conjunto de sinais correspondentes à  $\text{CH}_2$  de cadeia alifática e ainda um sinal em  $\delta$  14,0 para carbono metílico. No caso do derivado 47 (palmitato de cloranfenicol) merecem destaque os sinais em  $\delta$  174,4 da carbonila de éster,  $\delta$  34,1 de  $\text{CH}_2$  ligado à carbonila,  $\delta$  22,6 – 31,9 para os carbonos metilênicos da cadeia alifática 3' - 14' e um sinal em  $\delta$  14,1 para um carbono metílico.

Os sinais que não estão descritos dos carbonos dos derivados, apresentaram deslocamento químico semelhante aos sinais de cloranfenicol, quando comparados com este. Os espectros de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  desses compostos encontram-se nos anexos.

#### 4.12 – Separação dos compostos através de CLAE

Todos os compostos obtidos por via química ou enzimática foram separados em CLAE em condições apropriadas para análises posteriores das reações enzimáticas. As condições empregadas na separação estão descritas no item 5.12, tabela 61. As figuras 115-32 apresentam os cromatogramas de separação dos compostos.

FIGURA 115 – Cromatograma de separação dos compostos cloranfenicol, acetato, di-acetato de cloranfenicol

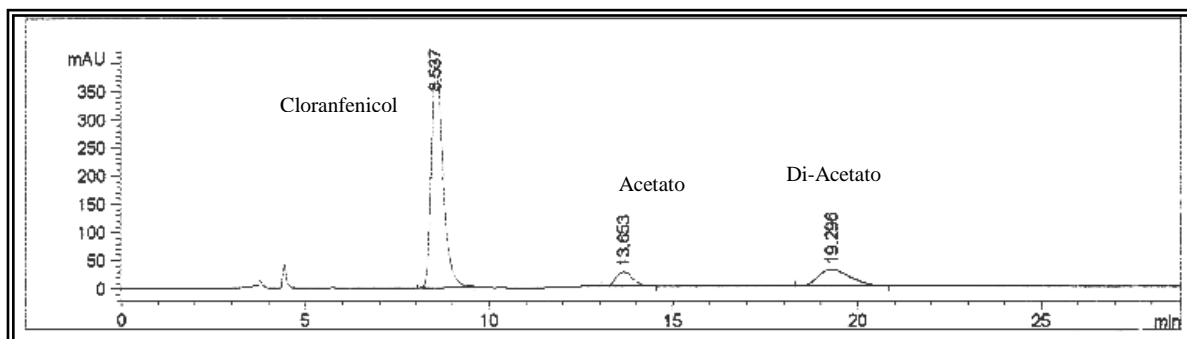


FIGURA 116 – Cromatograma de separação dos compostos cloranfenicol, propanoato e di-propanoato de cloranfenicol

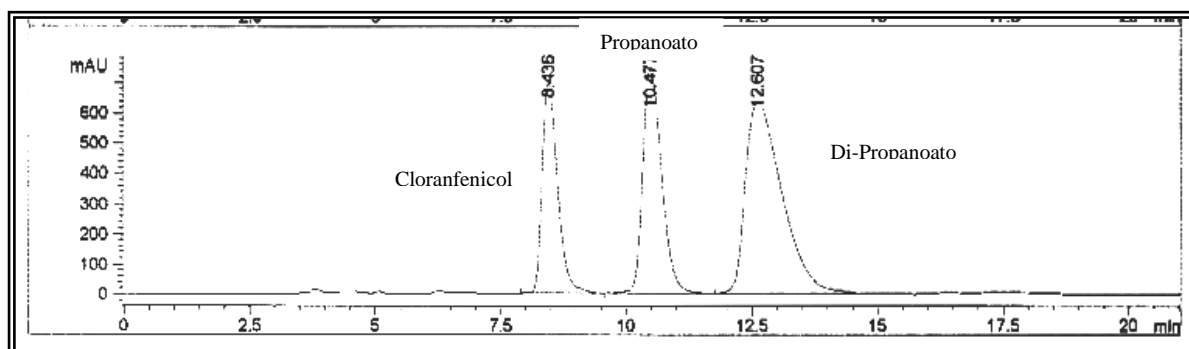


FIGURA 117 – Cromatograma de separação dos compostos cloranfenicol, crotonato e di-crotonato de cloranfenicol

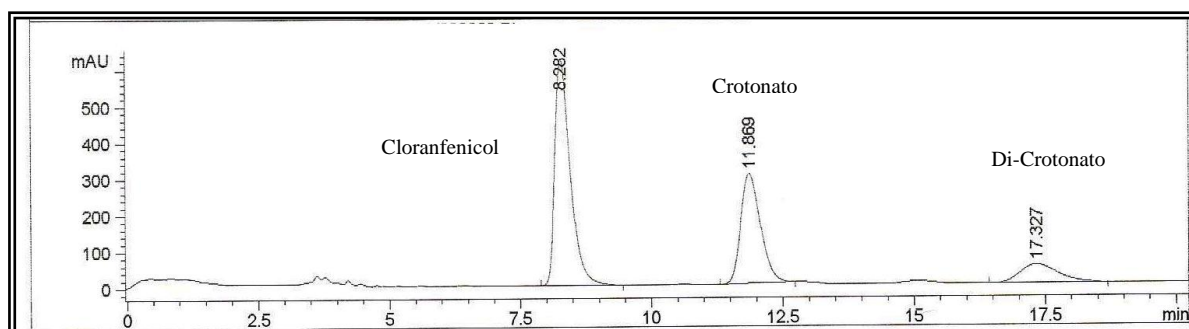


FIGURA 118 – Cromatograma de separação dos compostos di-laurato, laurato de cloranfenicol e cloranfenicol

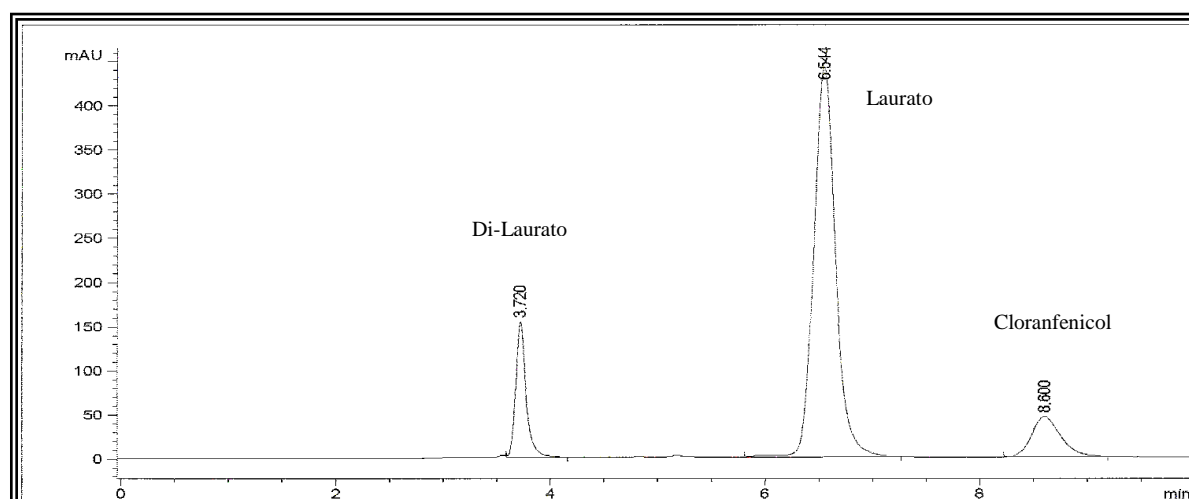


FIGURA 119 – Cromatograma de separação dos compostos cloranfenicol, benzoato e di-benzoato de cloranfenicol

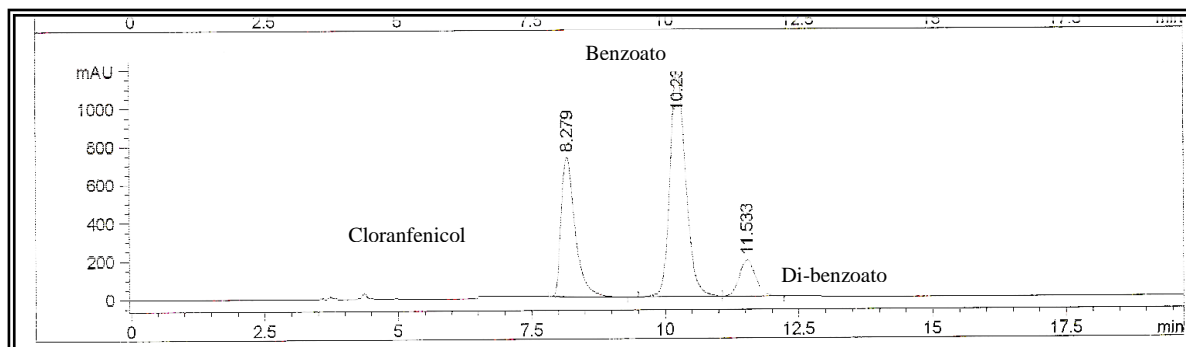


FIGURA 120 – Cromatograma de separação dos compostos di-decanoato, decanoato de cloranfenicol e cloranfenicol

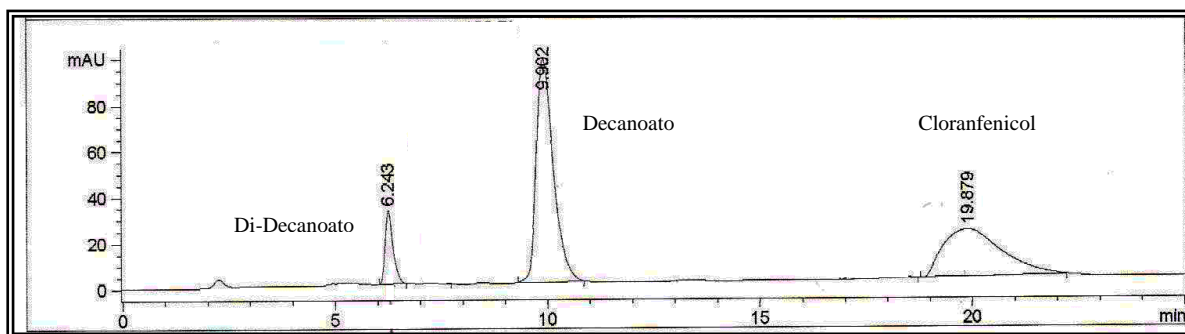
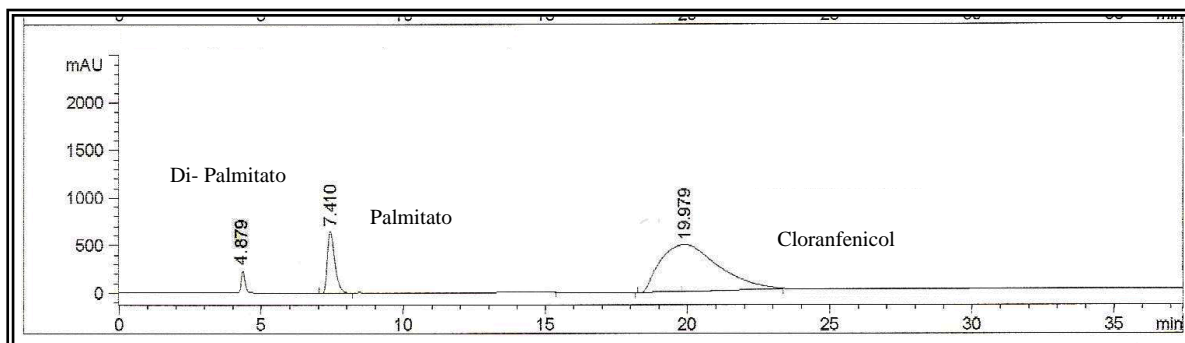


FIGURA 121 – Cromatograma de separação dos compostos di-palmitato, palmitato de cloranfenicol e cloranfenicol



### 4.13 Curvas de calibração

Depois de obtidos os produtos, estes foram utilizados para o preparo de soluções padrões a fim de análise em CLAE para a obtenção de curvas de calibração. A realização de curvas de calibração se faz necessária para a análise correta das reações e obtenção adequada com grau de confiabilidade dos respectivos valores de conversão. Isto porque a técnica de CLAE é uma técnica de análise cromatográfica que pode ser qualitativa e quantitativa, se houver disponível os padrões das amostras as quais se deseja analisar. As curvas de calibração consistem de gráficos onde são plotados dados de concentração das amostras padrão analisadas versus a sua respectiva absorbância obtida em CLAE em comprimento de onda adequado. Após gerar-se o gráfico é obtida uma reta que fornece uma equação, através da qual é possível obter com precisão os valores de conversão obtidos para as outras reações. Todas as curvas de calibração foram obtidas através do programa Origin® e encontram-se nas figuras 122- 131 com seus respectivos valores de R e equações da reta.

FIGURA 122 – Curva de calibração de cloranfenicol

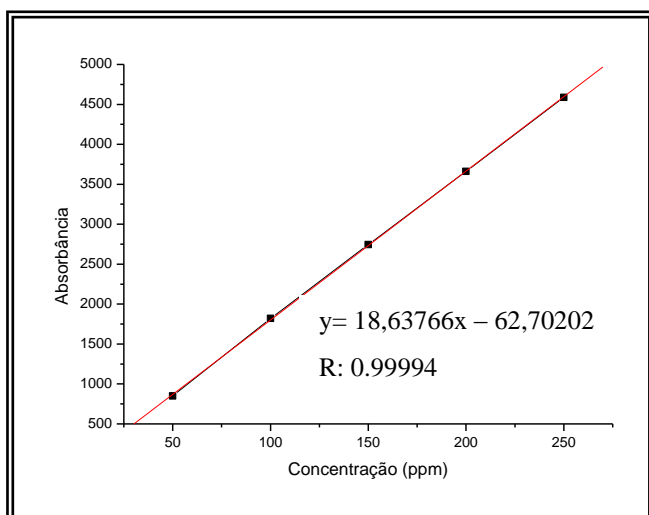


FIGURA 123 – Curva de calibração de decanoato de cloranfenicol

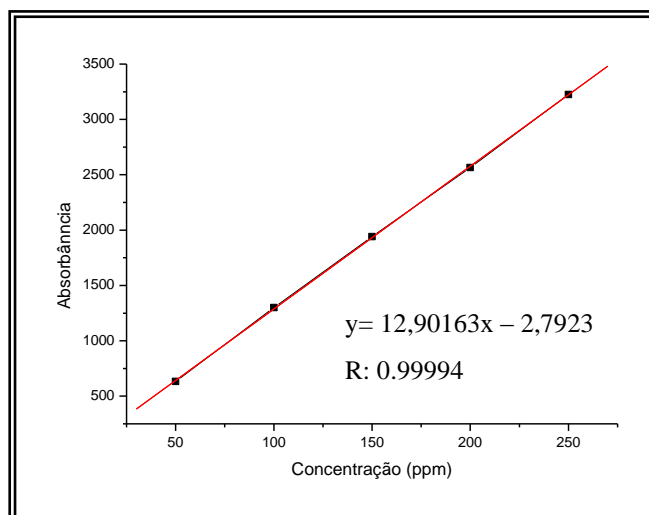


FIGURA 124 – Curva de calibração de di-decanoato de cloranfenicol

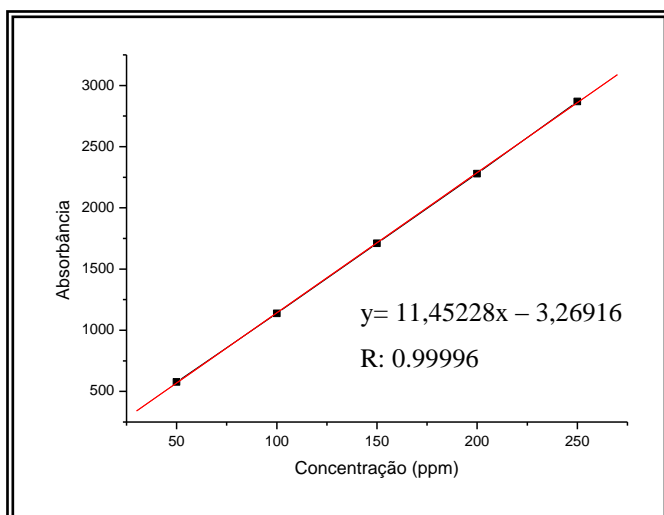


FIGURA 125 – Curva de calibração de Acetato de cloranfenicol

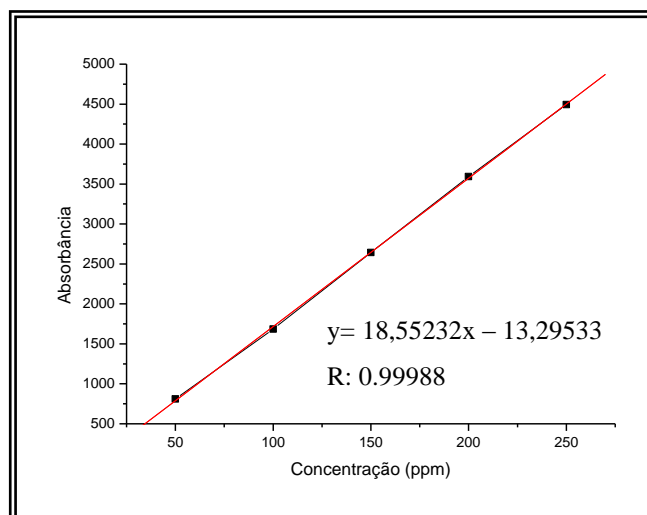


FIGURA 126 – Curva de calibração de Propanoato de cloranfenicol

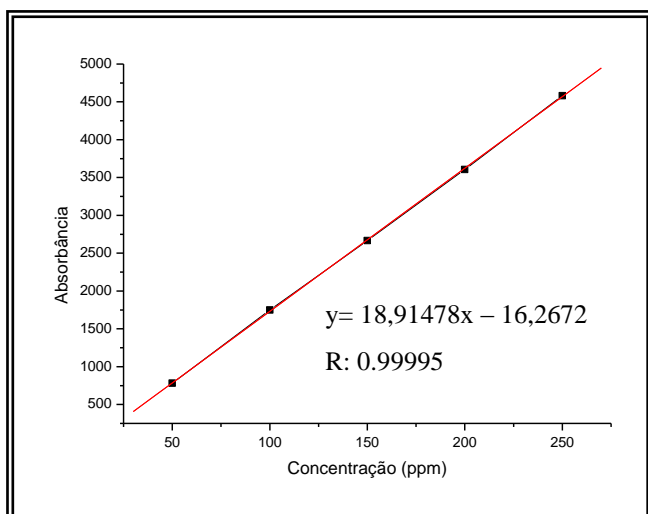


FIGURA 127 – Curva de calibração de Di-Propanoato de cloranfenicol

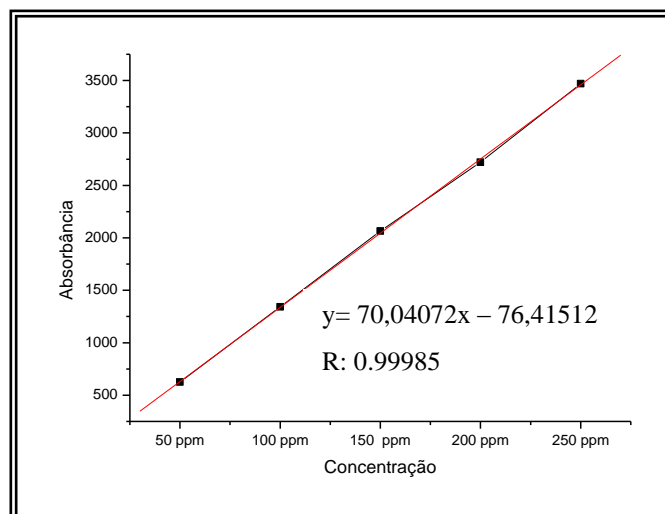




FIGURA 128 – Curva de calibração de Crotonato de cloranfenicol

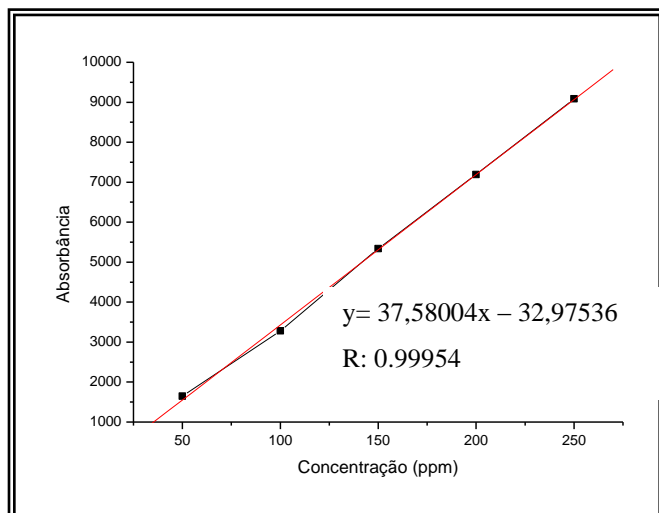


FIGURA 129 – Curva de calibração de Laurato de cloranfenicol

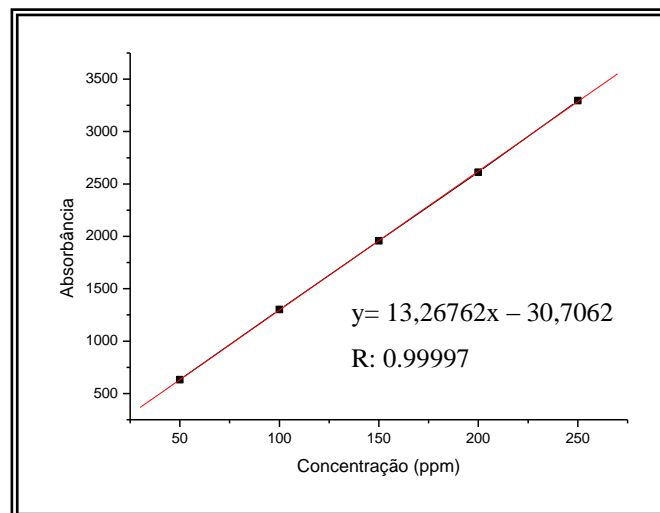


FIGURA 130 – Curva de calibração de Palmitato de cloranfenicol

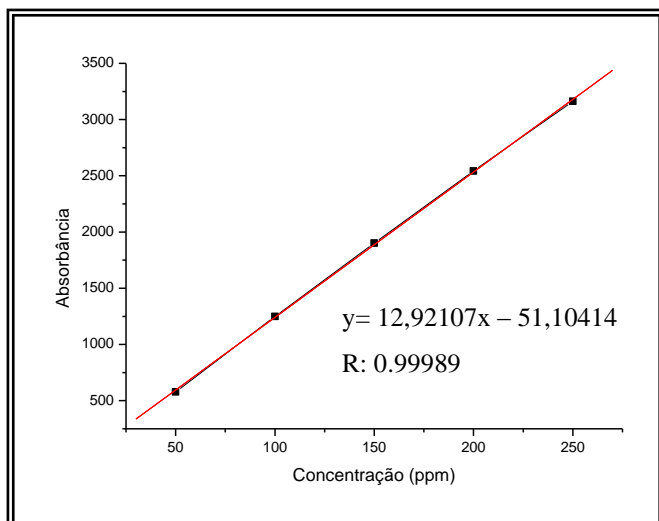
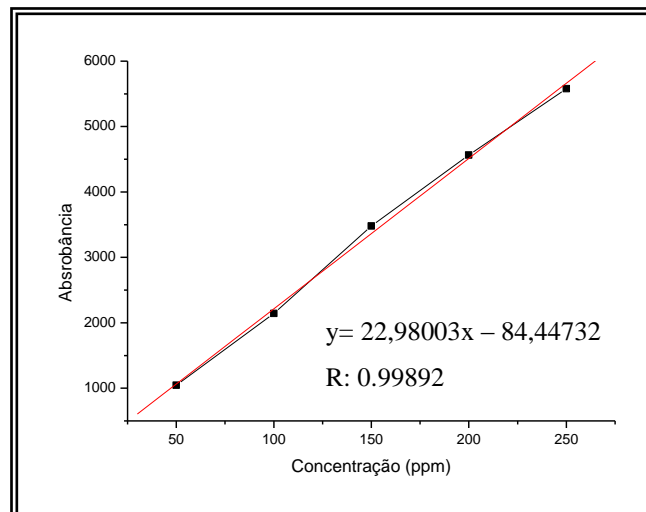


FIGURA 131 – Curva de calibração de Benzoato de cloranfenicol



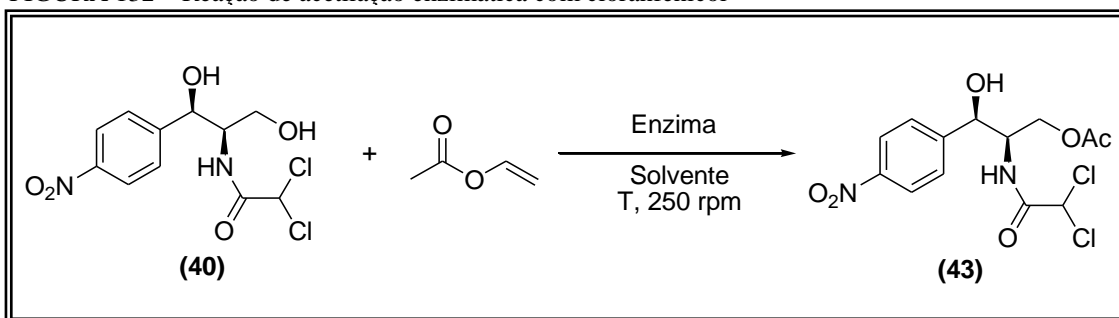
#### 4.14 Reações de acilação com diferentes doadores acila

Após comprovação da atividade enzimática frente a reações de acilação de cloranfenicol, depois de obtidos seus derivados via química e obtenção das respectivas curvas de calibração, estendeu-se as reações de acilação com outros doadores acila. Foram utilizados os seguintes ésteres vinílicos: acetato, propanoato, crotonato, laurato, palmitato e benzoato de vinila. O procedimento adotado na metodologia enzimática de obtenção destes derivados encontra-se descrito no item 5.14.

##### 4.14.1 Obtenção enzimática do acetato de cloranfenicol

O composto acetato de cloranfenicol (43) foi obtido por metodologia enzimática conforme mostra a figura 132 e já descrito no procedimento experimental.

FIGURA 132 – Reação de acetilação enzimática com cloranfenicol



A tabela 46 apresenta os resultados obtidos em função do tempo reacional e das enzimas utilizadas.

TABELA 46 – Resultados da acetilação enzimática com cloranfenicol

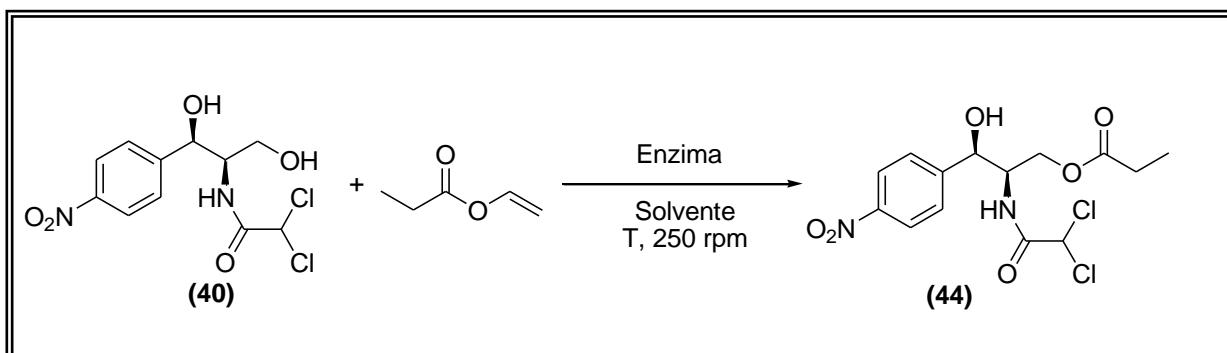
Entrada	Enzima	Solvente	T (°C)	t (h)	43 (%)
1	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	24	73,9
2				40	>99
3	PSL-C (I)	Dioxano	30	24	16,8
4				40	30,7
5	PSL-C (Amano)	Dioxano	30	24	86,5
6				40	97,0

De acordo com os dados apresentados na tabela 46, as reações de acilação enzimática com acetato de vinila apresentaram bons resultados. Os tempos de reação foram inferiores que aqueles obtidos no screening inicial, neste caso de 40 horas. A reação que utilizou a enzima CAL-B como biocatalisador foi aquela que apresentou a melhor conversão, em 40h de reação foi produzido apenas o composto mono-acilado com conversão total. Para PSL-C Amano, a conversão foi quase que total, chegando a formação de 97% do acetato de cloranfenicol. Entretanto, surpreendente foi o resultado observado para PSLC (I), onde o valor de conversão não foi superior 31%. Com base nesses dados, pode-se afirmar que as enzimas CAL-B e PSL-C (I) são as mais indicadas na produção de composto mono-acetilado (43).

#### 4.14.2 – Obtenção enzimática do propanoato de cloranfenicol

O composto propanoato de cloranfenicol (44) foi obtido por metodologia enzimática conforme mostra a figura 133 e já descrito no procedimento experimental.

FIGURA 133 – Reação de acilação enzimática com propanoato de vinilo



A tabela 47 apresenta os resultados obtidos em função do tempo reacional e das enzimas utilizadas.

TABELA 47 – Resultados da propanoilação enzimática com cloranfenicol

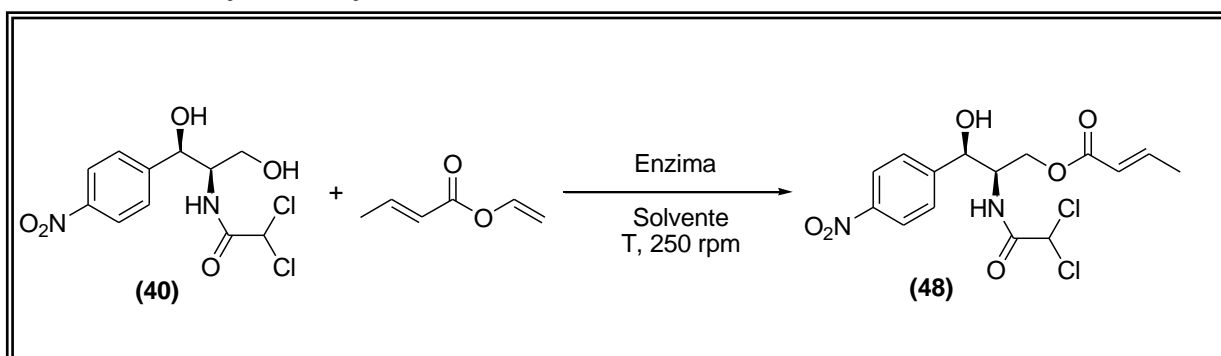
Entrada	Enzima	Solvente	T (°C)	t (h)	44 (c%)
1	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	24	>99
2	PSL-C(I)	Dioxano	30	24	91,3
3				30	94,9
4				48	>99
5	PSL-C(Amano)	Dioxano	30	24	98,7
6				30	>99

Os resultados apresentados na tabela 47 não são semelhantes aqueles obtidos em reações com acetato de vinilo. Em todos os casos, as enzimas mostraram-se mais reativas com o éster propanoato de vinilo. Valores de conversão total foram conseguidos em menor tempo, no caso do uso da enzima CAL-B com 24h de reação. Já com a enzima PSL-C(I), este resultado foi conseguido com o dobro do tempo que o usado por CAL-B e no caso de PSL-C (Amano) conversão total foi obtida com 30h reacionais. De acordo com estes valores, pode-se afirmar que todas as enzimas utilizadas são bastante reativas com este reagente, especialmente CAL-B. Sendo novamente esta, a enzima mais indicada para obtenção deste produto. Em nenhum dos casos foi observada a formação do produto di-acilado.

#### 4.14.3 Obtenção enzimática do crotonato de cloranfenicol

O composto crotonato (48) de cloranfenicol foi obtido por metodologia enzimática conforme mostra a figura 134 e já descrito no procedimento experimental.

FIGURA 134 – Reação de acilação enzimática com crotonato de vinilo



A tabela 48 apresenta os resultados obtidos para as reações de acilação enzimática com crotonato de vinilo em função do tempo reacional e das enzimas utilizadas.

TABELA 48 – Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com crotonato de vinilo

<b>Entrada</b>	<b>Enzima</b>	<b>Solvente</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (h)</b>	<b>48 (%)</b>
1	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	24	34,6
2				48	60,9
3	PSL-C(I)	Dioxano	30	24	-
4				48	-
5	PSL-C(Amano)	Dioxano	30	24	-
6				48	-

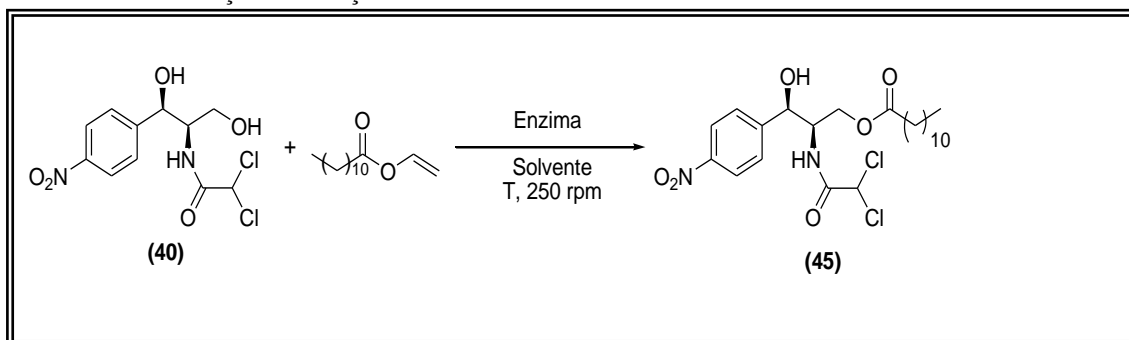
As reações com crotonato de vinilo e cloranfenicol apresentaram resultados bastante diferentes dos obtidos até então. Neste caso, a única enzima que exibiu atividade frente a este tipo de reação foi CAL-B, que com um tempo de 48 horas reacionais, apresentou um valor de conversão moderado (de aproximadamente 61%) para formação do composto crotonato de cloranfenicol. As outras duas enzimas utilizadas não mostraram em nenhum momento a formação do derivado nas temperaturas testadas. Percebe-se que a influência de uma insaturação afeta drasticamente a atividade destas enzimas. Pois se houver uma comparação entre as estruturas dos derivados vinílicos usados até então, nota-se que todos possuem cadeias pequenas, de 2, 3 e 4 carbonos, diferindo apenas pela existência de uma insaturação nesta última.

Sugere-se que a presença desta afeta de alguma maneira o sítio ativo da enzima, impossibilitando o seu acesso ao substrato, dificultando, portanto a catálise da reação. Comparando o valor de conversão obtido com CAL-B e a reação química de obtenção do derivado, pode-se perceber que esta é uma reação de difícil ocorrência, visto que na reação química foram obtidos dois produtos, mas, em pequenas quantidades. No caso da reação enzimática, embora o valor de conversão tenha sido moderado, pode-se ressaltar a vantagem do uso da enzima pela obtenção de apenas um produto reacional: o derivado mono-acilado, valorizando assim sua propriedade de regiosseletividade.

#### 4.14.4 Obtenção enzimática do laurato de cloranfenicol

O composto laurato (45) de cloranfenicol foi obtido por metodologia enzimática conforme mostra a figura 135 e já descrito no procedimento experimental.

FIGURA 135 – Reação de acilação enzimática com laurato de vinilo



A tabela 49 apresenta os resultados obtidos para as reações de acilação enzimática com laurato de vinilo em função do tempo reacional e das enzimas utilizadas.

TABELA 49 – Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com laurato de vinilo

Entrada	Enzima	Solvente	T (°C)	t (h)	45 (%)
1	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	24	>99
2	PSL-C (I)	Dioxano	30	24	90,6
3				48	91,0
4	PSL-C (Amano)	Dioxano	30	24	64,3
5				48	66,8

De acordo com estes resultados a boa atividade enzimática foi confirmada em relação a este tipo de reação e com outro doador acila. Neste caso e corroborando com dados anteriores, o melhor resultado foi obtido quando utilizou-se a enzima CAL-B, que obteve uma conversão total em 24h de reação. Esse comportamento é semelhante ao das reações com propanoato e acetato de vinilo, onde foram alcançadas conversões totais com 24 e 40 horas respectivamente. A enzima PSL-C(I), se mostrou menos eficaz porque sua reação ocorreu de maneira mais lenta, levando o dobro do tempo daquele usado pela enzima CAL-B para alcançar uma conversão quase total. Nota-se que não há diferença significativa de sua

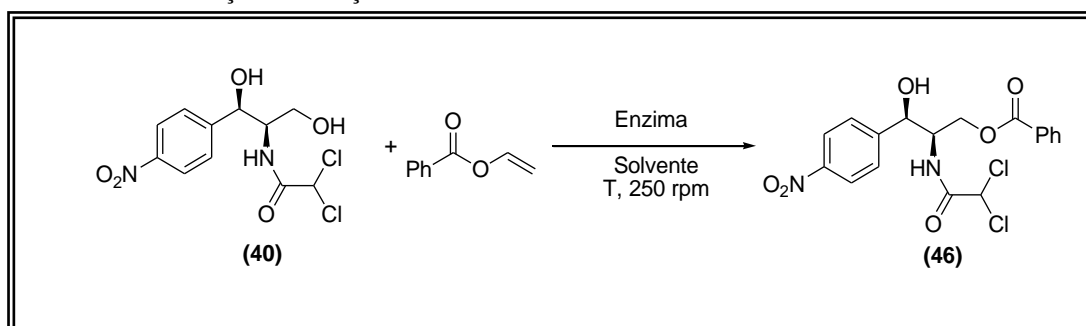
atividade, em tempos de 24 e 48h, que apresentaram conversões semelhantes (entradas 2 e 3). Sugere-se nesse caso, que a enzima atingiu o seu estágio de atividade máxima não possibilitando a formação de mais quantidade de produto.

A reação biocatalisada com PSL-C (Amano), o resultado obtido foi considerado moderado, pois no tempo de 48h, foi alcançada uma conversão para o produto de aproximadamente 67%, valor bem inferior ao apresentado pelas outras enzimas. Esses resultados obtidos corroboram com outros já descritos anteriormente com uso de outros tipos de agentes acilantes. Assim como nas reações anteriores, também nesta, em nenhum procedimento reacional foram obtidos os produtos di-acilados.

#### 4.14.5 Obtenção enzimática do benzoato de cloranfenicol

O composto benzoato (46) de cloranfenicol foi obtido por metodologia enzimática conforme mostra a figura 136 e já descrito no procedimento experimental.

FIGURA 136 – Reação de acilação enzimática com benzoato de vinilo



Para as reações de acilação enzimática a fim de obter o composto benzoato de cloranfenicol (46), foram adotados procedimentos como já descritos anteriormente. Em virtude dos resultados apresentados com as reações preliminares não terem sido satisfatórios, foram adotadas outras condições reacionais para obtenção desse composto. Há princípio foram realizadas reações com benzoato de vinilo nas mesmas condições usadas anteriormente. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 50.

TABELA 50 – Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com benzoato de vinilo

<b>Entrada</b>	<b>Enzima</b>	<b>Solvente</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (h)</b>	<b>46 (%)</b>
1	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	24	3,0
2				48	4,1
3	PSL-C (I)	Dioxano	30	24	5,1
4				48	7,6
5	PSL-C (Amano)	Dioxano	30	24	7,7
6				48	14,0

Pode-se perceber pelos dados apresentados na tabela, que os valores de conversão obtidos não foram tão satisfatórios como os valores obtidos anteriormente. Nota-se uma pequena atividade de todas as enzimas utilizadas nessas condições. Diferentemente de outros resultados, neste caso, aquela que apresentou o melhor valor de conversão se comparada às demais, foi a enzima PSL-C Amano, e ainda assim, com baixos valores de conversão. As outras duas enzimas utilizadas apresentaram baixíssima atividade, comportamento oposto ao descrito em outras reações com outros agentes acilantes.

Percebe-se a influência do doador vinila na atividade enzimática, neste caso a presença do grupamento aromático que afeta de maneira bastante significativa, principalmente com a enzima CAL-B, a qual exibiu a menor conversão. Pode-se sugerir como justificativa para este comportamento, a presença das duplas ligações no anel aromático, que como no caso das reações com crotonato de vinilo, afetou a atividade da enzima, reduzindo-a. A disposição dos átomos do anel aromático, bem como o tamanho deste grupo, também podem afetar a atividade enzimática, pois a molécula pode não adaptar-se facilmente ao sítio da enzima, dificultando a catálise da reação.

Em procedimento posterior modificou-se a temperatura da reação, tendo como objetivo a melhoria das conversões. Foram adotadas temperaturas de 40°C e 60°C e os resultados obtidos encontram-se na tabela 51.



TABELA 51 – Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com benzoato de vinilo à 40° e 60°

<b>Entrada</b>	<b>Enzima</b>	<b>Solvente</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (h)</b>	<b>20 (%)</b>
1	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	40	24	-
2				48	3,2
3	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	60	24	-
4				48	-
5	PSL-C (I)	Dioxano	40	24	10,4
6				48	16,9
7	PSL-C (Amano)	Dioxano	40	24	9,7
8				48	17,4

Como já observado anteriormente em outras reações, o aumento da temperatura utilizando a enzima CAL-B, causa perda de sua atividade, o que novamente é comprovado quando a temperatura é modificada para 60°C (entradas 3 e 4). Neste último caso, há total perda de atividade, pois não se observa em nenhum momento a presença do derivado desejado. No caso, da mudança de temperatura para as enzimas PSL-C(I) e Amano, houve uma melhora no resultado das conversões. Para a primeira, houve mudança significativa atingindo um valor superior ao dobro daquele obtido quando a temperatura foi 30°C (tabela 50, entrada 6), mesmo com a mudança esses valores ainda são considerados baixos. Para a enzima do tipo Amano, o valor de conversão permaneceu praticamente o mesmo, não sendo observada nenhuma mudança em sua atividade. Percebe-se que, mesmo com o aumento da temperatura as enzimas mostram-se inadequadas para esse tipo de reação.

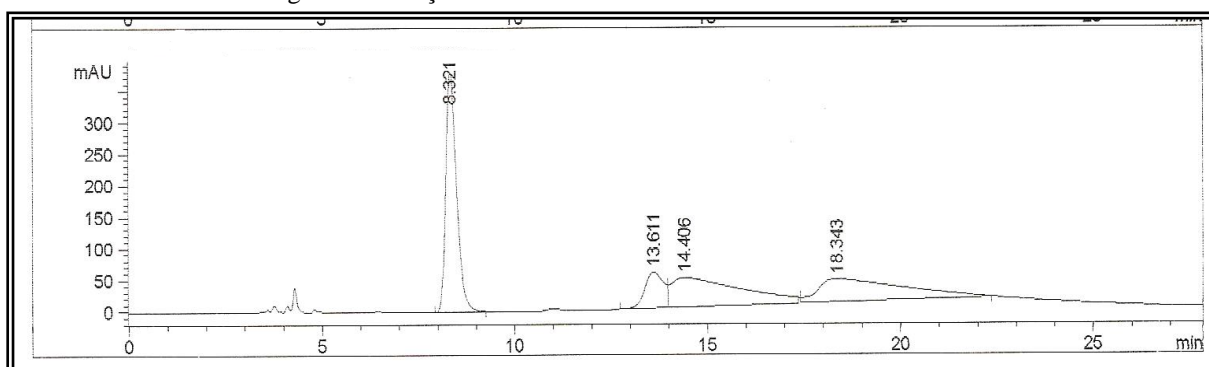
Diante desses resultados e da não obtenção de melhores valores de conversão, realizou-se outra variação nas condições reacionais. Desta vez, foi modificado o doador acila, ao invés de ser utilizado o benzoato de vinilo. Usou-se anidrido benzóico e o próprio benzoato de vinilo como solvente da reação, a temperatura da reação foi de 20°C para aquela que utilizou anidrido benzóico, sendo realizado neste caso também um branco, devido a alta reatividade deste reagente acilante. No caso da reação que usou o benzoato de vinilo como solvente, foi usada a temperatura de 30°C, já estabelecida em procedimentos anteriores. Em ambos os casos, a enzima usada como biocatalisador foi CAL-B. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 52.

TABELA 52 – Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com benzoato de vinilo e anidrido benzóico

Entrada	Enzima	Solvente	T (°C)	t (h)	2θ (%)
1	CAL-B	Benzoato Vinilo	30	24	26,2
2	CAL-B	Anidrido Benzoíco	20	24	?
3				48	?
4	Branco	“	20	48	0

Como apresentado na tabela 52, houve significativa mudança de atividade para a reação que utilizou a enzima CAL-B e o próprio agente acilante como solvente. O valor máximo de conversão obtido foi de 26%, um valor bem superior se comparado aos outros obtidos anteriormente. No caso da reação com anidrido, usou-se uma temperatura de reação menor, no sentido de minimizar a reatividade do anidrido. Neste caso, não foi possível observar se a reação levou ao produto desejado por CLAE, pois no cromatograma o pico do anidrido apresentou-se muito largo atingindo a área da região do pico do produto, como observado na figura 137. Ou seja, no caso de formação do produto ocorreria uma sobreposição.

FIGURA 137 – Cromatograma da reação com anidrido acético



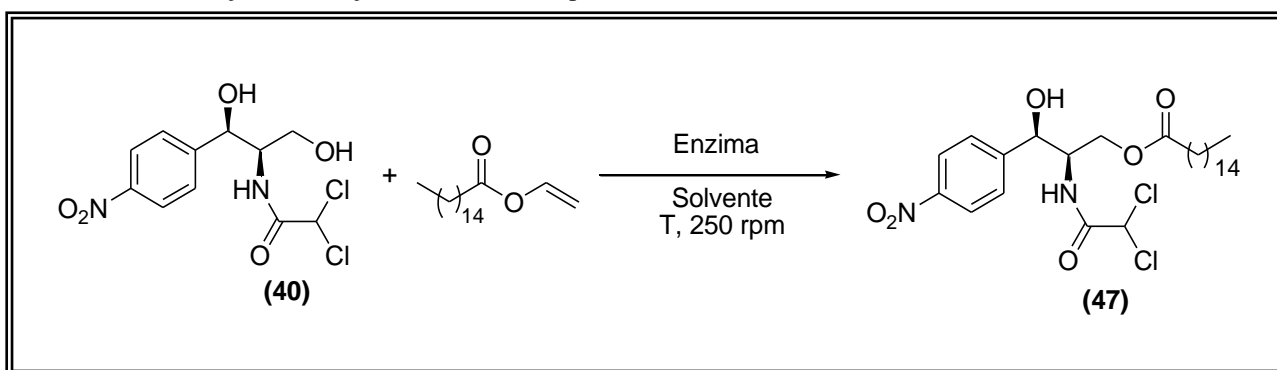
Muitas modificações no método de separação foram realizadas, entretanto, não conseguiu-se obter a separação dos compostos. Assim, pode-se concluir que nesse tipo de reação, mesmo diante das várias modificações no método reacional para obter-se melhores valores de conversão, as enzimas testadas bem como os agentes acilantes, mostram que a reação não foi bem sucedida em nenhum dos casos.

Comparando a reação enzimática com a reação química, observa-se grande dificuldade de obtenção do produto para ambas as vias. Pois, no caso da via enzimática, os valores de conversão atingidos são baixos, mas destaca-se a formação exclusiva do composto mono-acilado. Porém quando se usa a via química, obtém-se os dois produtos possíveis, em destaque o composto di-acilado que foi obtido em maior quantidade.

#### 4.14.6 Obtenção enzimática do palmitato de cloranfenicol

Finalmente foi obtido o derivado pró-fármaco de cloranfenicol, que é o composto comercial. Este foi obtido por via enzimática como já descrito anteriormente com outros compostos. A figura 138 apresenta o esquema de reação enzimática.

FIGURA 138 – Reação de acilação enzimática com palmitato de vinila



Os resultados obtidos com as acetilações enzimáticas com palmitato de vinila encontram-se na tabela 53.

TABELA 53 – Resultados da acilação enzimática de cloranfenicol com palmitato de vinilo

Entrada	Enzima	Solvente	T (°C)	t (h)	47 (%)
1	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	24	>99
2	PSL-C(I)	Dioxano	30	24	94,6
3				30	96,5
4	PSL-C(Amano)	Dioxano	30	24	4,6
5				48	5,7

Observa-se de acordo com os resultados da tabela que, a enzima que apresentou melhor desempenho foi CAL-B, atingindo uma conversão total com tempo de 24h (entrada 1), resultado semelhante ao apresentado em outras reações descritas anteriormente. Uma conversão quase que total, de 96,5% (entrada 3) foi alcançada quando foi usada a enzima PSL-C(I) como biocatalisador, com 30h de reação.

Resultado oposto foi obtido quando se usou PSL-C Amano, em que praticamente não observou-se nenhuma conversão (aproximadamente 6%) com 48h reacionais. Em nenhuma das reações observou-se a formação do composto di-acilado, destacando-se a regioseletividade das enzimas. No caso da obtenção do pró-fármaco palmitato de cloranfenicol (47) via metodologia enzimática, sugere-se o uso de CAL-B, visto que apresentou a melhor reatividade no menor tempo de reação.

De acordo com todos os resultados obtidos até então, pode-se afirmar que a enzima que apresentou melhor desempenho nas reações enzimáticas com cloranfenicol e agentes acilantes vinílicos foi CAL-B. Pois esta exibiu em muitos casos, conversões totais em tempos inferiores quando comparadas as demais, principalmente no uso de ésteres vinílicos alifáticos.

Os melhores tempos e conversões foram alcançados com o uso de propanoato, laurato e palmitato, com conversões totais em 24h, destacando-se também sua atividade com acetato e decanoato. Porém quando se usou agentes acilantes com insaturações, esta exibiu de moderada a baixa atividade. Sugere-se então que esta apresenta melhor comportamento quando se usa doadores acila de cadeias alifáticas saturadas.

Para o uso de PSL-C (I), observa-se uma boa atividade em vários casos, sendo as melhores, com índices de conversão superior a 90% para obtenção dos compostos propanoato, laurato e decanoato de cloranfenicol com tempos de 48h. Merece destaque a reação com palmitato de vinilo que alcançou valor de conversão superior a 90% com 30h de reação. Moderada atividade foi exibida com acetato de vinilo; pouca e nenhuma atividade com benzoato e crotonato de vinilo, respectivamente. Sugere-se nesse caso, uso de ésteres de cadeia alifática saturada como doador acila.

A enzima PSL-C Amano foi a que exibiu as atividades menos significativas quando comparadas às demais. Exibindo conversões superiores a 95% apenas quando se usou ésteres vinílicos de cadeia pequena, com dois e três carbonos. Apresentando redução do valor de conversão com o aumento do tamanho da cadeia, chegando a um percentual inferior a 6% quando se usou palmitato de vinilo como agente acilante. Também exibiu pequena ou

nenhuma atividade com ésteres aromático e insaturado, como as demais enzimas. Portanto, seu uso para reações desse tipo não é sugerido.

#### 4.15 Reações de acilação a uma maior concentração

Depois de obtidos os resultados com as reações de acilação de cloranfenicol e diferentes doadores acila biocatalisadas por diferentes enzimas, resolveu-se então aumentar a concentração do substrato com o objetivo de reduzir os tempos de reação e melhorar algumas conversões. Para isso foram utilizados os mesmos agentes acilantes e mesma metodologia, as quantidades de reagentes empregadas encontram-se descritas no item 5.16.

##### 4.15.1 Acilações com acetato e propanoato de vinilo

Inicialmente foram estudadas as reações com acetato e propanoato de vinilo, os resultados obtidos encontram-se na tabela 54.

TABELA 54 – Resultados das reações de acilação com acetato e propanoato de vinilo à maior concentração

Entrada	Éster	Enzima	Solvente	T (°C)	t (h)	c (%)	Rdto. (%)
1	Acetato	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	3	>99	89,9
2		PSL-C (I)	Dioxano	30	6	98,7	90,7
3		PSL-C (Amano)	Dioxano	30	9	97,6	79,1
4	Propanoato	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	3	>99	88,9
5		PSL-C (I)	Dioxano	30	6	97,7	89,8
6		PSL-C (Amano)	Dioxano	30	9	>99	82,7

A tabela 54 apresenta resultados bastante satisfatórios, pois além de serem alcançados altos valores de conversão para as reações, houve grande redução dos tempos reacionais. Mais uma vez e corroborando com resultados anteriores, a enzima que se mostrou mais eficiente foi CAL-B, pois levou a conversão total no menor tempo de reação, em apenas 3 horas, para as reações com acetato e propanoato de vinilo. Essas reações em menor concentração tiveram esses mesmos resultados com tempos de 40 e 24h respectivamente.

Para as reações biocatalisadas por PSL-C (I) houve também grande melhoria nos valores de conversão, chegando a resultados superiores a 95%, em 6h, tempo bem inferior de quando a reação é feita a menor concentração. Pois à menor concentração, a formação do composto acetilado não ultrapassou os 31% com 40h de reação, e do propanoato chegou à conversão total, mas com 48h reacionais. Este tempo foi o dobro do requerido por CAL-B, para obter índice semelhante de conversão.

No caso de PSL-C Amano, também houve redução significativa do tempo reacional com aumento da concentração. Foram alcançadas conversões totais ou quase totais com 9 horas reacionais. Resultados semelhantes foram obtidos com reações à menor concentração, entretanto estas tiveram tempos de reação de 40h para o acetato e de 30h para o propanoato. Esses valores corroboram com aqueles descritos anteriormente, onde se mostra uma melhor atividade da enzima CAL-B em relação às demais. Além disso, em todos os casos apresentados puderam-se obter melhores valores de conversão em menores tempos de reação, mostrando uma maior eficiência das enzimas em meios reacionais mais concentrados.

Destaca-se também que a concentração do meio nesses casos não influenciou a seletividade das enzimas, pois não foram detectados os produtos di-acilados. Todos os produtos obtidos foram submetidos a processo de purificação através de cromatografia em coluna, obtendo-se os seus respectivos rendimentos, que de acordo com os valores apresentados foram considerados bastante satisfatórios.

#### ***4.15.2 Acilações com crotonato e benzoato de vinilo***

A mesma idéia de mudança de concentração da reação de acilação foi aplicada quando se usou os agentes acilantes crotonato e benzoato de vinilo, visto que na obtenção de seus produtos em reações à menor concentração não foram alcançados bons resultados. As condições utilizadas foram as mesmas descritas anteriormente e os resultados estão apresentados na tabela 55.

TABELA 55 – Resultados das reações de acilação com crotonato e benzoato de vinilo à maior concentração

<b>Entrada</b>	<b>Éster</b>	<b>Enzima</b>	<b>Solvente</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (h)</b>	<b>c (%)</b>	<b>Rdto. (%)</b>
1	Crotonato	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	22	>99	73,2
2		PSL-C (I)	Dioxano	30	48	66,3	50,9
3		PSL-C (Amano)	Dioxano	30	48	-	-
4	Benzoato	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	48	30,7	81,1
5		PSL-C (I)	Dioxano	30	48	52,6	84,8
6		PSL-C (Amano)	Dioxano	30	48	13,0	63,7

Pelos resultados da tabela 55 percebe-se que, em ambos os casos a reatividade das enzimas utilizadas ainda é baixa em reações com estes agentes acilantes. Com a utilização de crotonato de vinilo, foi possível a obtenção do produto desejado com conversão total no tempo de 22h e a enzima CAL-B. O tempo reacional bem como a conversão tiveram melhora significativa se comparada com a reação que ocorreu à menor concentração. Este resultado confirma a idéia de que a enzima exibe melhor atividade em meios reacionais mais concentrados.

Nas reações com crotonato de vinila e as enzimas PSL-C (I) e Amano, os resultados obtidos não foram muito satisfatórios. Para a reação com PSL-C(I), em 48h de reação, obteve-se conversão moderada (66%), enquanto que PSL-C (Amano), não exibiu nenhuma atividade. Mostra-se que este agente acilante é bem menos adequado ao uso de enzimas, pois não se verifica boa atividade destas para produção do composto desejado.

Com relação as reações com benzoato de vinilo, houve uma pequena melhora nos valores de conversão. Neste caso, as reações utilizaram apenas o benzoato de vinilo, não foram realizadas mudanças de agente acilante ou de temperatura como aquelas ocorridas nas reações em menor concentração. Os resultados aqui obtidos apresentaram relativa melhoria, pois foram alcançadas conversões mais significativas para o uso das enzimas CAL-B e PSL-C (I), que haviam apresentado as menores atividades.

Pode-se afirmar que a mudança de concentração nesses casos, afetou a atividade destas enzimas levando a obtenção de melhores resultados. Isto se aplica especialmente a enzima PLC-(I), pois através dela obteve-se uma conversão de 52%, o maior obtido. Esse resultado é oposto aos encontrados para as outras reações com outros agentes acilantes, pois nos outros casos, a enzima CAL-B foi a apresentou melhor atividade. Com base nisso pode-se

sugerir que não há interação eficiente entre esta enzima e este doador acila, pois mesmo a maiores concentrações são obtidos valores modestos de conversão.

Ainda quando se usou a enzima PSL-C Amano em maior concentração, esperava-se uma grande melhora em sua conversão, pois quando anteriormente usada, esta foi a que proporcionou o melhor resultado. Entretanto, não houve praticamente mudança em sua atividade, pois os valores de conversão foram bastante similares. Pode-se sugerir que no uso desta enzima com este agente acilante em diferentes concentrações, praticamente não há alteração da sua atividade enzimática. Pode-se sugerir que a enzima PSL-C do tipo I, é a mais indicada para reações com benzoato de vinilo e para a reação com crotonato, sugere-se o uso de CAL-B. Os rendimentos obtidos após isolamento cromatográfico foram considerados moderados ou bons.

#### 4.15.3 Acilações com decanoato, laurato e palmitato de vinilo

As reações com maior concentração também foram extendidas aos doadores vinílicos alifáticos de cadeia longa, com 10,12 e 16 carbonos, decanoato, laurato e palmitato de vinilo, respectivamente. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 56.

TABELA 56 – Resultados das reações de acilação com decanoato, laurato e palmitato de vinilo à maior concentração

<b>Entrada</b>	<b>Éster</b>	<b>Enzima</b>	<b>Solvente</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (h)</b>	<b>c (%)</b>	<b>Rdto. (%)</b>
1	Decanoato	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	3	>99	91,9
2		PSL-C (I)	Dioxano	30	4	>99	84,3
3		PSL-C (Amano)	Dioxano	30	22	>99	91,0
4	Laurato	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	4	>99	91,6
5		PSL-C (I)	Dioxano	30	7	>99	88,5
6		PSL-C (Amano)	Dioxano	30	10	98,1	88,4
7	Palmitato	CAL-B	CH <sub>3</sub> CN	20	3	>99	91,6
8		PSL-C (I)	Dioxano	30	3	>99	75,6
9		PSL-C (Amano)	Dioxano	30	48	79,2	78,3

Resultados muito satisfatórios foram obtidos no caso das acilações enzimáticas com agentes acilantes alifáticos de cadeia longa, todos eles superiores a 95%, exceto para o uso de PSL-C Amano com palmitato de vinilo. No uso de decanoato de vinilo para obter-se



decanoato de cloranfenicol, em maior concentração foram obtidas conversões totais com as três enzimas. Todas elas apresentaram boa reatividade, sendo a melhor, a CAL-B, com o menor tempo reacional, onde alcançou-se conversão total em apenas 3 horas de reação. Tempo semelhante foi obtido quando se utilizou PSL-C(I), o qual foi de 4h.

A enzima PSL-C Amano, também apresentou conversão total, porém com tempo reacional de 22h, um tempo superior aos encontrados até então. Valores altos de conversão também foram observados com essas enzimas e esses agentes acilantes com reações à menor concentração, entretanto com tempos reacionais maiores. Destaca-se assim as excelentes atividades destas enzimas em meio reacional mais concentrado, em especial CAL-B.

Aumentando a cadeia alifática do agente acilante para 12 carbonos, percebe-se uma mudança nos tempos de reação e nos valores de conversão. Para o uso de CAL-B e PSL-C(I), foram alcançadas conversões totais, entretanto estas se mostraram mais lentas quando utilizou-se decanoato de vinilo. Os tempos das reações foram de 4 e 7 horas respectivamente, ainda assim, bem inferiores aqueles das reações à menor concentração. Nesta situação foram obtidas conversões superiores a 90%, sendo total quando do uso de CAL-B, entretanto, ambas com tempos 48h.

Utilizando da enzima PSL-C Amano, com 10 horas reacionais alcançou-se uma conversão máxima de 98%, uma melhoria significativa da conversão e do tempo reacional com aumento da concentração. À menor concentração o valor máximo de conversão foi de 66% com 48h de reação. Destaca-se, portanto, que o aumento da concentração influenciou positivamente no tempo reacional bem como no valor de conversão.

Finalmente, para obtenção do pró-farmaco de cloranfenicol, utilizando o éster palmitato de vinilo, e uma maior concentração do substrato, pode-se dizer que foram alcançados resultados extremamente significativos. Quando usadas as enzimas CAL-B e PSL-C(I), os tempos reacionais, foram reduzidos para 3 horas alcançando-se uma conversão total do produto. Isso mostra a boa eficiência e atividade destas enzimas com este tipo de agente acilante e maior concentração do substrato. Quando essas enzimas foram usadas com menor concentração do meio, também houve conversão elevada, entretanto os tempos de reação foram de 24h e 30h para CAL-B e PSL-C(I) respectivamente.

Observou-se também grande melhoria na reação biocatalisada por PSL-C Amano, pois com um tempo de 48h em maior concentração obteve-se conversão próxima de 80%, valor superior aquele observado a reações em baixa concentração, a qual não atingiu 6% em 48h.

Pode-se sugerir no caso do uso de agentes acilantes de cadeia longa, o uso da enzima CAL-B para obtenção de altas conversões do produto desejado e em menor tempo reacional. Em todos os casos foram realizadas colunas cromatográficas para purificação dos produtos e estas apresentaram bons valores de rendimentos. Destaca-se também que a regioselectividade das enzimas foi mantida com o aumento da concentração, pois não foi observada a formação do produto di-acilado.

#### ***4.16 Reação com palmitato de vinila à 0,25M e acetato de vinila à 0,15M***

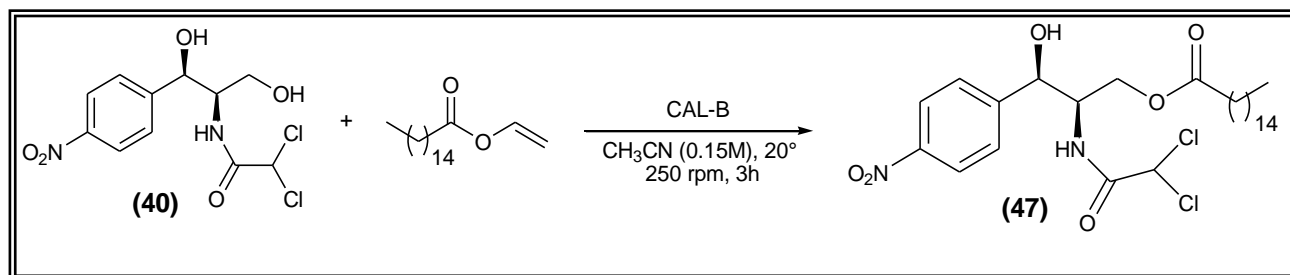
As reações com maior concentração de palmitato e acetato de vinilo, têm por objetivo verificar a reatividade e o comportamento da enzima CAL-B nessa situação. Com o uso de ambos agentes acilantes obteve-se valores elevados de conversão, sendo este quase total (>99%) no caso do uso de acetato de vinilo a 0,15M e de 97% quando utilizou-se palmitato de vinila à 0,25M. Estes resultados foram alcançados após 1 hora de reação. Portanto, ficou demonstrado através deste experimento, que esta enzima possui melhor atividade quando se encontra em meios reacionais mais concentrados, corroborando com resultados obtidos anteriormente com outros agentes acilantes.

Além disso, em nenhum momento foi detectada a presença de compostos di-acilados, mostrando que, a concentração do meio neste caso, não afeta a seletividade enzimática.

#### ***4.17 Reciclagem enzimática***

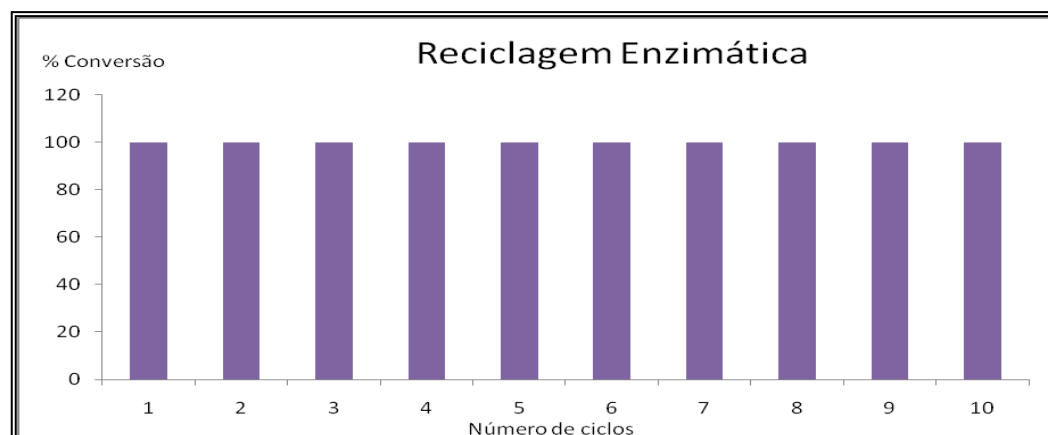
Com o objetivo de se investigar a continuidade da atividade enzimática, realizou-se então um estudo de reciclagem. A prática consistiu em realizar uma acilação com palmitato de vinilo, com concentração de cloranfenicol em 0,15M, no tempo já estabelecido, em procedimento anterior, que foi de 3 horas, conforme esquema reacional apresentado na figura 139. Em seguida estas enzimas foram lavadas com acetonitrila e sucessivamente submetidas a novas reações, sendo estas interrompidas em intervalos de 3 horas.

FIGURA 139 – Esquema reacional para reciclagem enzimática



Todas as alíquotas correspondentes a cada ciclo de reação, foram submetidas a análise por CLAE em condições apropriadas. Os resultados obtidos permitiram gerar o gráfico da figura 140.

FIGURA 140 – Gráfico dos resultados das reações de reciclagem enzimática



De acordo com o gráfico da figura 140 pode-se perceber que foram realizados ao todo 10 ciclos de reação, e em todos eles houve atividade máxima da enzima levando a conversão total do substrato. Baseado nesses resultados pode-se afirmar que o uso da enzima por diversos ciclos é completamente viável, visto que não há perda de sua atividade, podendo esta ser usada em vários ciclos reacionais levando à boas conversões.

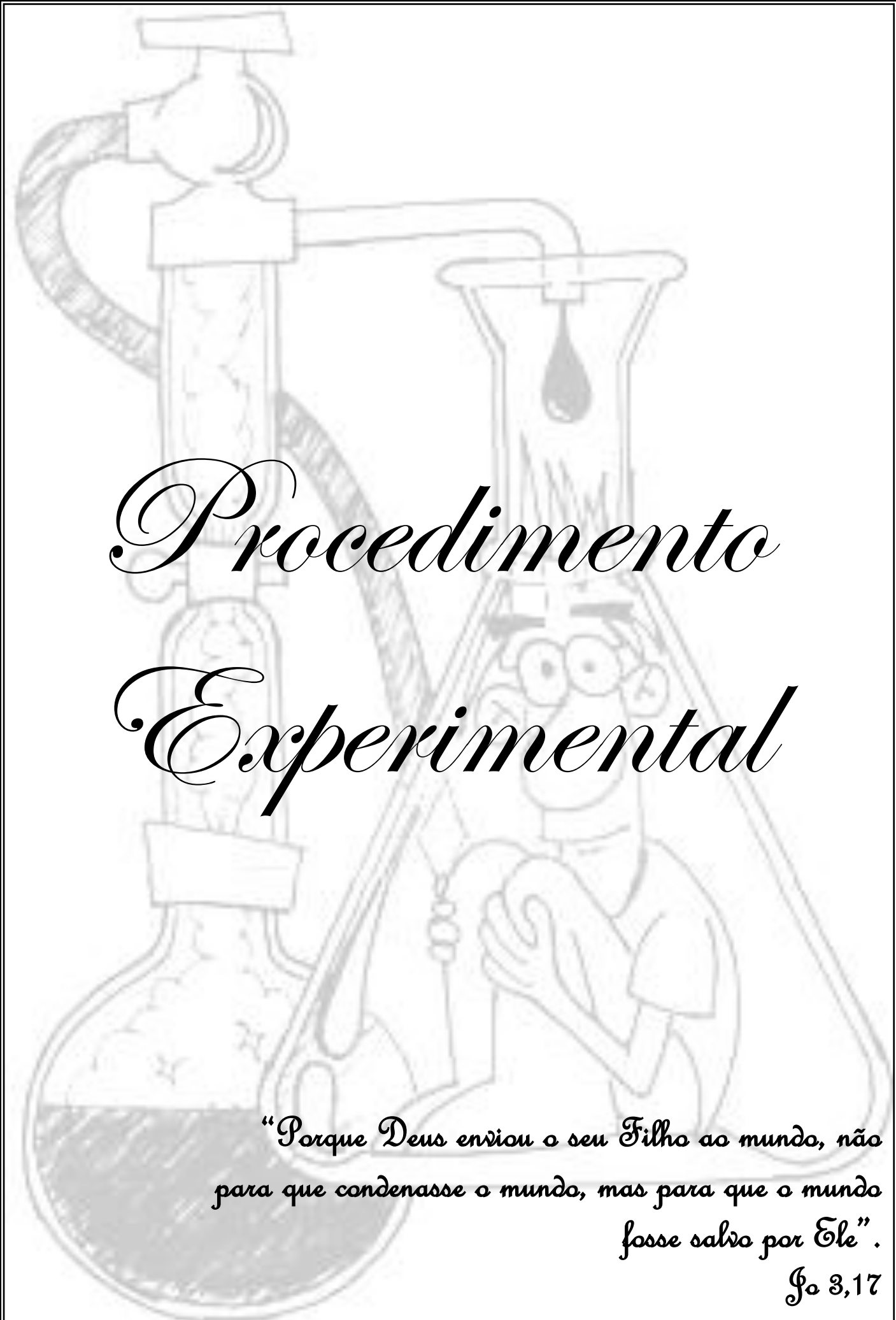
Esse experimento também mostra a estabilidade mecânica das enzimas suportadas, ou seja, imobilizadas, pois o suporte garante a atividade enzimática por diversas vezes sem alteração. O que representa também uma economia do ponto de vista industrial, pois, como essas enzimas têm um custo relativamente alto, a manutenção de sua atividade e

de maneira elevada, representa um bom investimento. No caso da obtenção do pró-fármaco, este foi o obtido em excelentes resultados.

#### ***4.18 Reações em grande escala***

Visando ainda obter condições de reações em escala industrial, foram realizadas reações utilizando maiores quantidades de cloranfenicol. O procedimento adotado encontra-se descrito no item 5.18. Nesse caso partiu-se de 1 grama de substrato (cloranfenicol), a mesma quantidade de biocatalisador e 5 equivalentes do respectivo agente acilante. Utilizou-se apenas a enzima CAL-B, pois esta foi a que apresentou os melhores resultados nas reações de acilação anteriores. Não foram utilizados todos os reagentes acilantes, mas somente aqueles que mostraram as melhores conversões. Portanto, foram obtidos em escala de bancada os seguintes derivados de cloranfenicol: acetato, propanoato, decanoato, laurato e palmitato.

Em todas as reações realizadas, foram observadas conversões totais, obtendo-se dessa maneira grandes quantidades dos produtos desejados. O tempo reacional em todos os casos foi de 3 horas, exceto para a reação com laurato de vinilo, a qual teve duração de 4 horas. Pode-se perceber que essas reações são possíveis de serem realizadas em maior escala, sugerindo sua adaptação para processos industriais. Embora utilizando a enzima CAL-B que possui um custo relativamente elevado, seu uso em escala industrial é aconselhável, pois há possibilidade de reciclo, o que torna o processo economicamente viável.



# *Procedimento Experimental*

*“Porque Deus enviou o seu Filho ao mundo, não  
para que condenasse o mundo, mas para que o mundo  
fosse salvo por Ele”.*

*Jo 3,17*

## 5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 5.1 Material Utilizado

Todos os substratos utilizados na reações de biocatálise e reações químicas, foram obtidos comercialmente, sendo estes de procedência variada: MERCK, SIGMA, FLUKA ou Alfa Aesar.

O reagente de Folin-Ciocalteu é 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 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e alginato de sódio são todos de qualidade P.A de procedência VETEC.

As reações enzimáticas foram realizadas em mesa agitadora modelo CT-165 da fabricante CIENTEC sem controle de temperatura e modelo TE-420 da marca Tecnal com controle de temperatura.

As enzimas utilizadas nas reações foram todas de procedência comercial. São elas: Lipase de *Candida antarctica* do tipo A (CAL-A) da marca Codexis (2.6U/mg de sólido), lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CAL-B, Novozyme 435, 7300 PLU/g) da marca Novo Nordisk Co., e as lipases *Pseudomonas cepacia* do tipo Amano (PSL-C Amano, 1019 U/g) e *Pseudomas cepacia* do tipo I (PSL-C I, 1638 U/g) foram adquiridas das indústrias Amano Pharmaceutical Co. e Sigma-Aldrich respectivamente.

Todos os solventes utilizados foram obtidos comercialmente e em seguida destilados com seus adequados agentes dissecantes sob atmosfera de nitrogênio.

As determinações de massas foram realizadas numa balança analítica Ohaus Analytical Plus. As reações enzimáticas foram realizadas em mesa agitadora modelo CT-165 da fabricante CIENTEC sem controle de temperatura e modelo TE-420 da marca Tecnal com controle de temperatura.

### 5.2 Métodos Cromatográficos

#### 5.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As cromatografias de adsorção em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 ( $\Phi = 0,004-0,005\text{mm}$ ) código 1094 da marca VETEC, em placas de vidro na dimensão de 10 x 5cm com uma das faces revestida por uma camada de 0,5mm de

espessura. Também foram utilizadas cromatoplaças de gel de sílica 60 ( $\Phi = 2-25\mu\text{m}$ ) sobre poliéster T-6145 da SIGMA CHEMICAL CO, com camada de  $250\mu\text{m}$  de espessura e dimensões de  $20 \times 20\text{cm}$ .

A revelação das substâncias nas cromatoplaças foi realizada através de pulverização com solução de vanilina ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ) e ácido perclórico  $0,75 \text{ M}$  ( $\text{HClO}_4$ ) em etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), seguida de aquecimento em estufa a  $100^\circ\text{C}$  por aproximadamente 3 minutos ou submetidas a aquecimento com soprador serigráfico.

### ***5.2.2 Cromatografia em Coluna por adsorção***

Nas colunas cromatográficas por adsorção foi utilizado como adsorvente sílica gel 60 (230 – 240 mesh), de procedência SIGMA. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as massas das amostras e de sílica utilizadas. Os solventes utilizados foram previamente destilados, e o grau de polaridade variou de acordo com as amostras utilizadas.

### ***5.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)***

As separações cromatográficas, bem como os resultados de excesso enantiomérico foram realizadas em um aparelho Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da marca HP (Hewlett-Packard) modelo 1100 com detector Ultra-Violeta (UV) no comprimento de onda de  $210\text{nm}$  usando colunas quirais do tipo Daicel CHIRALCEL OD ou CHIRALPAK OB-H ( $25\text{cm} \times 4,6 \text{ mm D.I}$ ) conforme amostra analisada. A temperatura da coluna foi programada nas análises de acordo com as separações das amostras.

## **5.3 Métodos de Análise**

Os espectros de massa e cromatogramas foram obtidos em aparelhos pertencentes a Central Analítica do Departamento de Química Universidade de Oviedo – Espanha e na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

### ***5.3.1 Espectroscopia na Região de Infravermelho (IV)***

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, utilizando-se um espectrômetro Perkin Elmer, modelo (720FT) FT-IR Spectrum 1000. Na análise de compostos sólidos foram utilizadas pastilhas de KBr (Brometo de potássio) e filme para substâncias líquidas e solúveis em clorofórmio.

### ***5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e de Carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C)***

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C unidimensional foram realizados no Centro Nordeste 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 Hz e 500MHz e na frequência do carbono a 75 MHz e 125 MHz respectivamente. Esses mesmos espectros também foram obtidos utilizando-se Espectrômetros Bruker modelos AV-300 (<sup>1</sup>H, 300.13 MHz e C<sup>13</sup>, 75.5 MHz), DPX-300 (<sup>1</sup>H, 300.13 MHz e C<sup>13</sup>, 75.5 MHz), AV- 400 (<sup>1</sup>H, 400.13 MHz e C<sup>13</sup>, 100.6 MHz), ou AV-600 (<sup>1</sup>H, 600.13 MHz) da Central Analítica da Universidade de Oviedo.

Os solventes utilizados na obtenção dos espectros foram: clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>), acetona deuterada (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) e metanol deuterado (MeOD). Os deslocamentos químicos (δ) são fornecidos em valores parte por milhão (ppm) e referenciados pelos picos do hidrogênio e do carbono pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes. Os valores da tabela Cambridge Isotope Laboratories Inc. foram empregados como referência.

### ***5.3.3 Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chamas (CG/DIC)***

Os produtos reacionais obtidos foram analisados e quantificados por CG-DIC (Cromatógrafo Gasoso com Detector por Ionização de Chamas) modelo QP5000/QP5050A da SHIMADZU, usando coluna capilar DB-5-dimetilpolisiloxano com 30,0m de comprimento; 0,25mm de diâmetro interno e 0,30mm de diâmetro, com dois gradientes de temperatura, um de 10°C/min (40-180°C) e de 40°C/min (180°-300°C) e o outro com temperatura de



10°C/min (100-180°C) e de 40°C/min (180°-300°C), com a temperatura de injetor de 250°. As conversões foram calculadas um aparelho Cromatógrafo Gasoso Thermo Electron CG-FID modelo Trace GC Ultra, equipado com uma coluna quirral capilar da Varian Chirasil-Dex CB ( $\beta$ -ciclodextrina, 25m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m), tendo Hélio como gás carreador, numa velocidade 1mL/min no modo split. A temperatura do injetor e do detector era de 220°. A temperatura da coluna foi programada em acréscimo de 2°/min a partir de 130° até 160°.

#### **5.3.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)**

Os produtos reacionais obtidos foram analisados e quantificados por CG-EM (Cromatografia Gás-Líquido acoplado a Espectrometria de Massa) QP5000/QP5050A da SHIMADZU, usando coluna capilar DB-5-dimetilpolisiloxano com 30,0m de comprimento; 0,25mm de diâmetro interno e 0,30mm de diâmetro, com dois gradientes de temperatura, um de 10°C/min (40-180°C) e de 40°C/min (180°-300°C) e o outro com temperatura de 10°C/min (100-180°C) e de 40°C/min (180°-300°C), com a temperatura de injetor de 250°.

#### **5.3.5 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) de alta resolução**

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos usando um espectrômetro de massa modelo LCMS-IT-TOF (225-07100-34) - SHIMADZU, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI).

#### **5.3.6 Rotação óptica**

As rotações ópticas dos compostos foram obtidas em um polarímetro da marca Perkin Elmer, modelo 241 utilizando diclorometano como solvente com concentrações de aproximadamente 1.4g/L.

#### **5.3.7 Ponto de fusão**

Os pontos de fusão dos compostos sólidos foram observados em aparelho digital da Micro Química, modelo MQAPF-302. As determinações foram realizadas a uma taxa de aquecimento de 4°C/min.

## **5.4 Procedimento experimental para reações com células íntegras**

### ***5.4.1 Determinação de Proteínas***

As proteínas desempenham um importante papel na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através de membranas celulares e outros (ZAIA *et al*, 1998). Neste trabalho foram realizados dois processos de determinação de proteínas: a metodologia de Lowry modificada por Hartree e a metodologia de Bradford. Todas as amostras selecionadas foram submetidas aos dois métodos de quantificação protéica. Os procedimentos adotados e os resultados encontram-se descritos a seguir.

### ***5.4.2 Obtenção dos extratos aquosos para determinação de proteínas***

Antes da obtenção dos extratos, todas as espécies foram submetidas a processo de desinfecção com solução de NaOCl 5%, onde estas ficaram em contato com a solução por aproximadamente 20 minutos. Sendo em seguida lavadas com água destilada abundantemente, para então serem utilizadas nos processos de biocatálise. A tabela 57 apresenta as espécies vegetais selecionadas, bem como as partes dos vegetais que foram utilizadas para obtenção dos extratos aquosos.

Os extratos aquosos de todas as amostras dos vegetais selecionados foram obtidos da seguinte maneira: 20g do vegetal foram cortados em pedaços ou triturados em liquidificador, onde foram colocados em erlenmeyer juntamente com 80 mL de água destilada. Após esse processo foram colocados em mesa agitadora a uma rotação de 200 r.p.m por 72 horas. Logo após esse período as amostras foram filtradas, e o extrato aquoso obtido, armazenado em geladeira para ser utilizado posteriormente nos procedimentos de determinação de proteínas.

TABELA 57: Fontes vegetais utilizadas no screening para o estudo de biocatálise

<b>Vegetais</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Parte do vegetal utilizada</b>
Batata doce	<i>Ipomoea batatas L</i>	Polpa sem casca
Beterraba	<i>Beta vulgaris L</i>	Polpa sem casca
Inhame	<i>Dioscorea cayenensis</i>	Polpa sem casca
Maxixe	<i>Cucumis anguri L.</i>	Polpa
Quiabo	<i>Abelmoschus esculentus</i>	Polpa
Abacate	<i>Persea americana</i>	Polpa sem casca e sem semente
Abacaxi	<i>Ananás comosus</i>	Polpa sem casca
Mamão	<i>Carica papaya</i>	Polpa sem casca e sem semente
Feijão de corda	<i>Vigna unguiculata</i>	Semente
Feijão carioca	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Semente
Feijão preto	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Semente
Feijão verde	<i>Vigna unguiculata</i>	Semente
Fava	<i>Phaseolus lunatus L</i>	Semente

#### 5.4.3 Método de Lowry

A técnica identificada como método de Lowry para determinação de proteínas totais é a metodologia mais utilizada para este fim. A sua principal vantagem é a sua alta sensibilidade, sendo por isso, usada para determinação de proteínas em vários meios, como por exemplo, o plasma sanguíneo, saliva humana, tecidos animais e produtos alimentícios. O método de Lowry também é indicado, pois frente a outras metodologias, ele mostrou-se mais sensível, com melhor exatidão, menor consumo de amostra, e dependendo do caso, menos susceptível a interferentes (ZAIA *et al*, 1998).

Apesar de apresentar algumas vantagens, este método também possui as suas desvantagens, tais como: estar sujeito a muitos interferentes, apresentar longo tempo de análise e possuir absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas.

Várias modificações deste método têm sido propostas para resolver esses problemas citados. Hartree fez várias modificações, melhorando a faixa de linearidade e uniformizando as absorvidades específicas para algumas proteínas. Estas modificações são as mais utilizadas, apesar de tornar o método trabalhoso no preparo de reagentes (HARTREE, 1972).

Para a realização da determinação de proteínas nos extratos aquosos dos vegetais selecionados, utilizou-se a metodologia de Lowry modificado por Hartree (1972), onde preparou-se os seguintes reagentes:

- Solução A: 50g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dissolvido em 250mL de NaOH 1M, seguida da adição de 1g de tartarato duplo de sódio e potássio e dissolução em 500ml de água destilada.

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

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

O procedimento ocorreu da seguinte maneira: 1mL do extrato aquoso foram submetidas à processos de diluição ou não, conforme conveniência para as análises. À 1mL de cada solução foi adicionado 0,9mL do reagente A, seguido do aquecimento à  $50^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado 0,1mL do reagente B e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos. Então, adiciona-se 3mL do reagente C seguida de agitação, que logo após é posto outra vez em “banho maria” a  $50^\circ\text{C}$  por mais 10 minutos, refria-se à temperatura ambiente e realiza-se a leitura desta amostra em espectrofotômetro no comprimento de onda de  $650\text{nm}$  usando curva de calibração padrão de Soro Albumina Bovina (BSA).

O procedimento foi realizado em triplicata, tendo a água destilado como controle branco. Como resultado detectou-se a presença das respectivas concentrações de proteínas conforme tabela 18.

#### ***5.4.4 Método de Bradford***

O método de determinação de proteínas por Bradford (1976) é bem mais simples que o de Lowry. Ele usa o corante “Coomassie Brilliant Blue G-250” e baseia-se na interação de grupos ácidos e básicos das proteínas com dissociação dos grupos do corante formando um complexo colorido. O corante se liga principalmente à resíduos de aminoácidos de cadeias laterais básicas e aromáticas e não está sujeito à tantos interferente como o método de Lowry. Uma das principais desvantagens desse método está no fato da ligação do corante à proteína depender sensivelmente do seu tamanho e da composição de aminoácidos da proteína. Ele

tem mostrado interações fracas com resíduos de histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina (LUCARINI *and* KILIKIAN, 1999).

Para a determinação da quantidade de proteína no extratos aquosos das espécies vegetais selecionadas adotou-se o seguinte procedimento: à 0,1mL do extrato aquoso foi adicionado 2,5mL do reagente de Bradford e após 2 minutos foi realizada à leitura desta amostra em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm usando BSA como padrão da curva de calibração. Foi feito também um branco, constando este de 0,1mL de água destilada e 2,5mL do reagente de Bradford. O procedimento foi realizado em triplicata e este detectou a presença de proteínas nos extratos aquosos analisadas, os resultados obtidos encontram-se na tabela 20, página 65 do capítulo de resultados e discussões.

## 5.5 Screening de feijões

De acordo com as análises obtidas através das técnicas de determinação de proteínas, foram selecionadas somente as espécies de feijão e seus diferentes cultivares para dar continuidade aos estudos de biocatálise deste trabalho. Portanto, foram selecionadas as seguintes espécies de feijão foram: feijão de corda (*Vigna unguiculata* /F-1), feijão mulatín (*Phaseolus vulgaris*/ F-2), feijão preto (*Phaseolus vulgaris* – variação/ F-3), feijão fava branca (*Phaseolus lunatus* L - F4) e feijão verde (*Vigna unguiculata* - variação F5).

### 5.5.1 Reações com acetofenona, cloro-nitro-benzeno e benzoato de metila

As reações realizadas em meio aquoso adotaram as seguintes condições: usou-se 30g de biocatalisador cortados em pedaços ou triturados em liquidificador, 90 mL de água destilada e ainda 120 mg do respectivo substrato. Após esse processo foram colocados em mesa agitadora a uma rotação de 250 r.p.m por 72 horas. Logo após esse período as amostras foram filtradas, e o extrato aquoso submetido a uma extração líquido-líquido com acetato de etila (3x de 50 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e submetido a evaporação do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida.

As amostras dos produtos obtido foram ainda submetidos a purificação em coluna de adsorção utilizando sílica gel como fase estacionária e os solventes hexano e acetato de etila na proporção de 8:2 como fase móvel. Após a purificação os produtos obtidos foram submetido à análise em equipamento analítico adequado.

### 5.5.2 Reações em tampão fosfato

Adotou-se o seguinte procedimento para estas reações: 20g do material vegetal foi triturado e adicionado 100mL tampão fosfato pH 6,5 e uma solução de 10mL de NaCl 0,15M. Seguido de agitação por 4h à 4°C para extração de um extrato tamponante rico em enzimas vegetais. Logo após o material resultante foi filtrado e centrifugado à 300rpm por 10 minutos. Esse procedimento foi adotado conforme referência da literatura descrito por Pimenta e colaboradores (2005).

Após obtenção desses extratos adotou-se o seguinte procedimento para as reações de redução: em um erlenmeyer foram adicionados 50 mg de acetofenona e 20mL do tampão com as enzimas extraídas dos vegetais. Após esse processo as reações foram colocadas em mesa agitadora a uma rotação de 250 r.p.m por 72 horas. Logo após esse período as amostras foram filtradas, e o extrato aquoso submetido a uma extração líquido-líquido com acetato de etila (3x de 15 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e submetido a evaporação do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida. As amostras dos produtos obtido foram ainda submetidos a purificação em coluna de adsorção utilizando sílica gel como fase estacionária e os solventes Hexano e acetato de etila na proporção de 8:2 como fase móvel. Após a purificação os produtos obtidos foram submetido à análise em equipamento analítico adequado.

## 5.6 Preparo dos padrões via química

Para se obter os padrões químicos dos substratos: 2-octanona (4), 3-hexanona (5), 5-hexen-2-ona (6), aceto-acetato de etila (7), mentona (8), carvona (9), tetralona (10) e cânfora (11), realizou-se redução química para obtenção dos seus respectivos álcoois. A metodologia utilizada empregou 4mmol da respectiva cetona, adicionada de 3 equivalentes do agente redutor NaBH<sub>4</sub> em 10mL de metanol em agitação permanente. As reações foram acompanhadas por CCD e finalizadas quando apresentou-se apenas uma mancha na CCD.

As reações tiveram tempos reacionais diferentes de acordo com cada substrato, variando entre 2h até 24h. Logo após esses intervalos os produtos obtidos foram submetido a processo de purificação em coluna utilizando hexano e acetato de etila como solventes. A tabela 30, do capítulo de resultados e discussões apresenta os respectivos rendimentos para as reações.

## 5.7 Reações de biorredução

Neste procedimento adotou-se a seguinte metodologia: à 20g do biocatalisador (F-1 ou F-2) adicionou-se 80mg da respectiva cetona e 60mL de água destilada em erlenmeyer. Este foi submetido a agitação em shake orbital por 72h a 200rpm. Logo após esse intervalo as reações foram submetidas a extração com solvente orgânico (acetato de etila – 3x 40mL), onde a fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e submetido a evaporação do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Os produtos obtidos foram purificados em coluna cromatográfica e em seguida analisados conforme equipamento adequado para verificação das conversões e excessos enantioméricos. Os resultados obtidos encontram-se item 4.5 do capítulo de resultados e discussão.

### 5.7.1 Biorredução de acetofenona em diferentes condições reacionais

A metodologia adotou o seguinte procedimento: à 1g de biocatalisador adicionou-se 4uL de acetofenona e 3mL de água destilada, à 30°C e agitação de 250rpm em shake orbital por 72hs. O curso das reações foi acompanhado através da retirada de alíquotas a cada 24h. Cada alíquota foi submetida a extração com solvente acetato de etila para posterior análise conforme técnica adequada.

Esta mesma metodologia foi adotada, substituindo-se água destilada por tampão fosfato pH 7,5 ou ainda utilizando co-solventes no meio, como DMSO (5%) ou isopropanol (3%). Os resultados dessas reações encontram-se na tabela 26, do capítulo de resultados e discussões.

#### 5.7.1.1 Variação da concentração do co-solvente

Após a constatação de que o co-solvente influencia de forma positiva nas conversões dessas reações, resolveu-se então estudar a influência da sua concentração no meio reacional. Para isto, o co-solvente selecionado foi o IPA por apresentar os melhores resultados. A metodologia empregada foi a mesma já descrita no item anterior, variando-se apenas as quantidade de IPA, que neste caso foram de 2%, 5%, 10%, 30% e 100%. Os resultados dessas reações encontram-se na tabela 28, do capítulo de resultados e discussões.

### 5.7.1.2 *Variação da quantidade de solvente ou de biocatalisador*

Depois de verificada a influencia da concentração do co-solvente no meio reacional, verificou-se também a influencia da quantidade do biocatalisador, temperatura e quantidade de solvente. A metodologia utilizada foi a mesma já descrita, variando-se em alguns casos a quantidade do biocatalisador para 0,2g, ou variando a quantidade do solvente para 3, 6 ou 15mL ou ainda variando-se a temperatura para 20°C, 37°C ou 45°C. As condições empregadas em cada reação, bem como os resultados obtidos, estão descritos na tabela 29, capítulo de resultados e discussão.

## 5.8 Redução de cetonas

### 5.8.1 *Redução química dos derivados de acetofenona*

Depois de estabelecidas as melhores condições para as reações de biotransformação, resolveu-se então aplica-lás para outros compostos derivados de acetofenona. Visando a obtenção de padrões químicos para serem usados nas reações de biorredução, alguns substratos derivados da acetofenona foram selecionados para serem reduzidos quimicamente.

Os substratos selecionados foram: (12)-*m*-nitro-acetofenona, (13)-*o*-nitro-acetofenona, (14)-*p*-nitro-acetofenona, (15)-*o*-metoxi-acetofenona, (16)-*m*-metoxi-acetofenona, (17)-*p*-metoxi-acetofenona, (18)-*p*-metil-acetofenona, (19)-*o*-metil-acetofenona, (20)-*p*-isopropil-acetofenona, (21)-*p*-Cl-acetofenona, (22)-*m*-Br-acetofenona, (23)-2',2-Cl-acetofenona, (24)-2',4',2-Cl-acetofenona, (25)-3',4',2,Cl-acetofenona.

Na metodologia da redução química utilizou-se 1mmol da respectiva cetona, 2mmol de NaBH<sub>4</sub>, 3mL de metanol em agitação à temperatura ambiente conforme tempo necessário para redução do composto. As reações foram acompanhadas por CCD e finalizadas até completo consumo do substrato. Em seguida estes foram submetidos a processo de purificação e devidamente caracterizados. A tabela 30 apresenta os rendimentos e tempos reacionais, esta encontra-se no capítulo de resultados e discussão.



### 5.8.2 Redução de nitrocompostos

Como as reações com derivados de acetofenona que apresentaram o grupo nitro, também sofreram redução desse grupo, resolveu-se então obter-se os padrões desses derivados com a redução de apenas esse grupamento. Para redução específica de nitrocompostos, utiliza-se estanho como agente redutor. Adotou-se o seguinte procedimento:

À 1mmol da respectiva cetona (12 ou 13) adicionou-se 2 equivalentes de estanho sólido, em 2,4mL de água e 0,9mL de HCl concentrado. A reação seguiu em agitação por 1,5h, após esse intervalo adicionou-se 2mL de NaOH 40% com agitação e em banho frio. A mistura reacional obtida foi então filtrada em celite e o material resultante submetido a uma extração líquido-líquido com acetato de etila (3x 5mL). A fase orgânica foi submetida à evaporação do solvente e o material obtido foi submetido à recristalização.

Os produtos obtidos foram submetidos à devida caracterização e os rendimentos da reação encontram-se item 4.7.2 do capítulo de resultados e discussão.

### 5.8.3 Biorredução

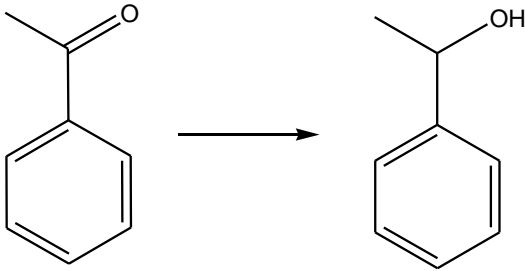
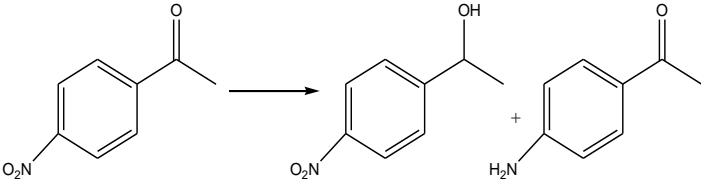
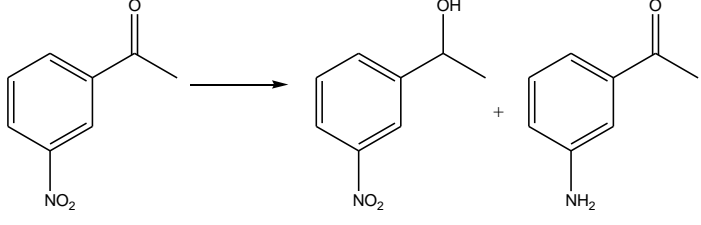
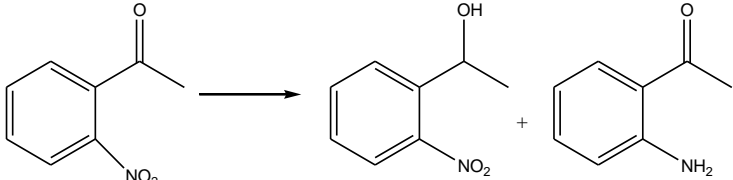
Foram utilizados os compostos nitrados: nitrobenzeno (26), *o*-nitro-fenol (27), *p*-nitro-fenol; uma benzonitrila (29); um nitro-acetato (30); as cetonas alifáticas: 2-octanona (31), 2-undecanona (32); dois  $\beta$ -ceto-ésteres: etanoato de 2-oxo-propila (33), etanoato de 3-cloro-2-oxo-propila (34) e ainda uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada: 4-fenil-3-buten-2-ona (35).

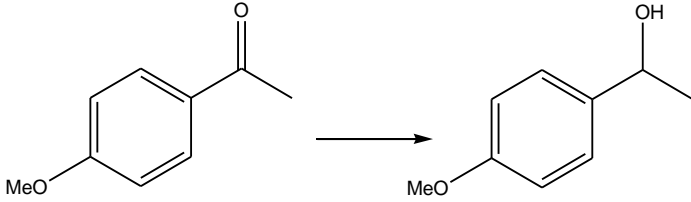
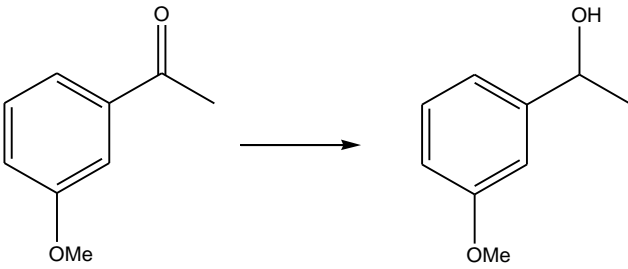
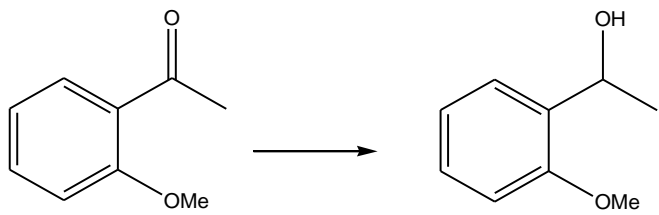
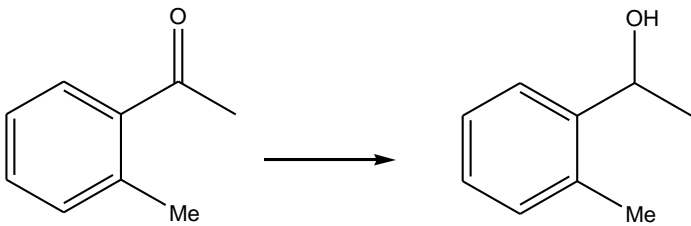
Todas as biorreduções desses compostos adotaram o mesmo procedimento já descrito anteriormente no item 5.7, deste capítulo.

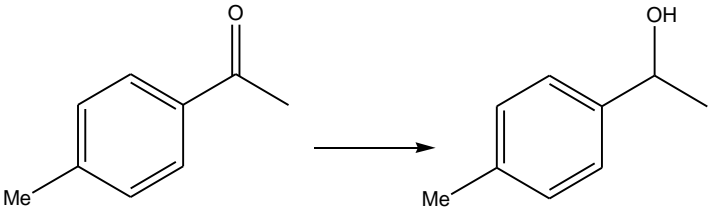
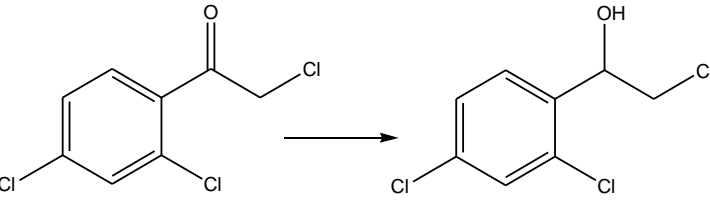
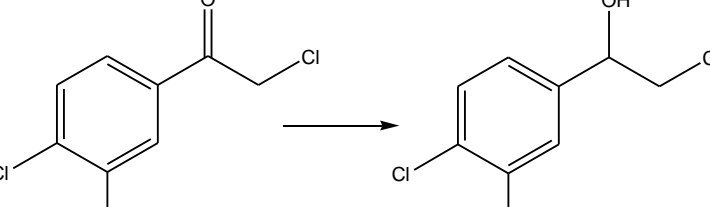
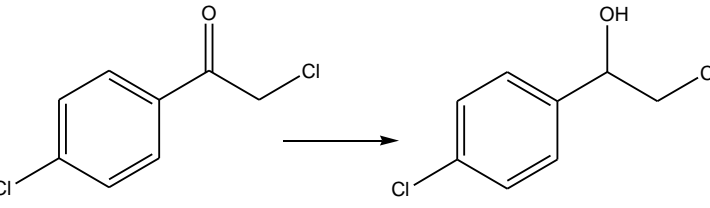
## 5.9 Métodos de separação

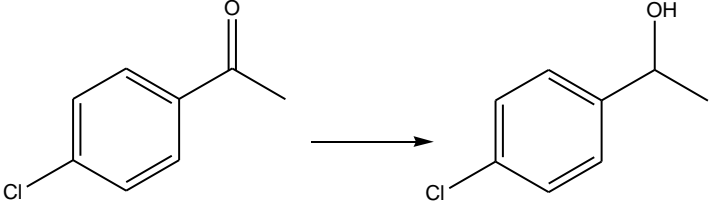
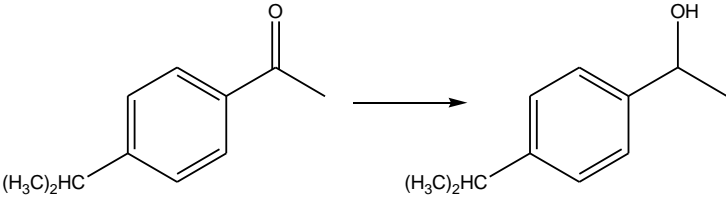
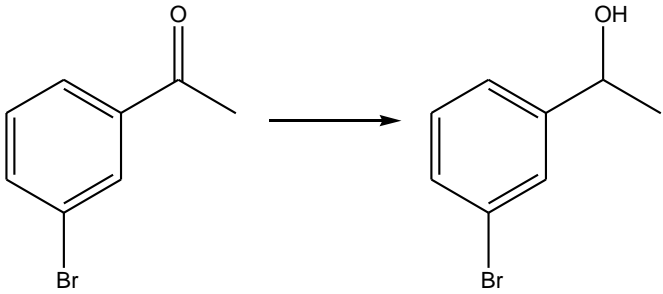
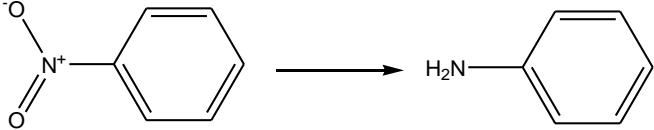
A tabela 58 apresenta os métodos de separação utilizados em CG-FID e CLAE para a separação dos substratos utilizados neste trabalho.

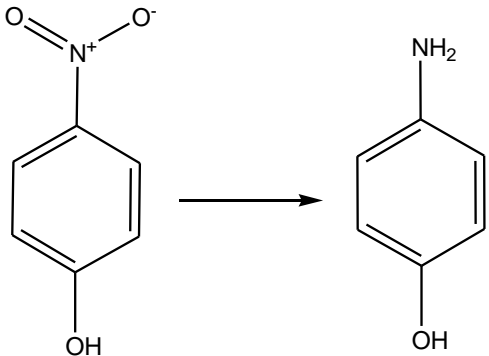
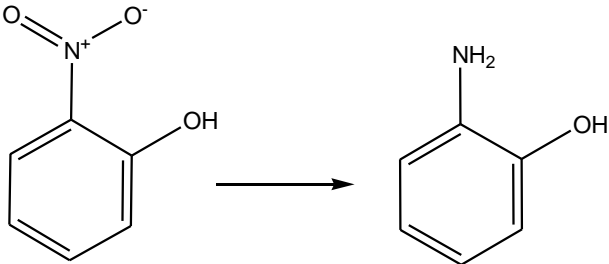
TABELA 58 – Condições gerais de separação das cetonas aromáticas e resolução dos álcoois por CG-FID ou CLAE

Cetona/Álcool	Separação CG-FID	Separação CLAE
	<p>Coluna: Chirasil DexCB</p> <p>Rampa: 110° C(0 min)- 2,5°C/min- 118°C (0 min) - 0,5°C/min 120°C(0 min) -15°C/min 180°C (0 min).</p> <p>Tempos: tr (S): 6.4 min tr(R): 7.0 min tr(cetona):3.4</p>	-
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 12.3 min tr(cetona):9.2min tr(amina): 10.7min</p>	<p>Coluna: AS/APH Solvente: H/IPA (80:20) Temp.: 20° Fluxo:0.8mL/min Pressão: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 9.7 min tr(R): 11.2 min tr(cetona):14.0</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 11.7 min tr(cetona):9.0min tr(amina): 8.1min</p>	<p>Coluna: OB-H Solvente: H/IPA (90:10) Temp.: 20° Fluxo:0.8mL/min Pressão: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 12.1 min tr(R): 13.4 min tr(cetona):29.4</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 8.4 min</p>	<p>Coluna: AS/APH Solvente: H/IPA (95:5) Temp.: 20° Fluxo:0.8mL/min Pressão: 20bar</p> <p>Tempos:</p>

	tr(cetona):7.5 min tr(amina): 5.5 min	tr (S): 15.3 min tr(R): 14.3 min tr(cetona):23.4
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 24.3 min tr(cetona): 25.9 min</p>	<p>Coluna: OB-H</p> <p>Solvente: H/IPA (90:10)</p> <p>Temp.: 20°</p> <p>Flujo:0.8mL/min</p> <p>Presión: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 14.1 min tr(R): 19.9 min tr(cetona):24.4</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 6.7 min tr(cetona): 6.9 min</p>	<p>Coluna: OB-H</p> <p>Solvente: H/IPA (90:10)</p> <p>Temp.: 20°</p> <p>Flujo:0.8mL/min</p> <p>Pressão: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 12.2 min tr(R): 16.5 min tr(cetona):13.5</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 5.7 min tr(cetona): 5.9 min</p>	<p>Coluna: OB-H</p> <p>Solvente: H/IPA (90:10)</p> <p>Temp.: 20°</p> <p>Flujo:0.8mL/min</p> <p>Pressão: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 10.9 min tr(R): 18.1 min tr(cetona):22.5min</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 3.7 min tr(cetona): 3.2 min</p>	<p>Coluna: OB-H</p> <p>Solvente:H/IPA (95:5)</p> <p>Temp.: 20°</p> <p>Flujo:0.8mL/min</p> <p>Pressão: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 7.9 min tr(R): 12.0 min tr(cetona):10.3min</p>

	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 3.5 min tr(cetona): 3.8 min</p>	<p>Coluna: AS/APH Solvente:H/IPA (98:2) Temp.: 30° Fluxo:0.8mL/min Presión: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 11.8 min tr(R): 12.7 min</p> <p>tr(cetona):10.8min</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 13.6 min tr(cetona): 12.7 min</p>	<p>Coluna: IA Solvente:H/IPA (95:5) Temp.: 20° Fluxo:0.8mL/min Pressão: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 12.8 min tr(R): 11.0 min tr(cetona):7.9min</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 14.7 min tr(cetona):14.0 min</p>	<p>Coluna: IA Solvente:H/IPA (95:5) Temp.: 20° Fluxo:0.8mL/min Pressão: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 13.3 min tr(R): 15.3 min tr(cetona): 10.3min</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 13.7 min tr(cetona): 13.3 min</p>	<p>Coluna: Chirasil Dex CB (GASES)</p> <p>Rampa: 70°C (4min) - 20°C/min- 110°(0 min)-10°C/min- 130°C(15 min)- 20°C/min- 200°C(4min).</p> <p>Tempos (Acetato): tr (S): 26.9 min tr(R): 25.9 min</p>

	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 7.8 min tr(cetona): 7.1 min</p>	<p>Coluna: Chirasil Dex CB (GASES)</p> <p>Rampa: 70°C (10min) - 2°C/min- 200°(1 min)</p> <p>Tempos: tr (S): 43.7 min tr(R): 43.1 min</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 9.9 min tr(cetona): 10.7 min</p>	<p>Coluna: OB-H Solvente:H/IPA (95:5)</p> <p>Temp.: 20° Fluxo:0.8mL/min Pressão: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 23.4 min tr(R): 22.0 min tr(cetona): 9.9min</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(álcool): 10.8 min tr(cetona): 9.7 min</p>	<p>Coluna: OB-H Solvente:H/IPA (95:5)</p> <p>Temp.: 20° Fluxo:0.8mL/min Pressão: 20bar</p> <p>Tempos: tr (S): 9.0 min tr(R): 10.2 min tr(cetona): 12.5 min</p>
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(amina): 1.9 min tr(nitro): 2.7 min</p>	

	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(amina): tr(nitro): 13.2 min</p>	
	<p>Coluna: HP-1</p> <p>Rampa: 90°C(0min) – 2.5°C/min- 120°(0 min)-20°C/min- 200°C(3 min).</p> <p>Tempos: tr(amina): 4 min tr(nitro): 2.8 min</p>	

## 5.10 Procedimento experimental para reações com lipases comerciais

### 5.10.1 Screening de enzimas

Os estudos iniciais para verificar atividade enzimática frente a reações de acilação foram realizados utilizando como biocatalisadores as enzimas comerciais: CAL-A (*Candida antarctica* do tipo A), CAL-B (*Candida antarctica* do tipo B), PSL-C Amano (*Pseudomonas cepacia* do tipo Amano) e PSL-C I (*Pseudomonas cepacia* do tipo I). Todas as reações iniciais foram realizadas utilizando o substrato cloranfenicol (1) na quantidade de 10mg (0,0309mmol); a correspondente enzima numa relação de 1:1 (em peso) com o substrato; o solvente 1,4 dioxano seco, numa quantidade de 2mL; o correspondente éster vinílico (inicialmente decanoato de vinilo – 0,1545mmol), em uma proporção de 5 equivalentes com relação ao substrato. Todas as reações ocorreram sob atmosfera de nitrogênio, a uma temperatura de 30° C e rotação de 250 r.p.m., sendo finalizadas ao final de 48 horas. Após esse período, o material reacional juntamente com as enzimas foi filtrado e lavado (3 x 3mL) com diclorometano. O solvente foi então evaporado sob pressão reduzida e o produto obtido analisado em condições apropriadas em CLAE.

### **5.10.2 Variação de solvente e temperatura**

Depois de verificada a eficiência das enzimas, nas reações iniciais, três delas foram selecionadas para serem submetidas a variações nas condições de reação com o objetivo de otimizar os resultados obtidos até então. Foram elas: CAL-B, PSL-C Amano e PSL-C I. Essas variações incluíram mudanças de temperatura e solvente. As condições de reação empregadas foram as mesmas descritas anteriormente no item 5.10.1. Nas mudanças de solventes, foram utilizados: TBME (ter-butil-metil-éter), THF (tetrahidrofurano) e CH<sub>3</sub>CN (acetonitrila). O mesmo procedimento foi aplicado para as variações de temperatura, as quais foram testadas: 20°C, 30°C, 40°C e 45°C. Todas as reações foram analisadas por CLAE, com alíquotas retiradas em intervalos de 24 e 48 horas, sendo finalizadas nesse último.

## **5.11 Obtenção dos padrões químicos**

Comprovada a eficiência das enzimas utilizadas, resolveu-se então obter outros derivados de cloranfenicol. Visto isso, tornou-se necessária a síntese dos padrões via reação química. Os procedimentos e técnicas realizados variaram em virtude da disponibilidade dos reagentes.

### **5.11.1 Obtenção dos padrões derivados de cloranfenicol com cloretos de ácido**

O procedimento adotado para obtenção dos derivados decanoato (41), acetato (43), propanoato (44), laurato (45) e benzoato (46) de cloranfenicol adotou metodologia tradicional de reações de acilação utilizando os respectivos cloretos de acila nos procedimentos reacionais. As condições de reação variaram de acordo com os reagentes e obtenção dos produtos. Em todas as reações o substrato cloranfenicol foi utilizado na quantidade de 100mg (0,3095mmol); tri-etil-amina, com 3 equivalentes em relação ao substrato; o respectivo cloreto de acila, com 2 equivalentes em relação ao substrato; o solvente numa quantidade de 3mL, correspondendo a uma concentração de 0,1mM e DMAP em quantidades catalíticas. Todas as reações ocorreram sob atmosfera de nitrogênio. A tabela 59 apresenta os reagentes empregados, solventes e tempos de reação.

TABELA 59 – Condições empregadas nas reações químicas com cloretos de ácido para obtenção dos derivados de cloranfenicol

<b>Entrada</b>	<b>Cloreto de acila</b>	<b>Solvente</b>	<b>Tempo de reação (h)</b>	<b>Produto</b>
1	Acetila	Dioxano	20	17
2	Propanoíla	Dioxano	7	18
3	Benzoíla	Dioxano	20	20
4	Decanoíla	Acetonitrila	24	15
5	Lauroíla	Acetonitrila	26	19

Em todas as reações foram obtidos os respectivos produtos desejados, inclusive os compostos di-acilados. Em virtude disso, e também para purificação dos compostos, todos os produtos reacionais foram submetidos à purificação através colunas cromatográficas. Os eluentes foram utilizados de acordo com a polaridade e melhor separação dos compostos. A tabela 60 apresenta os solventes utilizados nas colunas cromatográficas para isolamento dos produtos.

TABELA 60 – Solventes utilizados nas cromatografias de separação dos produtos das reações químicas para obtenção dos derivados de cloranfenicol e seus respectivos pesos

<b>Entrada</b>	<b>Solventes (%)</b>	<b>Produtos</b>	<b>Peso produto mono-acilado</b>	<b>Peso Produto Di-acilado</b>
1	Hexano/Acetato (25%)	Acetato e di-acetato de cloranfenicol	52mg	32mg
2	Hexano/Acetato (30%)	Propanoato e di-propanoato de cloranfenicol	44mg	28mg
3	Hexano/Acetato (30%)	Benzoato e di-benzoato de cloranfenicol	30mg	97mg
4	Hexano/Acetato (20%)	Decanoato e di-decanoato de cloranfenicol	43mg	45mg
5	Hexano/Acetato (20%)	Laurato e di-laurato de cloranfenicol	32mg	126mg



### 5.11.2 Obtenção dos padrões via metodologia enzimática

Em virtude de não se dispor dos respectivos cloretos de acila para obtenção dos compostos palmitato (47) e crotonato (48) de cloranfenicol, estes foram preparados através de reações enzimáticas. Nos dois casos utilizou-se o substrato numa quantidade de 100mg (0,3095mmol); os respectivos ésteres vinílicos numa relação de 5 equivalentes com relação ao substrato (crotonato de vinilo e palmitato de vinilo); solvente acetonitrila numa quantidade de 2mL; a enzima CAL-B numa proporção 1:1 em peso, com relação ao substrato; à temperatura de 20° sob atmosfera de nitrogênio, e rotação de 250 r.p.m por 24 horas. Após esse intervalo as enzimas foram filtradas e lavadas com diclorometano (3x3mL) e armazenadas. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, submetida à evaporação do solvente sob vácuo, e o produto obtido submetido à cromatografia em coluna para purificação. Os eluentes utilizados nas colunas foram misturas de hexano e acetato de etila, numa proporção de 15% de acetato para purificação do crotonato e 20% para purificação do palmitato. Os produtos foram obtidos na quantidade de 15mg para o crotonato e 107mg para o palmitato de cloranfenicol.

### 5.11.3 Obtenção dos padrões di-palmitato e di-crotonato de cloranfenicol

Como nos outros derivados de cloranfenicol foram obtidos os respectivos compostos di-acilados, resolveu-se então obter os compostos di-acilados de palmitato e crotonato de cloranfenicol, visto que estes não foram formados nas reações que produziram os compostos mono-acilados. A metodologia empregada está descrita na literatura (GARCÍA *et al*, 2002) e adota o seguinte procedimento: misturou-se 100mg (0,3095mmol) de cloranfenicol e tri-etilamina (1,857mmol, 258uL) em 1,4-dioxano (3mL) sob atmosfera de nitrogênio e adicionou-se aos poucos o respectivo ácido carboxílico (ácido decanóico ou ácido crotônico – 1,5475mmol), DCC (dicicloexil-carbodiimida – 1,5475mmol, 319mg) e DMAP (em quantidades catalíticas). A reação foi agitada a temperatura ambiente durante 8 horas. O material insolúvel foi coletado e filtrado e o material resultante foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo restante foi dissolvido em NaHCO<sub>3</sub> saturado e extraído com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x5mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e em seguida o material foi filtrado e evaporado. O produto obtido foi submetido à purificação em coluna utilizando misturas de hexano/acetato de etila 20% para ambos derivados. O derivado di-acilado crotonato foi obtido numa quantidade de 97mg e o composto di-acilado palmitato,

numa quantidade de 150mg. Estes por sua vez foram devidamente caracterizados através de técnicas espectrométricas e espectroscópicas para comprovar suas respectivas estruturas.

### 5.12 Condições de separação dos compostos em CLAE

Depois de devidamente caracterizados todos os derivados de cloranfenicol foram submetidos a separação em CLAE e as condições empregadas nas separações variaram de acordo com a polaridade dos compostos. Todas as análises tiveram fluxo de 0,8mL/min, exceto para os derivados decanoto e di-decanoato, que apresentaram fluxo de 1,0mL/min. As condições estabelecidas são apresentadas na tabela 61.

TABELA 61 – Condições de separação em CLAE dos derivados de cloranfenicol

<b>Entrada</b>	<b>Composto</b>	<b>Hexano/IPA (%)</b>	<b>Coluna</b>	<b>Temp.(°C)</b>	<b>Tempo de Ret. (min)</b>
1	Cloranfenicol	20	OD	30	12,1
2	Cloranfenicol	20	AS-APH	40	8,3
3	Cloranfenicol	15	OD	20	19,7
4	Acetato	20	AS-APH	40	13,6
5	Di-acetato	20	AS-APH	40	19,2
6	Propanoato	20	AS-APH	40	10,8
7	Di-propanoato	20	AS-APH	40	12,6
8	Crotonato	20	AS-APH	40	11,8
9	Di-crotonato	20	AS-APH	40	17,3
10	Decanoato	15	OD	20	9,8
11	Di-decanoato	15	OD	20	6,2
12	Laurato	20	AS-APH	40	6,3
13	Palmitato	20	OD	30	7,2
14	Benzoato	20	AS-APH	40	13,7

### 5.13 Curvas de calibração

Depois de obtidos todos os padrões químicos e estes terem sido devidamente caracterizados para confirmar as respectivas estruturas, foram realizadas as curvas de calibração de todos os padrões e do cloranfenicol a fim de calcular os resultados de conversões das reações. As curvas de calibração de todos os compostos foram feitas em CLAE e adotaram o mesmo procedimento. Para cada derivado foi preparada uma solução de 1000ppm e esta por sua vez, foi diluída para concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 ppm. As soluções obtidas foram submetidas à análise em CLAE com comprimento de onda de 210nm. Os valores de absorvância obtidos e suas respectivas concentrações foram plotados em gráficos do tipo absorvância x concentração. Estes, depois de gerados através do programa Origin® forneceram suas respectivas equações da reta com valores de R. Os dados obtidos, bem como os gráficos encontram-se no capítulo de resultados e discussões item 4.13.

### 5.14 Reações de acilação utilizando diferentes doadores acila

Depois de obtidos os resultados com decanoato de vinilo e verificada a atividade das enzimas testadas frente a reações de acilação, decidiu-se utilizar outros doadores vinilo para obter novos derivados de cloranfenicol. Foram realizadas reações com os seguintes agentes acilantes vinílicos: acetato, propanoato, crotonato, laurato, palmitato e benzoato.

#### 5.14.1 Reações com acetato de vinilo e propanoato de vinila

Para obter os derivados acetato e propanoato de cloranfenicol via enzimática, adotou-se o seguinte procedimento: foram utilizados 10mg de cloranfenicol (0,0309mmol), 5 equivalentes do respectivo doador acilo – acetato ou propanoato de vinilo - (0,1545mmol), 10mg das enzimas selecionadas (CAL-B, PSL-C I e PSL-C Amanno) e 2mL (0,015M) do solvente seco apropriado (CH<sub>3</sub>CN ou 1,4-dioxano) a depender da enzima, sob atmosfera de nitrogênio e a uma rotação de 250 rpm. Os tempos das reações e as temperaturas variaram de acordo com a enzima utilizada. As temperaturas foram estabelecidas em experimentos já descritos anteriormente. Alíquotas das reações foram retiradas com tempos de 24 e 40 horas para acetato de vinilo 24 e 30 horas para propanoato de vinilo. Depois de finalizadas as reações, o material obtido foi lavado com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x3mL), o solvente foi evaporado e

concentrado. As alíquotas foram analisadas em CLAE e verificou-se as respectivas conversões. Estas se encontram apresentadas no capítulo de resultados e discussão.

#### **5.14.2 Reações com benzoato de vinilo**

As reações que utilizaram benzoato de vinilo com doador do grupo acila, foram realizadas nas mesmas condições já descritas neste capítulo. Estas levaram a resultados de conversão muito baixos em todos os casos. Em virtude disso decidiu-se aumentar a temperatura das reações para 40°C e verificar seu efeito no rendimento. Foram obtidos melhores resultados de conversão, porém com valores considerados moderados. Uma nova tentativa de melhoria de conversão foi realizada utilizando a enzima CAL-B como catalisador a uma temperatura de 60°C, entretanto a esta temperatura a enzima mostrou-se inativa. Decidiu-se então utilizar o próprio doador vinilo como solvente juntamente com a enzima CAL-B como biocatalisador, obtendo-se um valor de conversão moderado com um tempo de 48 horas. Finalmente utilizou-se anidrido benzóico como agente acilante, a uma temperatura de 20°C e CAL-B como biocatalisador com tempo reacional de 48h. Entretanto não foi possível analisar as alíquotas, pois os tempos de retenção coincidiam no cromatograma não sendo possível a separação.

#### **5.14.3 Reações com laurato de vinilo e palmitato de vinilo**

A metodologia utilizada para obtenção dos derivados laurato e palmitato de cloranfenicol foi a mesma já descrita anteriormente. Condições de reação, bem como enzimas utilizadas também foram iguais. Os agentes acilantes laurato e palmito de vinilo, foram usados em uma quantidade de 5 equivalentes (mmol) com relação ao substrato. Alíquotas das reações foram analisadas em CLAE para tempos de 24 e 48h para ambas as reações com os diferentes agentes acilantes. As reações foram finalizadas com tempos de 24 ou 48h, a depender da enzima utilizada e doador vinilo. Depois de terminadas as reações, o material obtido foi lavado com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x3mL), o solvente seco com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e em seguida evaporado. Os resultados das análises obtidos encontram-se no capítulo de resultados e discussões.

### 5.15 Aumento da concentração das reações de acilação

Para as reações com aumento de concentração foram utilizadas as seguintes condições: 100mg do substrato cloranfenicol (0.3095mmol) e a correspondente enzima (CAL-B ou PSL-C I), em uma relação 1:1 em peso com respeito ao substrato, em solvente seco ( $\text{CH}_3\text{CN}$  ou 1,4-Dioxano, 2mL) e sob atmosfera de nitrogênio. Foi adicionado o correspondente éster vinílico (acetato, propanoato, crotonato, decanoato, laurato, palmitato e benzoato) numa quantidade de 5 equivalentes (1.5475mmol), com temperaturas de 20° ou 30° e rotação de 250 rpm. Alíquotas das reações foram analisadas por CLAE e a reação foi finalizada depois do completo consumo do material de partida. Em seguida o produto reacional juntamente com as enzimas foi filtrado e lavado com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x10mL), e o material obtido evaporado sob pressão reduzida. A mistura reacional foi purificada através de cromatografia utilizando sílica *flash* com misturas de hexano/acetato de etila em polaridades de acordo com os produtos. Estes por sua vez foram analisados e devidamente armazenados.

### 5.16 Reação de cloranfenicol com concentração de 0,25M

Em razão dos bons resultados apresentados com as esterificações de cloranfenicol com uma concentração de 0,15M, resolveu-se testar a atividade de CAL-B com um aumento de concentração de substrato, para produzir o palmitato de cloranfenicol. Neste procedimento utilizou-se 1mmol de cloranfenicol (323mg) e a enzima CAL-B (razão 1:1 em peso com relação ao substrato) como biocatalisador, em solvente acetonitrila seco (4mL) sob atmosfera de nitrogênio e o éster acilante palmitato de vinilo (5,0mmol; 1,42g). A reação foi agitada a uma rotação de 250 r.p.m. sob temperatura de 20°C. Alíquotas da reação foram regularmente analisadas por CLAE e a reação completa com consumo total do material de partida, após intervalo de 1 hora. Finalmente a enzima foi filtrada e lavada com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x8mL) e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto reacional foi purificado através de cromatografia do tipo *flash* usando sílica gel e a mistura hexano/acetato de etila (30%) como eluente levando ao correspondente éster.

### 5.17 Reciclagem enzimática

Observado os resultados com as conversões utilizando uma concentração de 0,15M, resolveu-se utilizar as mesmas condições reacionais para verificar a atividade

enzimática através de seu reciclo. Dessa maneira, utilizou-se 100mg de cloranfenicol (0,3095mmol), e CAL-B (100mg) em acetonitrila seca (2mL), sob atmosfera de nitrogênio e palmitato de vinilo (5 equivalentes, 1,5475mmol). A mistura reacional foi agitada a 250rpm e temperatura de 20°C, sendo finalizada após 3horas de reação. Após esse intervalo a enzima foi filtrada e lavada com acetonitrila (3x5mL) e em seguida seca sob vácuo. Essa mesma enzima foi utilizada por mais nove ciclos de 3 horas cada, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente não observando perda de atividade em nenhum deles. As alíquotas das reações foram analisadas em CLAE sob condições apropriadas.

### **5.18 Reações em escala de bancada**

Para obter derivados de cloranfenicol em escala de bancada, foram selecionados os seguintes agentes acilantes: acetato, propanoato, decanoato, laurato e palmitato de vinilo. As condições reacionais utilizaram 1g de cloranfenicol (3,094mmol), os respectivos doadores vinílicos (5 equivalentes, 15,4735mmol), a enzima CAL-B (relação 1:1 em peso com cloranfenicol), solvente acetonitrila (20,6mL) seco, sob atmosfera de nitrogênio, a uma temperatura de 20°C e uma agitação de 250 rpm. Os tempos de reação para todos os compostos foram de 3horas, exceto para a reação com laurato de vinilo, o qual foi de 4 horas. As enzimas foram filtradas e lavadas com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x25mL), o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e os produtos devidamente analisados através de CLAE e em seguida devidamente armazenados.

A faded background image of a man in 18th-century attire sitting at a desk with scientific instruments. The man is wearing a dark coat and a white cravat, looking towards the left. On the desk in front of him are various scientific instruments, including a large glass flask on a stand, a smaller glass, and some papers. The overall scene is dimly lit, giving it a historical and scholarly feel.

# *Conclusão*

*“Confia no Senhor, Ele te ajudará,  
endireita teus caminhos e espera nele”.*

*Eclo 2,5*

## 6 CONCLUSÃO

Transformações em moléculas orgânicas mediadas através de biocatálise já vêm sendo relatadas desde alguns anos na literatura. Nesse estudo foram inicialmente utilizadas diversas fotes vegetais como possíveis fontes de biocatalisadores. Esses vegetais foram selecionados por serem considerados importantes fontes protéicas, cujos índices de proteína foram determinados através de testes realizados em seus extratos aquosos pelos métodos de Lowry modificado por Hartree e Bradford. Ambos métodos se mostraram eficientes na determinação do índice protéico dos extratos utilizados. Em função dos resultados obtidos foram selecionadas então para serem utilizadas em algumas reações preliminares as espécies denominada de F-1 e F-2.

Algumas cetonas alifáticas e monoterpênicas, foram submetidas à biorredução, sendo obtidos resultados de conversão e excesso enantioméricos moderados, e configuração distinta para as espécies: F-1 levou ao álcool de configuração *S*, e F-2 ao álcool de configuração *R*. Os resultados mais expressivos foram obtidos quando se utilizou F-1, por isso, o estudo de biocatálise deu continuidade utilizando somente F-1 como fonte de biocatalisador. Foram realizadas diversas reações com acetofenona para otimizar valores de conversões e eantiosseletividades, sendo modificados parâmetros como: solvente do meio a ser utilizado, uso de co-solvente, percentual de co-solvente, quantidade de biocatalisador, temperatura, quantidade do substrato e tempo de reação. Depois de vários procedimentos realizados, estabeleceu-se então as seguintes condições para melhor desempenho das enzimas nas reações de biorredução: 1g de biocatalisador, 3mL de água com 3% de isopropanol, à 30°, com quantidade de 5mg do substrato e tempo de reação de 72 h, que levaram à excessos enantioméricos superiores à 90% do álcool de configuração *S*, e conversões em torno de 30%.

Foram utilizadas posteriormente cetonas aromáticas derivadas de acetofenona, com os seguintes grupos substituintes: metoxila, alquila, nitro, halogênios. Destes, os melhores resultados foram obtidos para os substratos halogenados e *m*-metoxi-acetofenona, todos com conversões de aproximadamente 80% e *ee* superiores a 99% para o isômero de configuração Prelog. Para os derivados alquilados não foram obtidas boas conversões e *ee* obtidos foram significativos. No caso das cetoonas com grupamento nitro, ocorreu também a redução desse grupo, em especial ao *o*-nitro-acetofenona, o qual levou a 86% do grupo amina.

Esses resultados de redução do grupamento nitro, levou à estudos de outro nitrocompostos como: nitrobenzeno e hidroxí-nitrobenzeno, onde verificou-se a pouca atividade das enzimas de F-1 em reduzir esse grupamento.



Também utilizou-se cetonas alifáticas, nitrilas, ésteres, e  $\beta$ -ceto-ésteres. Na grande maioria dos casos, obteve-se valores de conversão considerados significativos, e excelentes resultados de excesso eantiomérico. Em sua grande maioria os álcoois obtidos das reduções de cetonas, apresentaram-se quase que em sua totalidade enantiomericamente puro, de configuração *S*, sendo os melhores resultados obtidos para os  $\beta$ -ceto-ésteres.

O estudo de biorreduções com enzimas de *Vigna unguiculata*, permitiu obter os produtos das reações de cetonas praticamente enantiopuros em sua grande maioria, a variação de conversão deu-se de acordo com o tipo de substrato utilizado. Pode-se sugerir que esta espécie apresenta enzimas da classe das oxido-redutases e portanto, apresenta um potencial biocatalítico redutor para algumas classes de compostos como cetonas e grupo nitro.

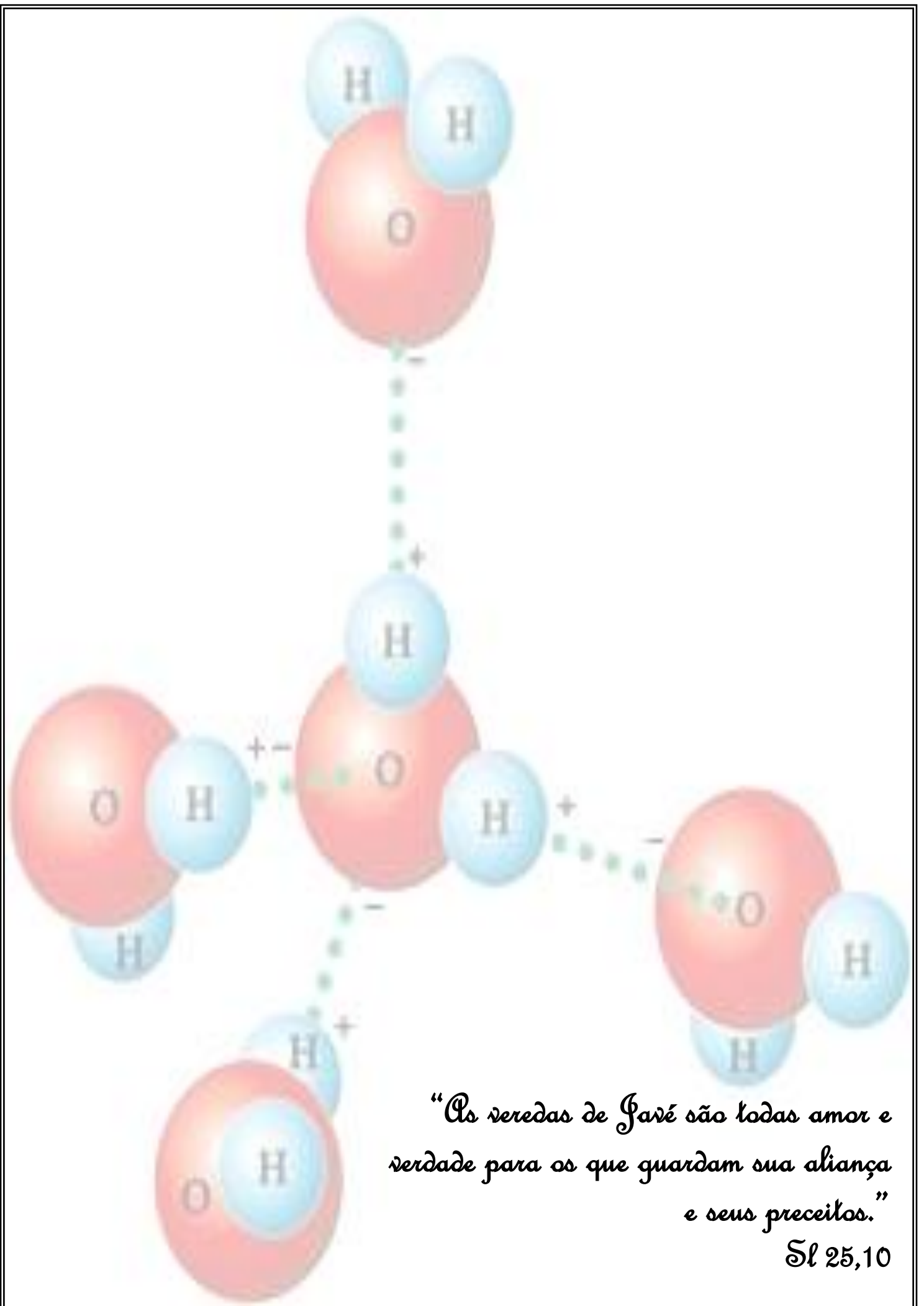
O estudo da atividade biocatalítica das lipases CAL-B, PSL-C(I) e PSL-C (Amano) em reações de acilação de cloranfenicol na obtenção de seus derivados acilados foi realizado com bastante êxito, pois estes foram obtidos com boas conversões e regiosseletividade. Assim, foram estabelecidas condições ideais para o preparo de derivados deste fármaco.

Estabeleceu-se para o uso de cada enzima, as condições ideais de reação, como temperatura e solvente. A enzima CAL-A teve seu uso descartado por apresentar baixas conversões nas reações, bem como pouca regiosseletividade. No caso da enzima CAL-B, as condições adequadas estabelecidas incluíram: temperatura de 20° e acetonitrila como solvente. Para as enzimas PSL-C (I) e Amano, foi conveniente trabalhar com temperatura de 30° e dioxano como solvente. Os tempos reacionais também foram avaliados e variaram de acordo com o agente acilante utilizado.

Foram utilizados agentes acilantes do tipo ésteres vinílicos, entre eles: acetato, propanoato, crotonato, decanoato, laurato, palmitato e benzoato. Destes, a grande maioria apresentou-se reativa com o uso da enzima, exceto os acilantes crotonato e benzoato que apresentaram baixa reatividade, pois suas conversões foram as mais baixas e os tempos reacionais mais elevados. Os demais acilantes utilizados demonstraram excelentes percentuais de conversão com todas as enzimas, especialmente com CAL-B.

Todos os resultados obtidos levaram a indicação da enzima CAL-B, pois em todos os casos, como a ideal para a biocatálise das reações de acilação do fármaco cloranfenicol, pois com ela foram obtidas as melhores conversões e os menores tempos reacionais. Estes derivados também foram obtidos em reações em maiores concentrações e em grande escala com o uso desta enzima, sendo geradas conversões excelentes para todas as reações efetuadas, o que torna possível sua aplicação em escala industrial. O estudo da reutilização de CAL-B,

foi bastante satisfatório, sendo efetuados 10 ciclos de reciclagem sem observar perda de sua atividade. Um estudo mais aprofundado foi realizado para a obtenção do pró-fármaco palmitato de cloranfenicol. Foram efetuadas reações em grande escala e à maiores concentrações, sendo obtidos nesses casos excelentes resultados.



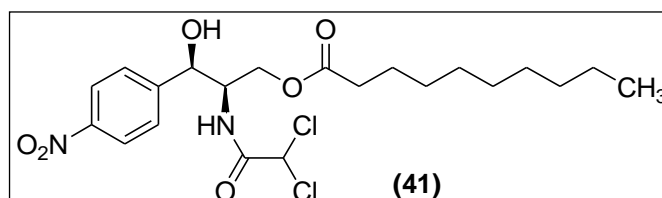
*“As veredas de Jaré são todas amor e verdade para os que guardam sua aliança e seus preceitos.”*

*Sl 25,10*

## 7 DADOS ESPECTROSCÓPICOS

### 7.1 Dados espectroscópicos de Decanoato de cloranfenicol

**Nomenclatura:** (2*R*,3*R*)-2-[(dichloroacetyl)amino]-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl) propyl decanoate [(2'*R*,3'*R*)-chloramphenicol 3'-decanoate, **41**]



**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.58;

**Pf**= 69-71 °C;

**IV (KBr):**  $\nu$  3403, 3059, 2927, 2856, 1735, 1690, 1607, 1523, 1466, 1349, 1266, 1165, 1109, 1073  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):**  $\delta$  0,85 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,4 Hz, 3H), 1,25 (s, 12H), 1,59 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,4 Hz, 2H), 2,34 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz, 2H), 4,17-4,23 (m, 1H), 4,36-4,48 (m, 2H), 5,06 (s, 1H), 5,77 (s, 1H), 6,93 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz, 1H), 7,54 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,5 Hz, 2H), 8,18 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9,0 Hz, 2H);

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):**  $\delta$  14,0 (CH<sub>3</sub>), 22,6 (CH<sub>2</sub>), 24,7 (CH<sub>2</sub>), 29,0-29,3 (4CH<sub>2</sub>), 31,7 (CH<sub>2</sub>), 34,0 (CH<sub>2</sub>), 54,1 (CH), 62,3 (CH<sub>2</sub>), 65,9 (CH), 70,5 (CH), 123,6 (2CH), 126,7 (2CH), 147,1 (C), 147,5 (C), 164,3 (C), 174,4 (C);

**EM (EI<sup>+</sup>, m/z):** 305 [M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl-C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 23%], 307 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl-C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 13%]; 459 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 25%], 461 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 14%], 477 [M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl<sup>+</sup>, 100%], 479 [M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl<sup>+</sup>, 43%];

**EMAR (EI<sup>+</sup>)** calculado para C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (M<sup>+</sup>): 476.1481; encontrado: 476.1495  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +3.99 (c = 1,4, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) for >99% ee.

#### Separação em CLAE para **41**:

Fluxo: 1.0 mL/min

Eluente: 15% 2-propanol/hexano

Coluna quiral: OD

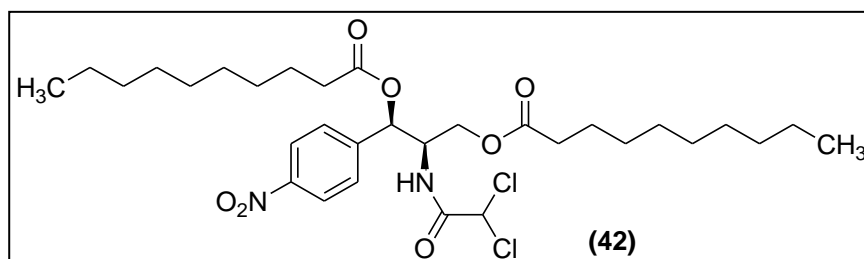
Temperatura: 20 °C

Tempo de retenção para cloranfenicol (**40**): 19.7 min

Tempo de retenção para decanoato de cloranfenicol (**41**): 9.8 min

## 7.2 Dados espectroscópicos de Di-decanoato de cloranfenicol

**Nomenclatura:** (1*R*,2*R*)-3-(decanoyloxy)-2-[(dichloroacetyl)amino]-1-(4-nitrophenyl) propyl decanoate [(2'*R*,3'*R*)-chloramphenicol 1',3'-didecanoate, **42**]



**R<sub>f</sub>** (30% AcOEt/hexano): 0,60;

**IV (NaCl):**  $\nu$  3317, 2926, 2855, 1747, 1695, 1609, 1526, 1464, 1349, 1237, 1155, 1109, 1066  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):**  $\delta$  0,85 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5,9 Hz, 6H), 1,26 (s, 24H), 1,58-1,65 (m, 4H), 2,31-2,45 (m, 4H), 4,01-4,21 (m, 2H), 4,56-4,65 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,05 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5,5 Hz 1H), 6,77 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9,4 Hz, 1H), 7,50 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, 2H), 8,22 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, 2H);

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):**  $\delta$  14,0 (2CH<sub>3</sub>), 22,6 (2CH<sub>2</sub>), 24,7 (2CH<sub>2</sub>), 24,8-29,4 (8CH<sub>2</sub>), 31,8 (2CH<sub>2</sub>), 33,9 (2CH<sub>2</sub>), 52,8 (CH), 61,9 (CH<sub>2</sub>), 70,0 (CH), 72,4 (CH), 124,0 (2CH), 127,4 (2CH), 143,5 (C), 148,0 (C), 164,0 (C), 172,4 (C), 173,3 (C);

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calculado para C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> [(M<sup>+</sup>Na)<sup>+</sup>]: 653.2750; encontrado: 653.2731;

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -6.19 (c = 1,4, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);

### Separação em CLAE **42**:

Fluxo: 1.0 mL/min

Eluente: 15% 2-propanol/hexano

Coluna quiral: OD

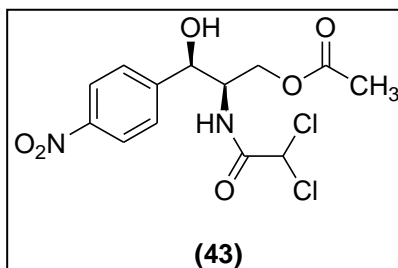
Temperatura: 20 °C

Tempo de retenção para cloranfenicol (**40**): 19.7 min

Tempo de retenção para di-decanoato de cloranfenicol (**42**): 6.2 min

### 7.3 Dados espectroscópicos de Acetato de cloranfenicol

**Nomenclatura:** (2*R*,3*R*)-2-[(dichloroacetyl)amino]-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl)propyl acetate [(2'*R*,3'*R*)-chloramphenicol 3'-acetate, **43**]



**R<sub>f</sub>** (30% AcOEt/hexano): 0,26,

**IV (NaCl):**  $\nu$  3399, 2962, 2856, 1740, 1686, 1607, 1522, 1463, 1350, 1237, 1108, 1072, 1046  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):**  $\delta$  2,1 (s, 3H), 4,17-4,25 (m, 1H), 4,34-4,44 (m, 2H), 5,08 (s, 1H), 5,77 (s, 1H), 6,96 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, 1H), 7,54 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, 2H), 8,16 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9,0 Hz, 2H);

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):**  $\delta$  20,8 (CH<sub>3</sub>), 54,1 (CH), 62,6 (CH<sub>2</sub>), 66,0 (CH), 70,6 (CH), 123,7 (2CH), 126,7 (2CH), 147,1 (C), 147,6 (C), 164,4 (C), 171,5 (C);

**MS (EI<sup>+</sup>, m/z):** 305 [M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 25%], 307 [M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 14%]; 347 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 30%], 349 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 19%], 365 [M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl]<sup>+</sup>, 100%], 367 [M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl]<sup>+</sup>, 67%];

**HRMS (EI)** calculado para C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (M<sup>+</sup>): 364.0229; encontrado: 364.0223;  $[\alpha]_D^{20} = -4,88$  (c = 1,3, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) for >99% *ee*.

#### Separação em CLAE:

Fluxo: 0.8 mL/min

Eluente: 20% 2-propanol/hexano

Coluna quiral: AS

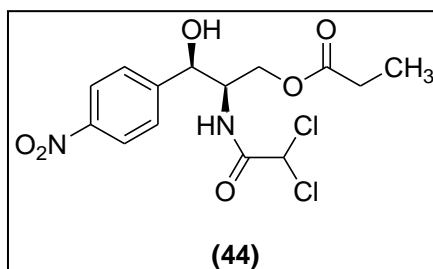
Temperatura: 40 °C

Tempo de retenção para cloranfenicol (**40**): 8.3 min

Tempo de retenção para acetato de cloranfenicol (**43**): 12.0 min

#### 7.4 Dados espectroscópicos de Propanoato de cloranfenicol

**Nomenclatura:** (2*R*,3*R*)-2-[(dichloroacetyl)amino]-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl)propyl propionate [(2'*R*,3'*R*)-chloramphenicol 3'-propanoate,]



**R<sub>f</sub>** (50% AcOEt/hexano): 0,36

**Pf**= 99-101 °C;

**IV (KBr):**  $\nu$  3402, 3301, 2995, 2945, 1696, 1673, 1608, 1519, 1461, 1349, 1266, 1076, 1024  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):**  $\delta$  1,13 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz, 3H), 2,36-2,44 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz, 2H), 4,17-4,26 (m, 1H), 4,36-4,48 (m, 2H), 5,77 (s, 1H), 6,91 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,3 Hz, 1H), 7,54 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,4 Hz, 2H), 8,18 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, 2H);

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):**  $\delta$  8,9 (CH<sub>3</sub>), 27,4 (CH<sub>2</sub>), 54,1 (CH), 62,4 (CH<sub>2</sub>), 65,9 (CH), 70,6 (CH), 123,6 (2CH), 126,7 (2CH), 147,1 (C), 147,5 (C), 164,3 (C), 174,9 (C);

**MS (EI<sup>+</sup>, m/z):** 305 [M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 60%], 307 [M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 46%]; 361 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>ClH<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 100%], 363 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>ClH<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 66%], 379 [M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl]<sup>+</sup>, 45%], 381 [M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl]<sup>+</sup>, 27%], 383 [M<sup>37</sup>Cl<sup>37</sup>Cl]<sup>+</sup>, 36%];

**HRMS (EI)** calculado para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (M<sup>+</sup>): 378.0385; encontrado 378.0421;

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -2,59 (c = 1,3, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

#### **Separação em CLAE:**

Fluxo: 0.8 mL/min

Eluente: 20% 2-propanol/hexano

Coluna quiral: AS

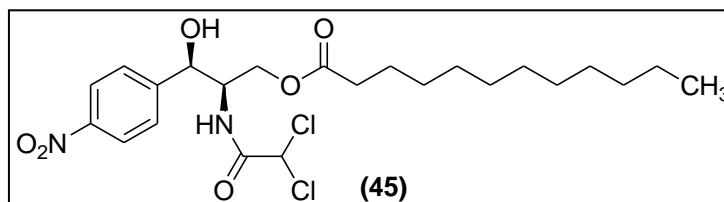
Temperatura: 40 °C

Tempo de retenção para cloranfenicol (**40**): 8.3 min

Tempo de retenção para propanoato de cloranfenicol (**44**): 10.8 min

## 7.5 Dados espectroscópicos de Laurato de cloranfenicol

**Nomenclatura:** (2*R*,3*R*)-2-[(dichloroacetyl)amino]-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl) propyl laurate [(2'*R*,3'*R*)-chloramphenicol 3'-laurate]



**R<sub>f</sub>** (30% AcOEt/hexano): 0,31;

**Pf**= 74-76 °C;

**IV (KBr):**  $\nu$  3406, 3057, 2927, 2855, 1702, 1608, 1524, 1466, 1349, 1265, 1074  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):**  $\delta$  0,85 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,8 Hz, 3H), 1,25 (s, 16H), 1,60 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, 2H), 2,33 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,7 Hz, 2H), 4,17-4,23 (m, 1H), 4,35-4,48 (m, 2H), 5,06 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2,0 Hz, 1H), 5,77 (s, 1H), 6,90 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,5 Hz, 1H), 7,54 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, 2H), 8,17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9,0 Hz, 2H);

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):**  $\delta$  14,0 (CH<sub>3</sub>), 22,6 (CH<sub>2</sub>), 24,7 (CH<sub>2</sub>), 28,9-29,5 (6CH<sub>2</sub>), 31,8 (CH<sub>2</sub>), 34,0 (CH<sub>2</sub>), 54,1 (CH), 62,3 (CH<sub>2</sub>), 65,9 (CH), 70,6 (CH), 123,6 (2CH), 126,7 (2CH), 147,1 (C), 147,5 (C), 164,3 (C), 174,3 (C);

**MS-MS (EI<sup>+</sup>, m/z):** 305 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 11%], 307 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl<sup>37</sup>C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 7%]; 487 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 20%], 489 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl<sup>37</sup>H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 13%], 505 [M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>, 100%], 507 [M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl<sup>37</sup>, 52%];

**HRMS (EI<sup>+</sup>)** calculado para C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (M<sup>+</sup>): 504.1794; encontrado: 504.1792;

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +2,77 (c = 1,4, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**Separação em CLAE para 45:**

Fluxo: 0.8 mL/min

Eluente: 20% 2-propanol/hexano

Coluna quiral: AS

Temperatura: 40 °C

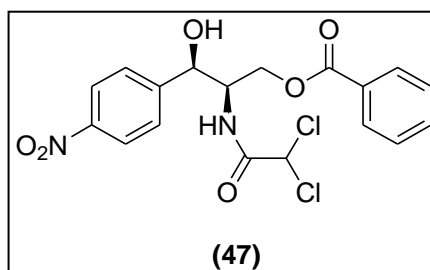
Tempo de retenção para cloranfenicol (40): 8.3 min

Tempo de retenção para Laurato de cloranfenicol (45): 6.3 min



## 7.6 Dados espectroscópicos de Benzoato de cloranfenicol

**Nomenclatura:** (2*R*,3*R*)-2-[(dichloroacetyl)amino]-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl)propyl benzoate [(2'*R*,3'*R*)-chloramphenicol 3'-benzoate,]



**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0,42;

**Pf**= 195-196 °C (EtOAc/hexane);

**IV (KBr):**  $\nu$  3330, 3064, 2960, 1726, 1603, 1584, 1526, 1494, 1452, 1349, 1267, 1178, 1095, 1070, 1027  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-<sup>1</sup>H [(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 300.13 MHz]:**  $\delta$  4,63-4,70 (m, 1H), 4,76-4,86 (m, 2H), 5,55 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2,2Hz, 1H), 6,51 (s, 1H), 7,61-7,69 (m, 3H), 7,74-7,78 (m, 1H), 7,92 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,4 Hz, 2H), 8,16 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,4 Hz, 2H), 8,34 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, 2H);

**RMN-<sup>13</sup>C [(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 300.13 MHz]:**  $\delta$  55,3 (CH), 64,9 (CH<sub>2</sub>), 67,4 (CH), 71,5 (CH), 124,0 (2CH), 128,4 (2CH), 129,4 (2CH), 130,4 (2CH), 130,9 (C), 134,1 (CH), 148,3 (C), 150,6 (C), 164,9 (C), 166,6 (C);

**MS (EI<sup>+</sup>, m/z):** 305 [M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 27%], 307 [M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 17%]; 409 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 26%], 411 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 18%], 427 [M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl]<sup>+</sup>, 100%], 428 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl+H)<sup>+</sup>, 22%], 429 [M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl]<sup>+</sup>, 67%], 430 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl+H)<sup>+</sup>, 22%];

**HRMS (EI)** calculada para C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (M<sup>+</sup>): 426.0385; encontrado: 426.0427;

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +17,93 (c = 1,4, acetona)

### Condições de separação em CLAE:

Fluxo: 0.8 mL/min

Eluente: 20% 2-propanol/hexano

Coluna quiral: AS

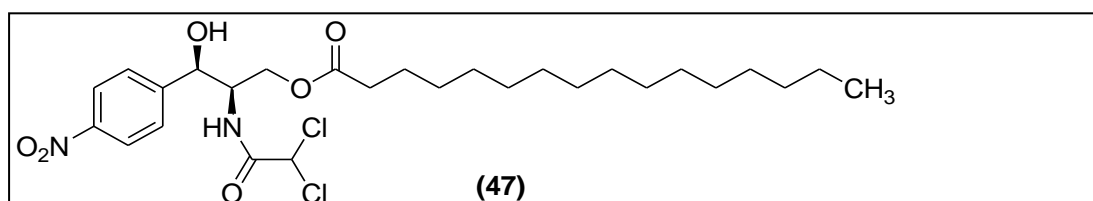
Temperatura: 40 °C

Tempo de retenção para cloranfenicol (40): 8.3 min

Tempo de retenção para benzoato de cloranfenicol (46): 13.7 min

## 7.7 Dados espectroscópicos de Palmitato de cloranfenicol

**Nomenclatura:** (2*R*,3*R*)-2-[(dichloroacetyl)amino]-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl)propyl palmitate [(2'*R*,3'*R*)-chloramphenicol 3'-palmitate]



**R<sub>f</sub>** (30% AcOEt/hexano): 0,43;

**Ponto de fusão** = 86-88 °C;

**IV (KBr):**  $\nu$  3483, 2917, 2850, 1735, 1678, 1519, 1468, 1351, 1171, 1109, 1070  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300,13 MHz):**  $\delta$  0,85 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,4$  Hz, 3H), 1,25 (s, 24H), 1,60 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz, 2H), 2,34 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7,6$  Hz, 2H), 4,18-4,23 (m, 1H), 4,36-4,49 (m, 2H), 5,06 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 1,5$  Hz, 1H), 5,78 (s, 1H), 6,91 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,5$  Hz, 1H), 7,54 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,6$  Hz, 2H), 8,18 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,8$  Hz, 2H);

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz):**  $\delta$  14,1 (CH<sub>3</sub>), 22,6 (CH<sub>2</sub>), 24,7 (CH<sub>2</sub>), 24,8 (CH<sub>2</sub>), 29,1-29,6 (8CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 33,8 (CH<sub>2</sub>), 34,1 (CH<sub>2</sub>), 54,1 (CH), 62,3 (CH<sub>2</sub>), 65,9 (CH), 70,6 (CH), 123,6 (2CH), 126,7 (2CH), 147,1 (C), 147,6 (C), 164,4 (C), 174,4 (C).

**MS (ESI<sup>+</sup>, m/z):** 582 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl<sup>+</sup>Na)<sup>+</sup>, 100%], 583 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>35</sup>Cl<sup>+</sup>Na+H)<sup>+</sup>, 28%], 584 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl<sup>+</sup>Na)<sup>+</sup>, 70%], 585 [(M<sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl<sup>+</sup>Na+H)<sup>+</sup>, 22%], 586 [(M<sup>37</sup>Cl<sup>37</sup>Cl<sup>+</sup>Na)<sup>+</sup>, 10%], 587 [(M<sup>37</sup>Cl<sup>37</sup>Cl<sup>+</sup>Na+H)<sup>+</sup>, 4%];

**HRMS (EI<sup>+</sup>)** calculado para C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (M<sup>+</sup>): 560.2420; encontrado: 560.2438

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +4.22 (c = 1,5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

### **Separação CLAE para 47:**

Fluxo: 0.8 mL/min

Eluente: 20% 2-propanol/hexano

Coluna quiral: OD

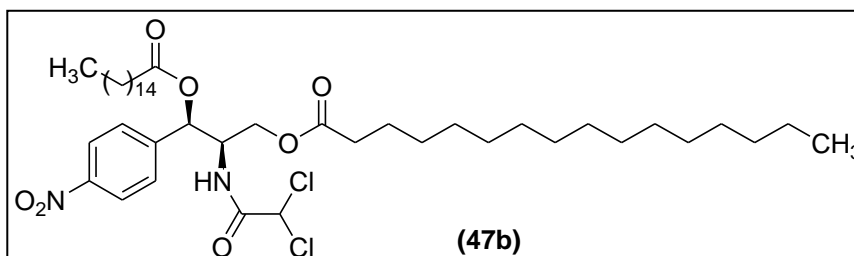
Temperatura: 30 °C

Tempo de retenção para cloranfenicol (**40**): 12.1 min

Tempo de retenção para palmitato de cloranfenicol (**47**): 7.2 min

## 7.8 Dados espectroscópicos de Di-palmitato de cloranfenicol

**Nomeclatura:** (1*R*,2*R*)-2-[(dichloroacetyl)amino]-1-(4-nitrophenyl)-3-(palmitoyloxy) propyl palmitate [(2'*R*,3'*R*)-chloramphenicol 1',3'-dipalmitate]



$R_f$  (60% AcOEt/hexano): 0,92;

Pf= 48-50 °C;

IV(NaCl): 3054, 2927, 2854, 2305, 1744, 1703, 1527, 1421, 1350, 1265, 1156, 1113  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300,13 MHz):**  $\delta$  0,88 (t, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 6,7 Hz, 6H), 1,18-1,36 (s, 48H), 1,56-1,68 (m, 4H), 2,34 (t, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 7,4 Hz, 2H), 2,43 (t, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 7,4 Hz, 2H), 4,05 (dd, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}}$  = 11,6 <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 5,9 Hz, 1H), 4,19 (dd, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}}$  = 11,6 <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 5,1 Hz, 1H), 4,56-4,65 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,07 (d, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 5,7 Hz, 1H), 6,76 (d, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 9,4 Hz, 1H), 7,51 (d, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 8,5 Hz, 2H), 8,23 (d, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 8,5 Hz, 2H);

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz):** 14,3 (2CH<sub>3</sub>), 22,9 (2CH<sub>2</sub>), 24,9 (2CH<sub>2</sub>), 29,2-29,6 (20CH<sub>2</sub>), 32,1 (2CH<sub>2</sub>), 34,3 (2CH<sub>2</sub>), 53,1 (CH), 62,2 (CH<sub>2</sub>), 66,2 (CH), 72,7 (CH), 124,2 (2CH), 127,7 (2CH), 141,2 (C), 142,8 (C), 164,2 (C), 172,7 (C), 173,5 (C);

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calculado para C<sub>43</sub>H<sub>72</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> [(M<sup>+</sup>Na)<sup>+</sup>]: 421.4629; encontrado: 421.4586;

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1,61$  (1,0, CHCl<sub>3</sub>)

### Separação em CLAE para 47b:

Fluxo: 0.8 mL/min


Eluente: 20% 2-propanol/hexano

Coluna quiral: AS

Temperatura: 40 °C

Tempo de retenção para cloramfenicol (**40**): 8.3 min

Tempo de retenção para di-palmitato de cloranfenicol (**47b**): 6.7 min



# *Referências Bibliográficas*

*“Portanto, qualquer que me confessar  
diante dos homens, eu o confessarei diante  
de meu Pai que está nos céus.”*

*Mt 10,32*

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGKAWIDJAJA, C.; KANAYA, S. Family I.3 lipase: bacterial lipase secreted by the type I secretion system. **Celular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 2804- 2817, 2006.

ACKERS, M.L.; PUHR N. D.; TAUXE, R.V.; MINTZ, E.D. Laboratory-based surveillance of *Salmonella* serotype Typhi infections in the United States: antimicrobial resistance on the rise. **Journal of the American Medical Association**, v. 283, n. 20, p. 2668-2673, 2002.

ALMEIDA-GONZÁLEZ, L.; FRANCO-PAREDES, C.; PÉREZ, L. F.; SANTOS-PRECIADO; J. I. Enfermedad por meningococo, *Neisseria meningitidis*: epidemiological, clinical, and preventive perspectivas. **Salud Pública de México**, v. 46, n. 5, p. 438-450, 2004.

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

ARAVIDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHGARI, T. Lipase application in the food industry. **Indian Journal Biotechnology**, n. 6, p. 141-158, 2007.

ARMESTO, N.; FERRERO, M.; FERNÁNDEZ, S.; GOTOR, V. Novel Enzymatic Synthesis of 4-O-Cinnamoyl Quinic and Shikimic Acid Derivatives. **Journal of Organic Chemistry**, n. 68, p. 5784-5787, 2003.

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

AVELLA, A.C.; GOMER, T., DONATO, Ph. De. The pitfalls of protein quantification in wastewater treatment studies. **Science of the Total Environment**, n. 408, p. 4906–4909, 2010.

BHASKAR, G.; KUMAR, V. S.; RAO, B. V. A short stereoselective synthesis of (-)-chloramphenicol and (+)-thiamphenicol. **Tetrahedron Asymmetry**, n.15, p. 1279-1283, 2004.

BLANCHARD, N; WEGHE, P. *Daucus carota* L. mediated bioreduction of prochiral ketones. **Organic & Biomolecular Chemistry**, n. 4, p. 2348, 2006.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBE, B.R.L.; **Biocatalysis - Fundamentals and applications**, Wiley, 2004.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia – Produção, aplicações e mercado**. Ed. Interciência. c. 15, p. 359. 2008.

BORUWA, J.; BORAH, J. C.; GOGOI, S.; BARUA, N. C. A short asymmetric total synthesis of chloramphenicol using a selectively protected 1,2-diol. **Tetrahedron Letters**, n. 46, p. 1743-1746, 2005.

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**, n. 72, p. 248, 1976.

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

BRUNO, L. M.; DE LIMA FILHO, J. L.; MELO, E. H. M.; DE CASTRO, H. Ester synthesis by *Mucor miehei*. Lipase immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol particles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 113, p. 189-200, 2004.

BUGG, T. D. H. **Introduction to enzyme and coenzyme chemistry**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 292 p.

CHEN, M.; HOWE, D.; LEDUC, B.; KERR, S.; WILLIAMS, D. A. Identification and characterization of two chloramphenicol glucuronides from the in vitro glucuronidation of chloramphenicol in human liver microsomes. **Xenobiótica**, n. 9, p. 954-971, 2007.

CHIN, C. M.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, n. 22, p. 1, 1999.

CHIN, C. M.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F., GUIDO, R. V. C., NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E. I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, n. 2, p. 155-180, 2005.

COMASSETO, J. V.; OMORI, A. T.; PORTO, A. L. M.; ANDRADE, L. H. Preparation of chiral organochalcogeno- $\alpha$ -methylbenzyl alcohols via biocatalysis. The role of *Daucus carota* root. **Tetrahedron Letters**, n. 45, p. 473-476, 2004.

COSTA, V.E.U.; AMORIM, H.L.N.; O emprego de lípases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, n. 22, p. 6, 1999.

COUTURIES, L.; TAUPIN, D.; YVERGNAUX, F. Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various amino alcohols with fatty acids. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 56, p. 29-33, 2009.

DAUGS, E. D. The preparation and isolation of chloramphenicol palmitate in toluene. **Organic process research & development**, n. 4, p. 301-304, 2000.

DE CONTI, R.; RODRIGUES, J. A.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: avanços recentes. **Química nova**, n. 24, p. 672, 2001.

DEL FIOLE, F. S.; AVALLONE, A. M. Uso de cloranfenicol na gestação. **Revista Eletrônica de Farmácia**, n. 1, p. 31-37, 2005.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 19, p. 3, 1999.

EL-SHAFIE, S. M. M. Chloramphenicol palmitate. **Chemical Age of India**, n. 8, p. 737, 1979.

EL-WAHED, M. G. A.; REFAT, M. S.; EL-MEGHARBEL, S. M. Spectroscopic studies on the complexation of some transition metals with Chloramphenicol drug. **Journal of Molecular Structure**, n. 892, p. 402-413, 2008.

EMBRAPA MEIO-NORTE. **Cultivo de feijão caupi. Jul/2003**. Disponível em: <[http://www.cpmn.embrapa.br/pesquisa/graos/ FeijaoCaupi/referencias.htm](http://www.cpmn.embrapa.br/pesquisa/graos/FeijaoCaupi/referencias.htm)>. Acesso em: fev. 2008.

FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**; 4. ed. Berlin: Springer; 2000.

FERRAZ, H. M. C.; BIANCO, G. G.; BOMBONATO, F. I.; ANDRADE, L. H. PORTO, A. L. M. Bioreduction of substituted  $\alpha$ -tetralones promoted by *Daucus carota* root. **Química Nova**, n. 31, 813-817, 2008.

FILHO, R. R. G.; TAHIN, J. T. Respostas fisiológicas de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*, L.) eretos e decumbentes a diferentes níveis de irrigação. **Engenharia na Agricultura**, n. 10, p. 56-60, 2002.

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

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 28, p. 471-477, 2008.

FUREBY, A. M.; LI, T.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 20, p. 198-206, 1997.

GANESH, A.; LIN, J. Comparisons of protein extraction procedures and quantification methods for the proteomic analysis of Gram-positive *Paenibacillus sp.* strain D9. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 27, p. 1669-1678, 2011.

GARCÍA, J.; FERNÁNDEZ, S.; FERRERO, M.; SANGHVI, Y.S.; GOTOR, V. Building Blocks for the Solution Phase Synthesis of Oligonucleotides : Regioselective Hydrolysis of 3',5'-Di-O-levulinyl nucleosides Using an Enzymatic Approach. **Journal of Organic Chemistry**, n. 13, p. 4513-4519, 2002.

GEORGE, S.; NARINA, S. V.; SUDALAI, A. A short enantioselective synthesis of (-)-chloramphenicol and (+)-thiamphenicol using tetraered aminohydroxylation. **Tetrahedron**, n. 62, p. 10202-10207, 2006.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; Application of lipases in kinetic resolution of racemates. **Chirality**, n. 17, p. 1-15, 2005.

GILHAM, D.; LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity *in vitro*. **Methods**, n. 36, p. 139-147, 2005.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C. C.; SINGH, A.; WARD, O. P.; NARASU, M. L.; Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects, **Biotechnology Advances**, 19, 175, 2001.

GOLDBERG, K.; SCHROER, K.; LUTZ, S.; LIESE, A. Biocatalytic ketone reduction – a powerful tool for the production of chiral alcohols – part I: process with isolated enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 76, p. 237-248; 2007.

GONZÁLEZ-SABÍN, J.; MORÍS-VARAS, F.; PEÑA, C.; REBOLLEDO, F.; GOTOR, V. Highly efficient chemoenzymatic syntheses of trans-2-aminocyclopentanol derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 59, p. 111–115, 2009.

GOTO, M.; GOTO, G.; KAMIYA, N.; NAKASHIO, F. Enzymatic interesterification of triglyceride with surfactant-coated lipase in organic media. **Biotechnology Bioengineering**, n. 45, p. 27-32, 1995.

GOTOR, V.; ALFONSA, I. GARCÍA-URDIALES E. **Asymmetric Organic Synthesis with Enzyme**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.

GOTOR, V.; Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals. **Organic Process Research Development**, n. 6, p. 420-426, 2002.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V., BRIEVA, R.,; GOTOR, V. Lipases: useful biocatalysis for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 40, p. 111-120, 2006a.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. *Candida antarctica* lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compound. **Advanced Synthesis & Catalysis**. n. 348, 7-8, p. 797-812, 2006b.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Enzymatic aminolysis and ammonolysis process in the preparation of chiral nitrogenated compounds. **Current Organic Chemistry**, n.10, p. 1125-1143, 2006c.



GUPTA, R.; RATHI, P.; BRADDOO, S. Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 43, p. 27-32, 2003.

HABERLAND, J.; HUMMEL, W.; DAUBMANN, T.; LIESE, A. New continuous production process for enantiopure (2*R*, 5*R*)-hexane-diol. **Organic Process Research & Development**, n. 6, p. 458-462; 2002.

HAJRA, S.; KARMAKAR, A.; MAJI, T.; MEDDA, A. K. Stereoselective syntheses of (L)-chloramphenicol and (D)-thiamphenicol. **Tetrahedron**, n. 62, p. 8959–8965, 2006.

HAN, S. Q.; OUYANG, P. K.; WEI, P.; HU, Y.; Enzymatic synthesis of (R)-cyanohydrins by a novel (R)-oxynitrilase from *Vicia sativa L.*; **Biotechnology Letters**, n. 28, p. 1909, 2006.

HANSON, J.R.; **An Introduction in Biotransformations in Organic Chemistry**. New York: Oxford University Press; 1997.

HARTREE, E.F., Determination of Protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, n. 48, p. 422, 1972.

HE, P.; GREENWAY, G.; HASWELL, S. J. Development of a monolith based immobilized lipase micro-reactor for biocatalytic reactions in a biphasic mobile system. **Process Biochemistry**, n. 45, p. 593-597, 2010.

HERNANDEZ, M.; MEJIA, G. I.; TRUJILLO, H.; ROBLEDO, J. Evidencia in vitro de la utilidad de cloranfenicol y rifampicina para el tratamiento de infecciones sistémicas y meningitis causadas por *Streptococcus pneumoniae* aislados de niños menores de 5 Años en Colombia. **Biomédica (Bogotá)**, n. 4, p. 456-461, 2003.

HILL, E.M.; BROERING, J. M.; HALLET, J. P.; BOMMARIUS, A. S.; LIOTTA, C. L.; ECKERT, C. A.; Coupling chiral homogeneous biocatalytic reactions with benign heterogeneous separation. **Green chemistry**, n. 9, p. 889-893, 2007.

HIRATA, T.; LEE, Y. S.; SUGA, T. The stereospecific hydroxylation of endocyclic ethylenic linkage in the biotransformation of  $\alpha$ -terpinyl acetate with cultured suspension cells of *Nicotiana tabacum*. **Chemical Letters**, n. 5, p. 671-674, 1982.

HIRINCHSEN, S. L.; FREIRE, L.; MOURA, L.; JUCÁ, M. B.; SILVA, P. F. S.; PINHEIRO, M. R.; MOURA, J. F. P. Brucelose: relato de caso. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, n. 2, p. 148-152, 2002.

HUDLICKY, T.; REED, J.W.; Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. **Chemical Society Reviews**, n. 38, p. 3117-3132, 2009.

ITOH, K.; NAKAMURA, K.; MURAKAMI, M. SATOH, H.; AOYAMA, T.; KITANAKA, S.; SAKAMAKI, H.; TAKIDO, T. Biotransformation of estragole by plant cultured cells of *Caragana chamlagu*. **Plant Biotechnology**, n. 28, p. 345, 2011.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications as lipases. **Annual Review of Microbiology**, n. 53, p. 315-351, 1999.

KARADZIC, I.; MASUI, A.; ZIKOVIC, L. I.; FUJIWARA, N. Purification and caaracterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aureginosa* isolated from prutid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. **Journal of Bioscience Bioengineering**., n. 102, p. 82-89, 2006.

KIM, G. S.; PARK, S. H.; CHANG, Y. J.; LIM, Y. H.; KIM, S. U. Transformation of menthane monoterpenes by *Mentha piperita* cell culture. **Biotechnology Letters**, n. 24, p. 1553-1556, 2002.

KONDO, Y.; SHIMODA, K.; MIYAHARA, K.; HAMADA, H.; HAMADA, H. Regioselective hydroxylation, reducation and glycosylation of diphenyl compounds by cultured plants cells of *Eucalyptus perriniana*. **Plant Biotechnology**, n. 23, p. 291-296, 2006.

KRISHNA, S. H.; PERSSON, M.; BORNSCHEUER, U.T. Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida Antarctica*. **Tetrahedron: Asymmetry**, n. 13, p. 2693–2696, 2002.

LANG, D., HOFMANN, B., HAALCK, L., HECHT, H., SPENER, F.; SCHMID, D.R., SCHOMBURG, D., Crystal Structure of a Bacterial Lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 Refined at 1.6 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, n. 259, p. 4, 1996.

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

LEVY, L. M.; DEHLI, J.R.; GOTOR, V. Lipase-catalysed resolution of cyclic cis- and trans--hydroxy esters. **Tetrahedron: Asymmetry**. n. 14, p. 2053–2058, 2003.

LILJEBLAD, A.; KALLIO, P.; VAINIO, M.; NIEMI, J.; KANERVA, L. T. Formation and hydrolysis of amide bonds by lipase A from *Candida antarctica*: exceptional features. **Organic & Biomolecular Chemistry**, n. 8, p. 886–895, 2010.

LILJEBLAD, A.; KIVINIEMI, A.; KANERVA, L.T. Aldehyde-based racemization in the dynamic kinetic resolution of N-heterocyclic a-amino esters using *Candida antarctica* lipase A. **Tetrahedron**, n. 60, p. 671–677, 2004.

LIMA, A.W.O., ANGNES, L.; Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em Química Analítica, **Química Nova**, n. 2, p. 229-245, 1999.

LINDMARK-HENRIKSSON, M.; ISAKSSON, D.; VANEK, T.; VALTEROVÁ, I.; HOGBERG, H. E.; SJODIN, K. Trasnformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture. **Journal of Biotechnology**, n. 107, p. 173-184, 2004.

LUCARINI, A.C.; KILIKIAN, B.V.; Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. **Biotechnology Techniques**, n. 13, p. 149, 1999.

MACHADO, L. L.; MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; LEMOS, T. L. G.; FERNÁNDEZ, V. G.; GONZALO, G.; GOTOR, V. Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruit's barks of *Passiflora edulis*. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, n. 54, p. 130-133, 2008.

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**, n. 67, p. 1637-1643, 2006.

MARÍA, P. D.; CARBONI-OERLEMANS, C.; TUIN, B.; BARGEMAN, G.; VAN DER MEER, A.; VAN GEMERT, R. Biotechnological applications of *Candida* lipase A: state-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 37, p. 36-46, 2005.

MASSAFERA, G.; COSTA, T. M. B.; OLIVEIRA, J. E. D. Composição de ácidos graxos do óleo do mesocarpo e da semente de cultivares de abacate (*Persea americana*, MILL.) da região de Ribeirão Preto, SP. **Alimentos e Nutrição**, n. 2, p. 325-331, 2010.

MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, R. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, n. 19, p. 157-159, 2009.

MATSUO, K.; KAWABE, S.; TOKUDA, Y.; EGUCHI, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Asymmetric reduction of ketones with a germinated plant. **Tetrahedron Asymmetry**, n. 19, p. 157-159, 2008.

MECHI, R., CANIATTI-BRAZACA, S.G., ARTHUR, V.; Avaliação química, nutricional e fatores antinutricionais do feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 25, p. 109-114, 2005.

MESQUITA, F. R., CORRÊA, A. D., ABREU, C. M. P., LIMA, R. A. Z., ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e agrotecnologia**, n. 4, 1114-1121, 2007.

METZGER, U.; LANKES, U.; FISCHPERA, K.; FRIMMEL, F. H.; The concentration of polysaccharides and proteins in EPS of *Pseudomonas putida* and *Aureobasidium pullulans* as revealed by <sup>13</sup>C CPMAS NMR spectroscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 85, p. 197-206, 2009.

MIWA, A. C. P.; FALCO, P. B.; CALIJURI, M. C. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, n. 2, 236-242, 2008.

MONTERDE, M.I.; LOMBARD, M.; ARCHELAS, A.; CRONIN, A.; ARAND, M.; FURSTOSS, R.; Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent bihydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase, **Tetrahedron: Asymmetry**, n. 15, p. 2801, 2004.

MORRONE, R.; D'ANTONA, N.; LAMBUSTA, D.; NICOLOSI, G. Biocatalyzed irreversible esterification in the preparation of *S*-naproxen. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 65, p. 49–51, 2010.

MOUAD, A. M.; MARTINS, M. P.; DEBONSI, H. M.; OLIVEIRA, A. L. L.; FELICIO, R.; YOKOYA, N. S.; FUJII, M. T.; MENEZES, C. B. A.; GARBOGGINI, F. F. F.; PORTO, A. L. M. Biorreduction of acetophenone derivatives by red marine algae *Bostrychia radicans* and *B. tenella*, and marine bacteria associated. **Helvetica Chimica Acta**, n. 94, p. 1506-1514, 2011.

MURALIDHAR, R. V.; CHIRUMAMILLA, R. R.; MARCHANT, R.; RAMACHANDRAN, V. N.; WARD, O. P.; NIGAM, P. Understanding lipase stereoselectivity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n. 18, p. 81-97, 2002.

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

NEVES, E. L. T.; **Síntese e avaliação biológica de palmitato de dipirona**; Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, 2004.

NIDETZKY, B.; SCHWAB, H. Special issue: enzyme technology and biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, n. 129, p. 1-2, 2007.

OGER, C.; MARTON, Z.; BRINKMANN, Y.; BULTELI-PONCÉ, V.; DURAND, T.; GRABER, M.; GALANO, J. M. Lipase-Catalyzed Regioselective Monoacetylation of Unsymmetrical 1,5-Primary Diols. **Journal Organic Chemistry**, n. 75, p. 1892-1897, 2010.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M.; Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química nova**, n. 32, p. 742-756, 2009.

OTTOLINA, G.; CORREA, G.; RIVA, S. Synthesis of Ester derivatives of chloramfenicol by lipase-catalyzed transesterification in organic solvents. **Journal Organic Chemistry**, n. 55, p. 2366-2369, 1990.

PAQUES, F. W., MACEDO, G.A.; Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais. **Química Nova**, n. 29, p. 93-99, 2006.

PATIL, K. J.; CHOPDA, M. Z.; MAHAJAN, R. T. Lipase Biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, n. 4, p. 971-982, 2011.

PETERSON, G. L. Review of the Folin-phenol protein quantitation method of Lowry, rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, n. 100, p. 201-220, 1979.

PRADO, A.G.S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química nova**, n. 26, p. 738-744, 2003.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n. 52, p. 207-219, 2009.

REBSTOCK, M. C.; CROOKS Jr., H. M.; CONTROULIS, J.; BARTZ, Q. R. Chloramphenicol (Chloromycetin). **Journal of American Chemical Society**. n. 71, p. 2458-2462, 1949.

RÍOS-LOMBARDÍA, N.; BUSTO, E.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Synthesis of Optically Active Heterocyclic Compounds by Preparation of 1,3-Dinitro Derivatives and Enzymatic Enantioselective Desymmetrization of Prochiral Diamines. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 3, p. 484-493, 2010.

ROCHA, J.M.S.; GIL, M.H.; GARCIA, F.A.P.; Effects of additives on the activity of a covalently immobilised lipase in organic media. **Journal of Biotechnology**, n. 66, p. 1, 1998.

RODA, G.; RIVA, S.; DANIELI, B.; GRIENGL, H.; RINNER, U.; SCHMIDT, M.; ZABELINSCAJA, A.M.; Selectivity of the (S)-oxynitrilase from *Hevea brasiliensis* towards  $\alpha$ - and  $\beta$ -substituted aldehydes, **Tetrahedron**. n.15, p. 2979-2983, 2002.

RODRIGUEZ-MATA, M.; URDIALES, E. G.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Stereoselective Chemoenzymatic Preparation of  $\beta$ -Amino Esters: Molecular Modelling Considerations in Lipase-Mediated Processes and Application to the Synthesis of (S)-Dapoxetine. **Advanced Synthesis & Catalysis**, n. 352, p. 395 – 406, 2010.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, T.; FERNÁNDEZ, S.; MARTÍNEZ-MONTERO, S.; GONZÁLEZ-GARCIA, T.; SANGHVI, Y.S.; GOTOR, V.; FERRERO, M. Chemoenzymatic Synthesis of 3-O- Acetal-Protected 2-Deoxynucleosides as Building Blocks for Nucleic Acid Chemistry. **European Journal of Organic Chemistry**. p. 1736-1744, 2010.

RONNING, H. T.; EINARSEN, K., ASP, T. N. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 2, n.1118, p. 226-233, 2006.

SANDOVAL, C.; MÉNDEZ, J. M.; SÁNCHEZ-OBREGÓN, R.; ALPÍZAR, C. B.; BARRIOS, H. Reduction and cyclization in biotransformation of carbonyl compounds by cultured cells of *Taxus* species. **Biocatalysis and biotransformations**, n. 27, p. 36-44, 2009.

SAKAMAKI, H.; ITO, K.; CHAI, W.; HAYASHIDA, Y.; KITANAKA, S.; HORIUCHI, A. Biotransformation of ( $\pm$ )  $\alpha$ -ionone and  $\beta$ -ionone by cultures cells of *Caragana chamlagu*. **Journal Molecular Catalysis B: enzymatic**, n. 22, p. 177-181, 2004.

SANGEETHA, R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial lipases as potencial industrial biocatalyst: an overview. **Reserch Journal of Microbiology**, n. 6, p. 1-24, 2011.

SAXENA, R. K.; SHERAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiology Methods**, n. 52, p. 1-18, 2003.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FE MS Microbiology Reviews**, n. 5, p. 519–542, 2004.

SEEVARATNAM, R.; PATEL, B.P.; HAMADEH, M. J. Comparison of Total Protein Concentration in Skeletal Muscle as Measured by the Bradford and Lowry Assays. **Journal of Biochemistry**. n. 145, p. 791–797, 2009.

SHARMA, A.; BARDHAN, D.; PATEL, R. Optmization of phisical parameters for lipase production from *Arthrobacter sp* BGCC#490. **Indian Journal Biochemistry and Biophysics**, n. 46, p. 178-183, 2009.

SHAW, N. M.; ROBINS, K. T.; KIENER, A. Lonza: 20 years of biotransformations. **Advanced Synthesis and Catalysis**, n. 4, p. 425-435, 2003.

SHIMODA, K.; HARADA, T.; HAMADA, H.; NAKAJIMA, N.; HAMADA, H. Biotransformation of raspberry ketone and zingerone by cultured cells of *Phytolacca americana*. **Phytochemistry**, n. 68, p. 487-492, 2007.

SILVA, M.A.O.; ARRUDA, M.A.Z.; Mechanization of the Bradford reaction for the spectrophotometric determination of total proteins. **Analytical Biochemistry**, n. 351, p. 155-158, 2006.

SLADKOVA, S. V.; KHOLODKOVICH, S. V. Total Protein in Hemolymph of Crawfish *Pontastacus leptodactylus* as a Parameter of the Functional State of Animals and a Biomarker of Quality of Habitat. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, n. 2, p. 160 - 167, 2011.

SONTAKKE, C.V.; PATIL, S. P.; UNNY, V. K. P; SIVAPRASAD, N. Convenient synthesis of d-threo-[dichloroacetyl 1-<sup>14</sup>C] chloramphenicol. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, n. 48, p. 597-604, 2005.

STENZEL, M., GIRATA, A. K., PEREIRA, N. C., ZANIN, G. M., LIMA, O. C. M.; Influência do tamanho das partículas na solubilização enzimática da proteína do farelo de soja. **Acta Scientiarum Technology**, n. 2, p. 195-200, 2009.

SUGA, T.; LEE, Y. S.; HIRATA, T. The hydroxylation of  $\beta$ -terpineol and its acetate with the culture cells of *Nicotiana tabacum*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, n. 56, p. 784-787, 1983.

SWITALA, M.; HRYNYK, R.; SMUTKIEWICZ, A.; JAWORSKI, K.; PAWLOWSKI, P.; OKONIEWSKI, P.; GRABOWSKI, T.; DEBOWY, J. Pharmacokinetics of florfenicol, thiamphenicol, and chloramphenicol in turkeys. *Journal of veterinary. Pharmacology & Therapeutics*. v. 30, n. 2, p. 145–150, 2007.

TAKEDA, S.; OGATA, Y.; KOJIMA, H.; OKADA, A.; URANISHI, Y.; NAKAMURA, K. *Arabidopsis thaliana*: a novel biocatalyst for asymmetric reductions. *Plant biotechnology*, n. 28, p. 77-882, 2011.

TAKEMOTO, M., ACHIWA, K.; Synthesis of Styrenes through the Biocatalytic Decarboxylation of *trans*-Cinnamic Acids by Plant Cell Cultures, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, n. 5, p. 639, 2001.

TEIXEIRA, J. P. F., SPOLADORE, D. S., BRAGA, N. R., BUSILANI, E. A. Composição química de grãos de feijão-gandu cultivar kaki. *Bragantia*, n. 1, p. 457-463, 1985.

TOLEDO, T. C. F., CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; Avaliação química e nutricional do feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) cozido por diferentes métodos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. n. 2, p. 355-360, 2008.

TORRES, P.; POVEDA, A.; JIMENEZ-BARBERO, J.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J. Regioselective Lipase-Catalyzed Synthesis of 3-O-Acyl Derivatives of Resveratrol and Study of Their Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. n.58, p. 807–813, 2010.

TSUZUKI, W. Acidolysis between triolein and short chain fatty acid by lipase in organic solvents. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, n. 69, p. 1256-1261, 2005.

TZIALLA, A. A.; KALOGERIS, E.; ENOTIADIS, A.; TAHA, A. A.; GOURNIS, D.; STAMATIS, H. Effective immobilization of *Candida antarctica* lipase B in organic-modified clays: Application for the epoxidation of terpenes. *Materials Science and Engineering B*, n. 165, p. 173–177, 2009.

USMANI, G. A.; PATIL, H. V. Lipase catalyzed interesterification for the production and oleochemicals from non-traditional oils. *Rasayan Journal Chemistry*, n. 3, p. 345-358, 2010.

VEERESA, G., DATTA, A.; Stereoselective synthesis of chloramphenicol from D-serine, *Tetrahedron letters*, n. 39, p. 8503-8504, 1998.

VIDYA, P.; CHADHA, A. The role of different anions in ionic liquids on *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed transesterification and hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 57, p. 145–148, 2009.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces Sp.*). *Revista de Nutrição*, n. 3, p. 185-192, 2000.

WELSH, F. W.; WILLIAMS, R. E. Lipase-mediated production of ethylbutyrate and butyl butyrate in non aqueous systems. **Enzyme & Microbial Technology**, n. 12, p. 743-748, 2002.

WILSON, K.; WALKER, J. M. **Principles and techniques of practical biochemistry**. 4. Ed. New York: 1995. 586 p.

WULFF, W. D.; LONCARIC, C. An Efficient Synthesis of (-)-Chloramphenicol via Asymmetric Catalytic Aziridination: A Comparison of Catalysts Prepared from Triphenylborate and Various Linear and Vaulted Biaryls. **Organic Letters**, n. 23, p. 3675-3678, 2001.

XU, C.; ZHONGHUA, Y.; RONG, Z.; GAI, Y.; JIABAO, Y. Production of chiral aromatic alcohol by asymmetric reduction with vegetable catalyst. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, n. 18, p. 1029-1033, 2010.

XU, Y.; DU, W.; LIU, D.; ZENG, J. A novel enzymatic route for the biodiesel production from renewable oils in a solvent free medium. **Biotechnology Letters**, n. 25, p. 1239-1241, 2003.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; REDDY, P. T.; RAO, A. B.; Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root. **Journal Organic Chemistry**, n. 67, p. 3900, 2002.

YADAV, J. S.; REDDY, P. T.; NANDA, S.; RAO, A. B. Stereoselective synthesis of (*R*)-(-)-denopamine, (*R*)-(-)-tembamide and (*R*)-(-)-aegeline via asymmetric reduction of azidoketones by *Daucus carota* in aqueous medium. **Tetrahedron: Asymmetry**, n. 12, p. 3381-3385, 2001.

YANG, L.; DAI, J.; SAKAI, J.; ANDO, M. Biotransformation of  $\alpha$ -santonin by cell suspension cultures of five plants. **Biotechnology Letters**, n. 27, p. 793-797, 2005.

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

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**, n. 21, 1998.

ZHANG, X.; YE, M.; DONG, Y. H. HU, H. B.; TAO, S. J.; YIN, J.; GUO, D. A. Biotransformation of bufadienolides by cell suspension cultures of *Saussurea involucrata*. **Phytochemistry**, n. 72, p. 1779-1785, 2011.





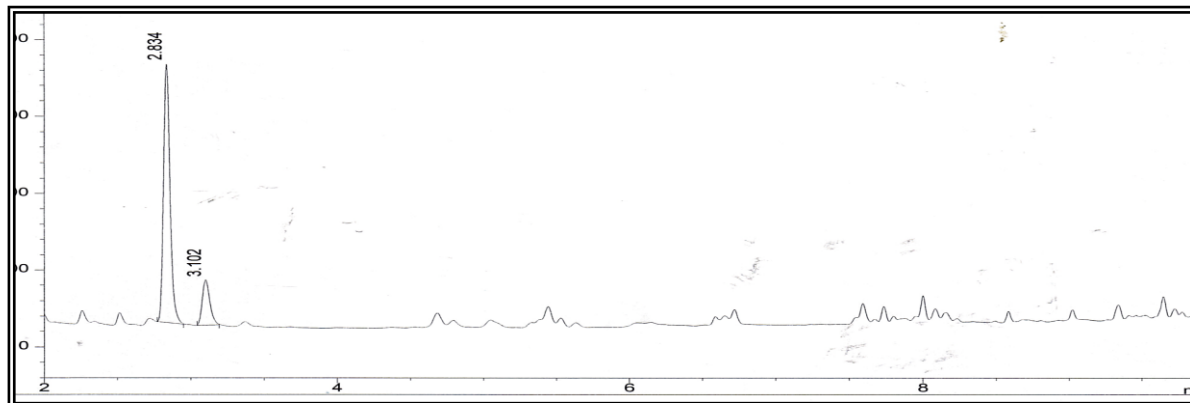
# *Anexos*

*“Mas o que guarda sua palavra, nesse  
verdadeiramente, o amor de Deus está realizado”.*

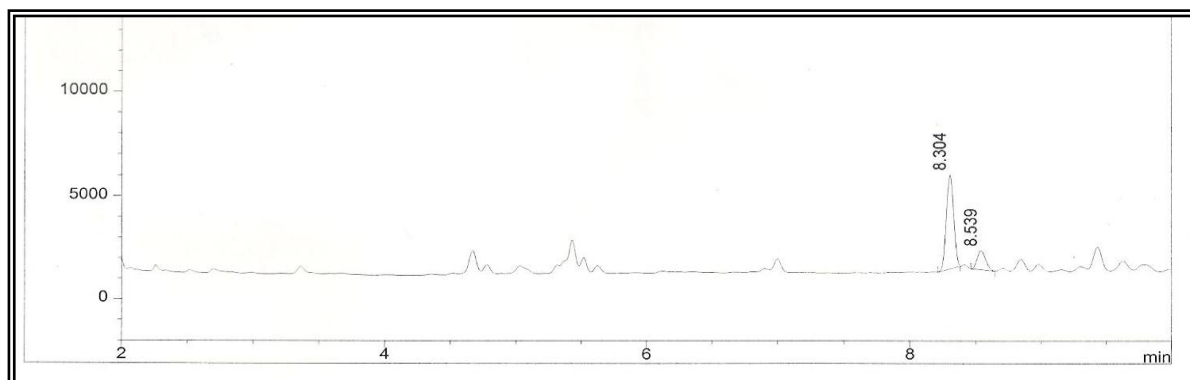
*§ Jo 1,5*

**ANEXOS**

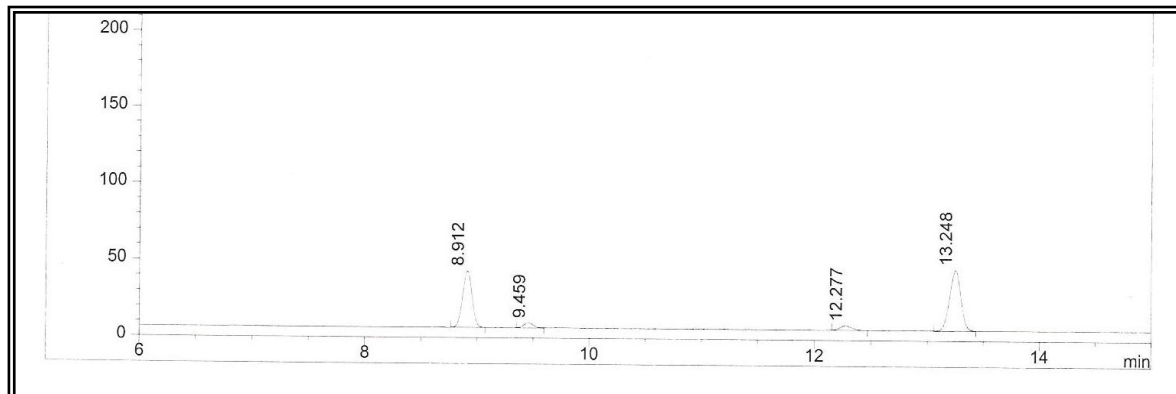
ANEXO 1 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução da 2-octanona



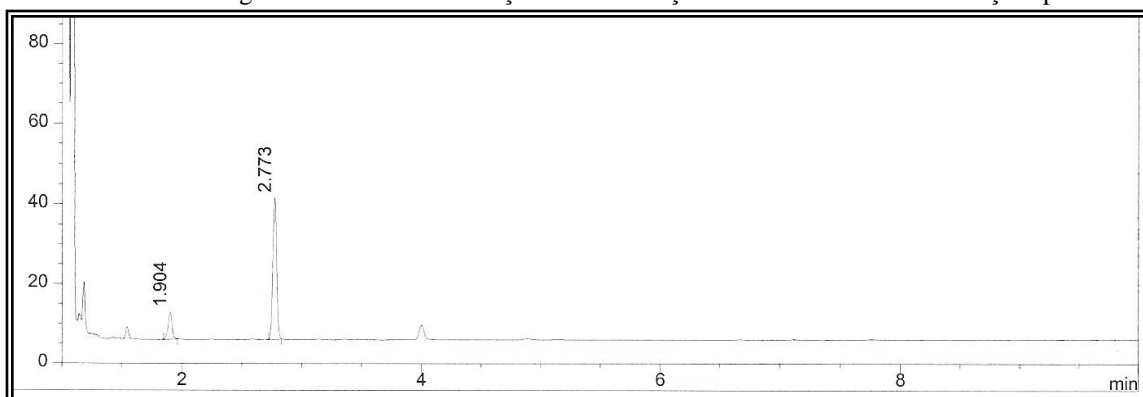
ANEXO 2 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução de 2-undecanona



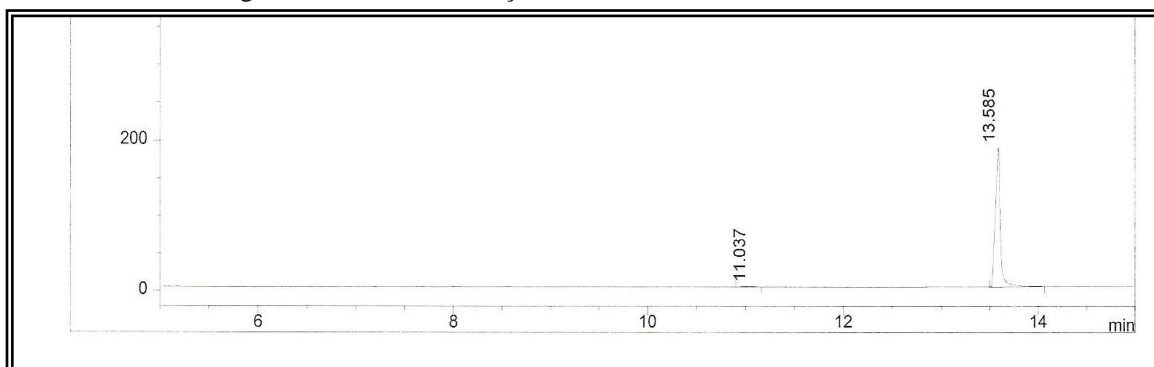
ANEXO 3 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução de fenil-butanona



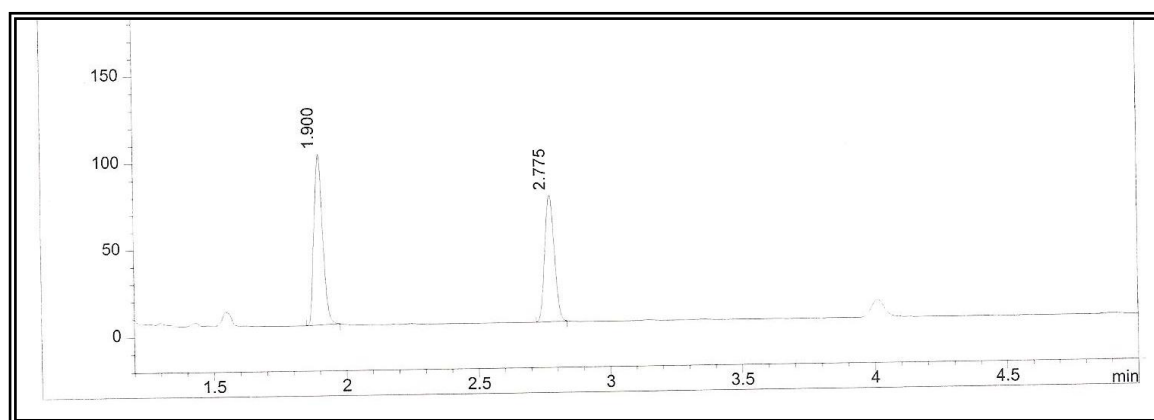
ANEXO 4 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução de nitrobenzeno em condições padrão



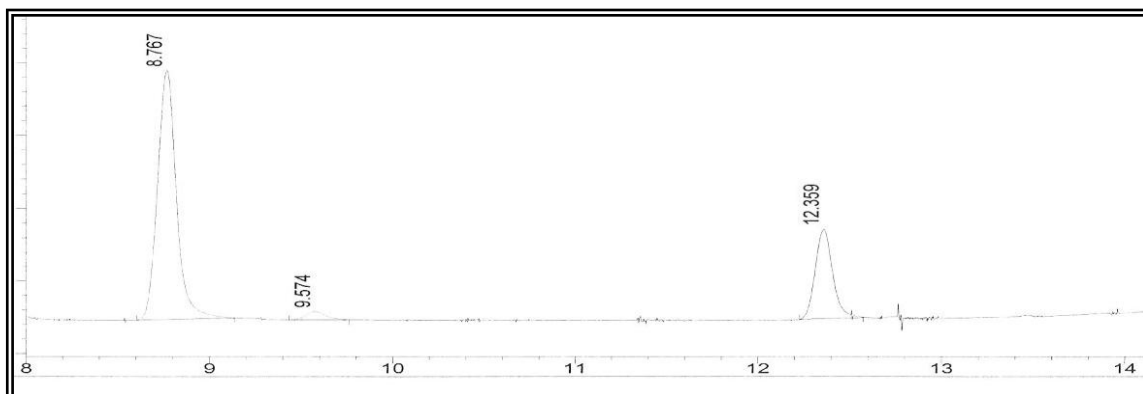
ANEXO 5 – Cromatograma de CG/FID da reação de hidrólise do nitro-acetato



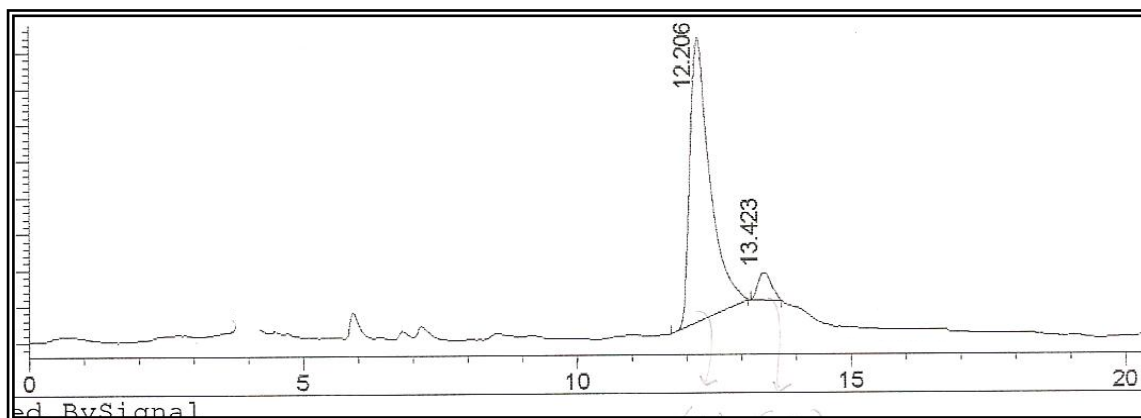
ANEXO 6 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução de nitrobenzeno com 4g de F1



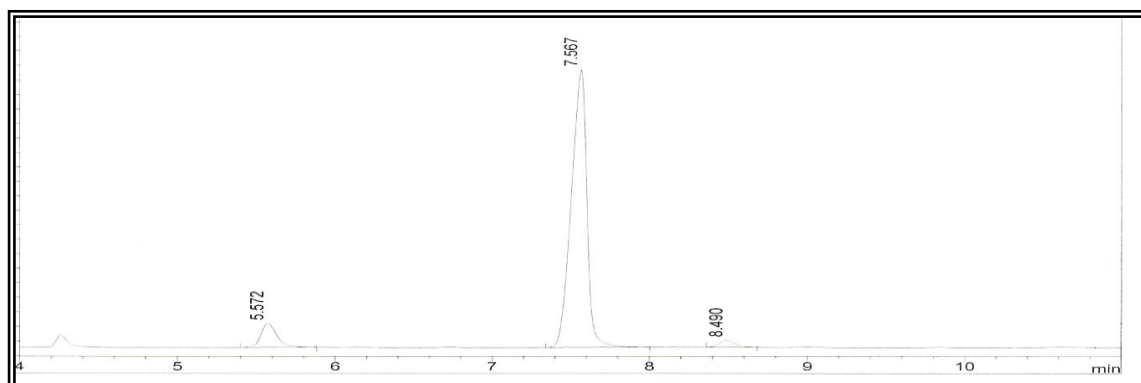
ANEXO 7 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 12

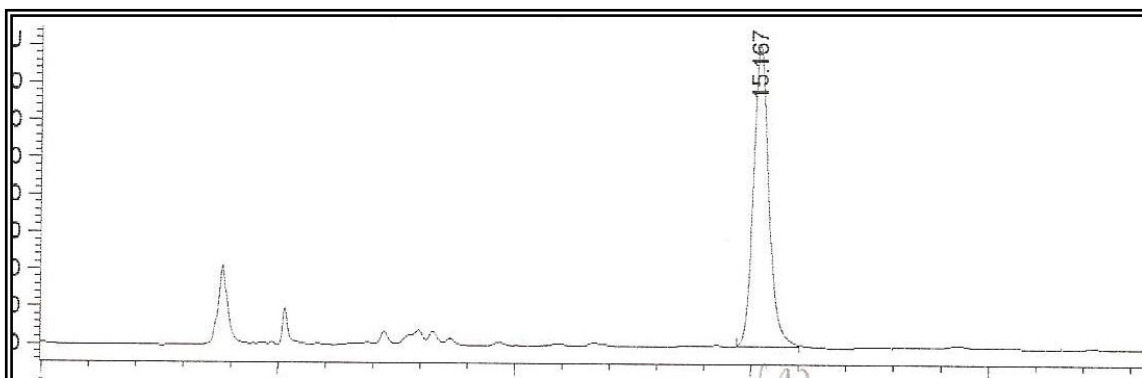


ANEXO 8 – Cromatograma de CLAE (S)- álcool 12a

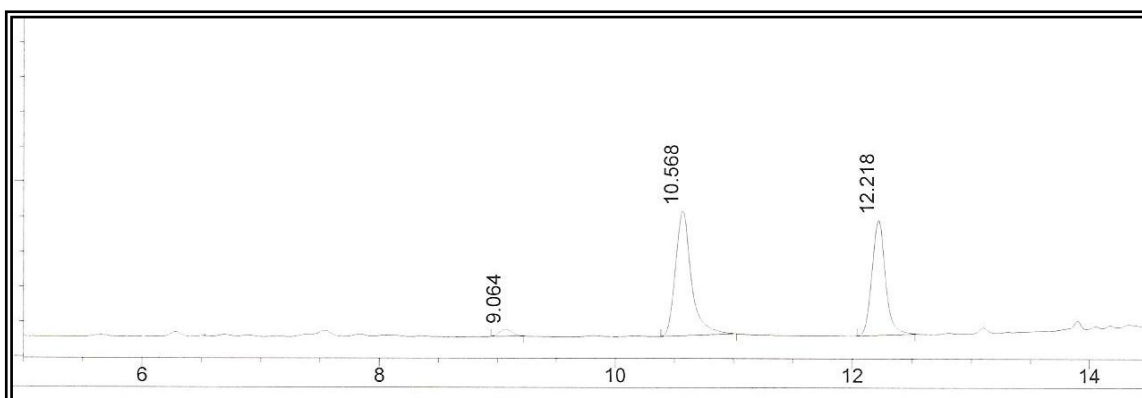
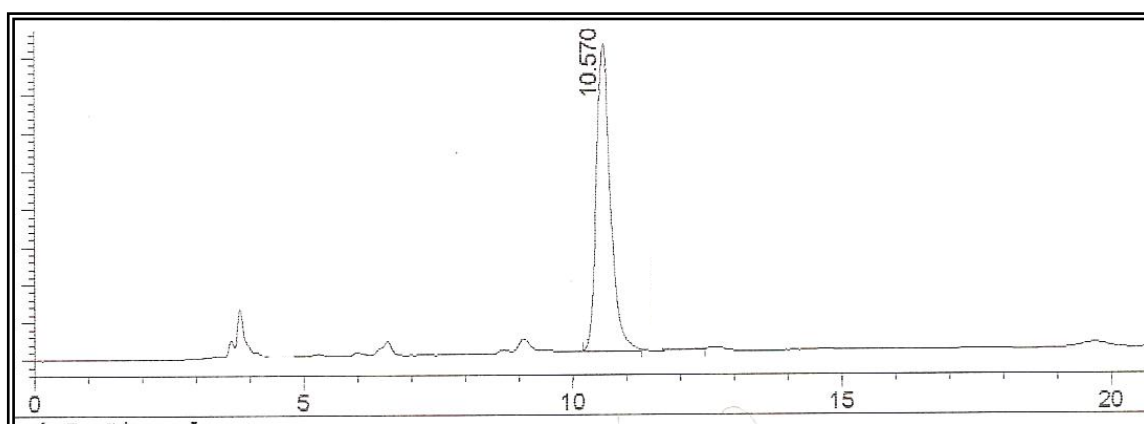


ANEXO 9 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 13



ANEXO 10 – Cromatograma de CLAE (*S*)- álcool 13a

ANEXO 11 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 14

ANEXO 12 – Cromatograma de CLAE (*R*)- álcool 14a

ANEXO 13 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 15

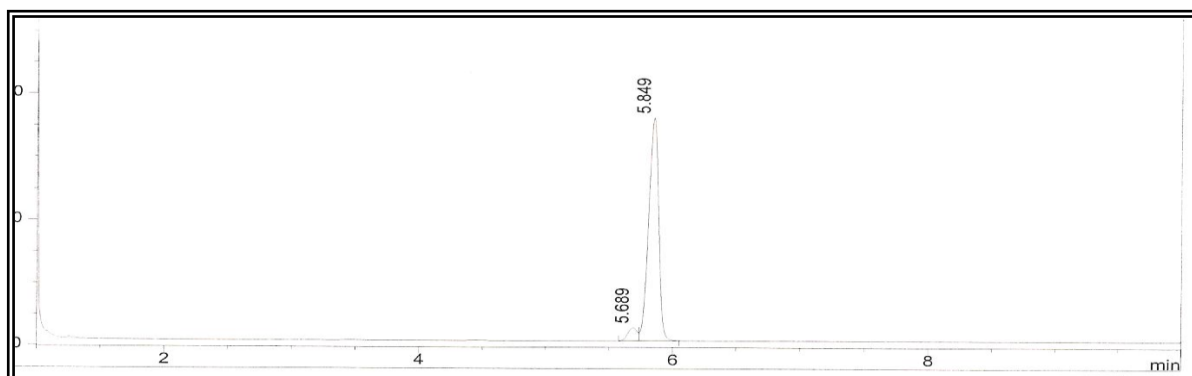
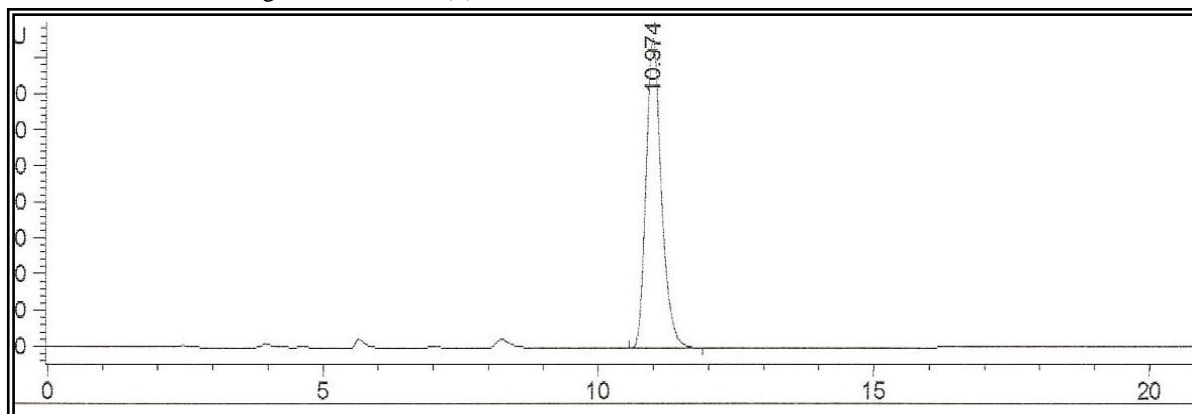
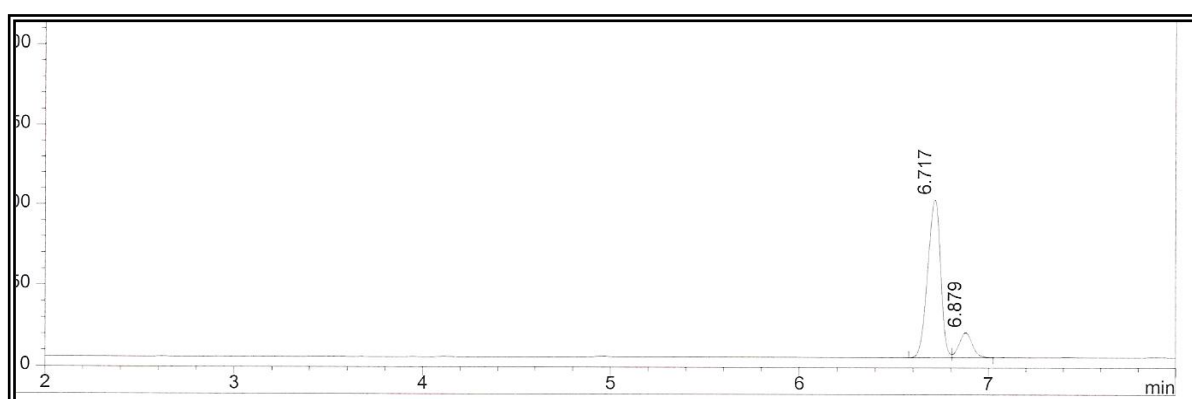


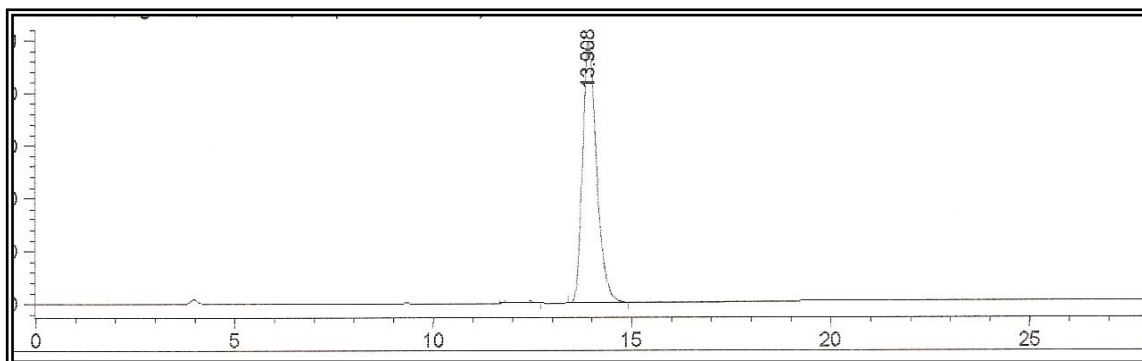
FIGURA 14 – Cromatograma de CLAE (S)- álcool 15a



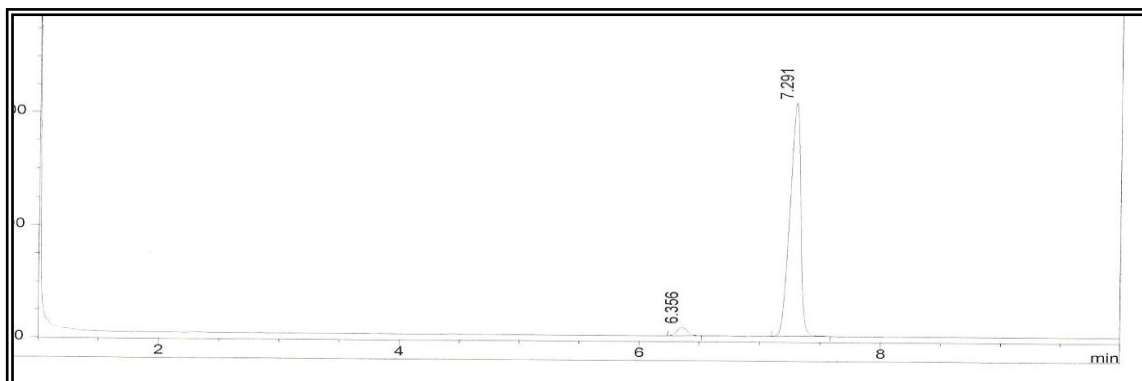
ANEXO 15 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 16



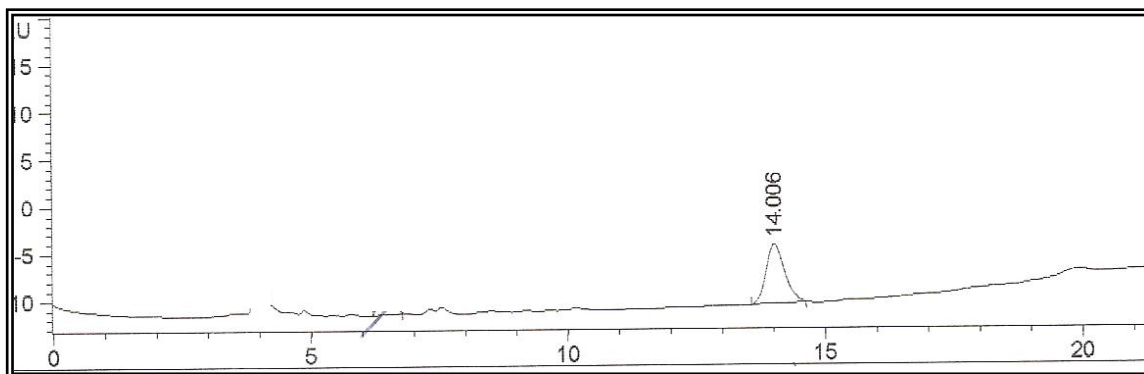
ANEXO 16 – Cromatograma de CLAE (S)- álcool 16a



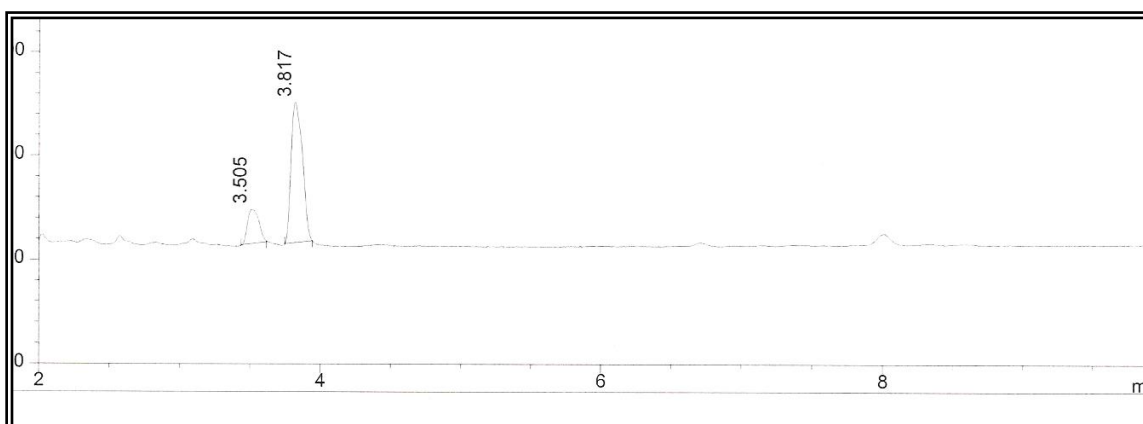
ANEXO 17 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 17



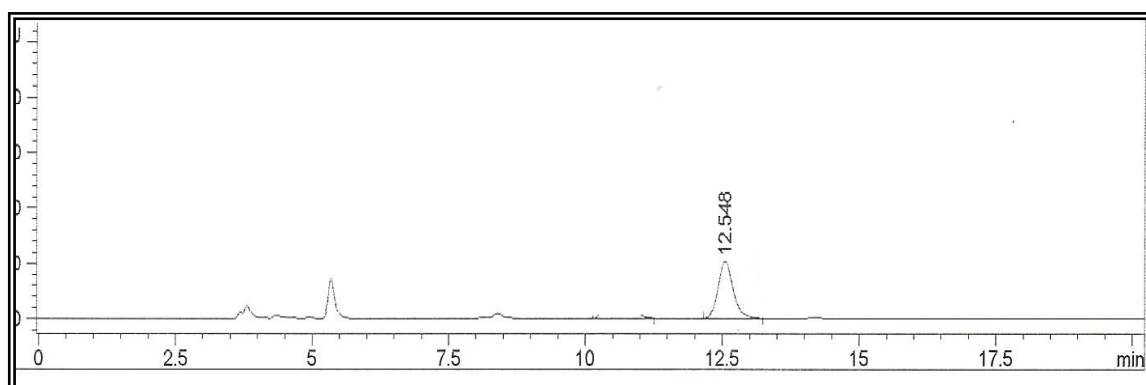
ANEXO 18 – Cromatograma de CLAE (S)- álcool 17a



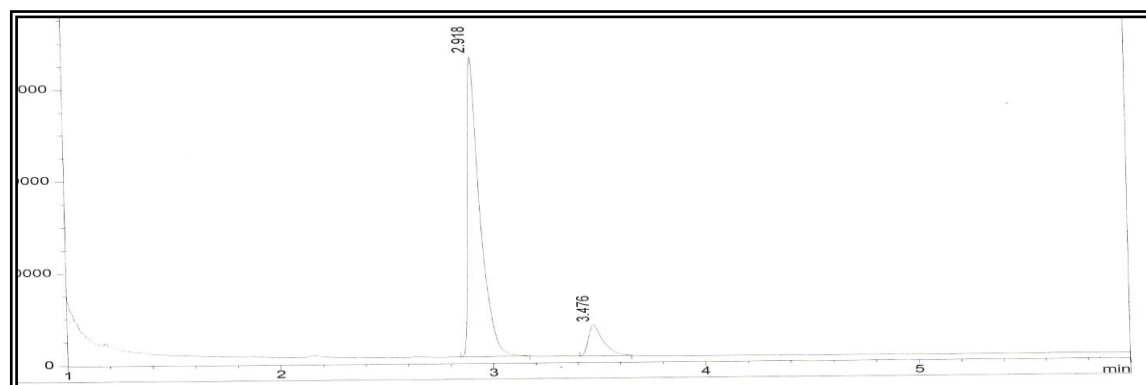
ANEXO 19 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 18



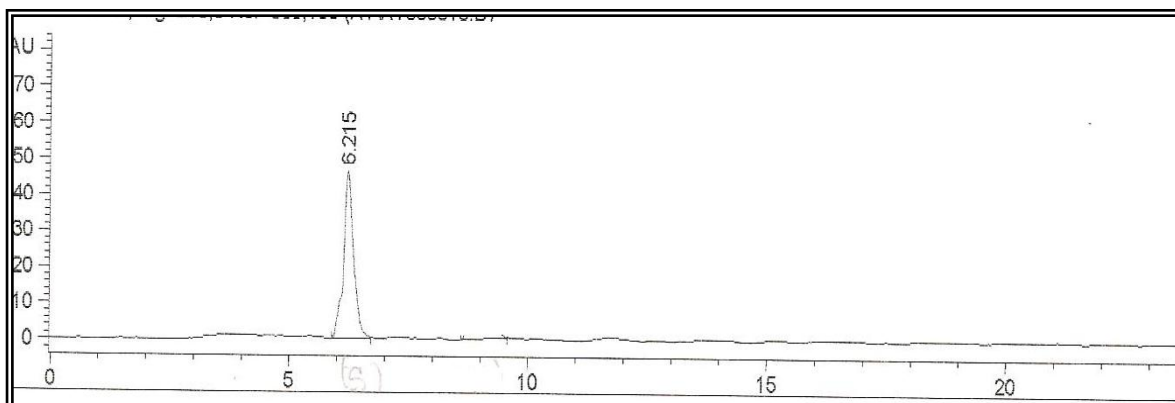
ANEXO 20 – Cromatograma de CLAE (S)- álcool 18a



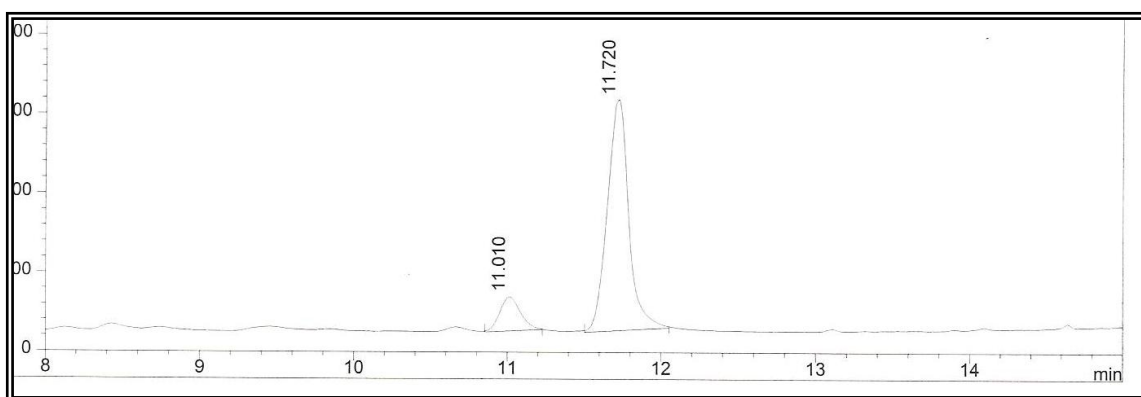
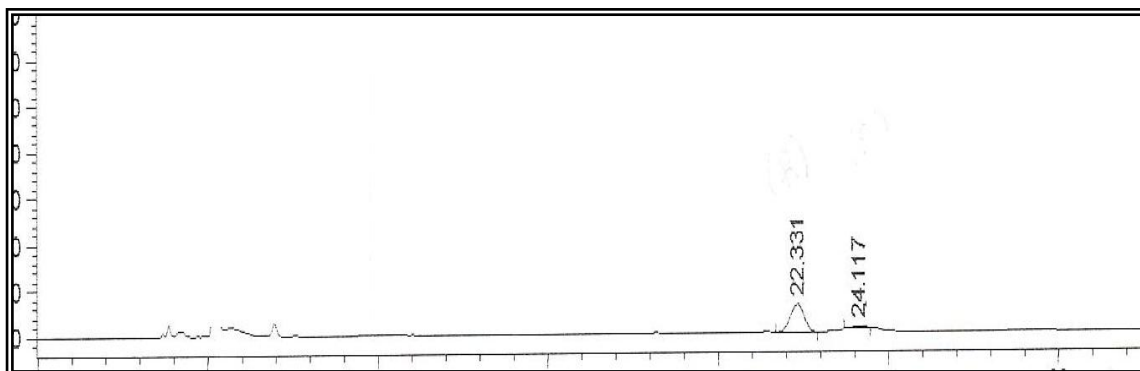
ANEXO 21 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 19



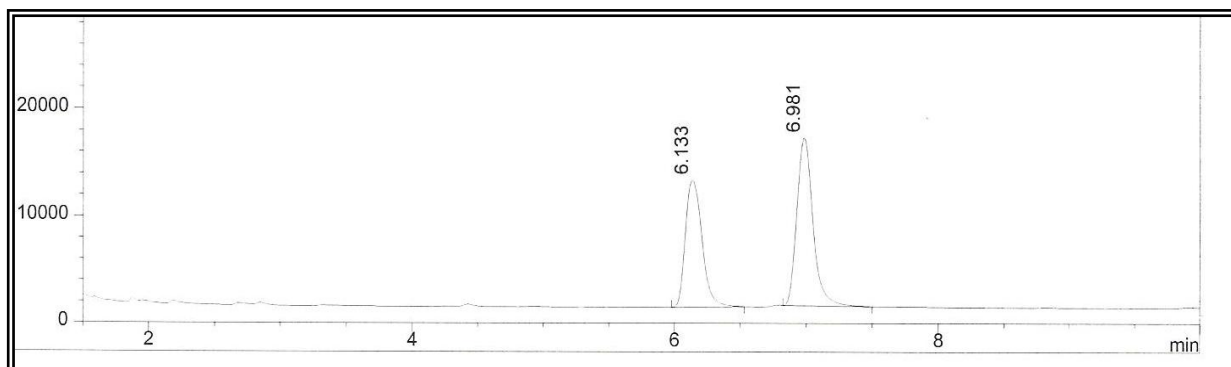
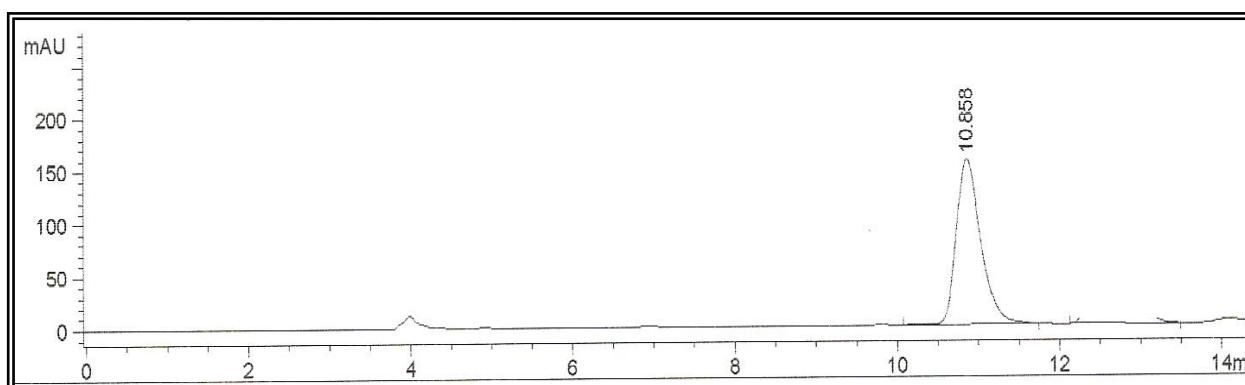


ANEXO 22 – Cromatograma de CLAE (*S*)- álcool 19a

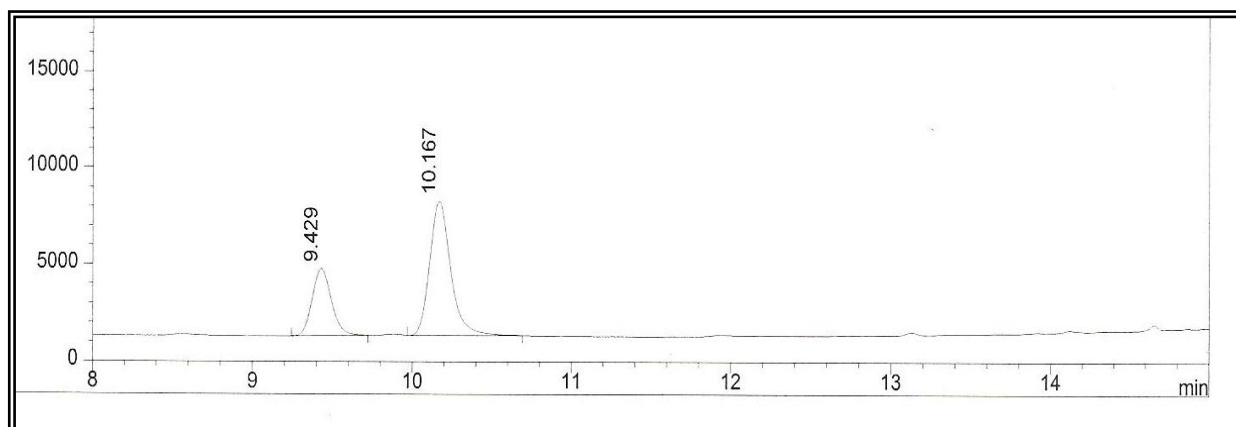
ANEXO 23 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 20

ANEXO 24 – Cromatograma de CLAE (*S*)- álcool 20a

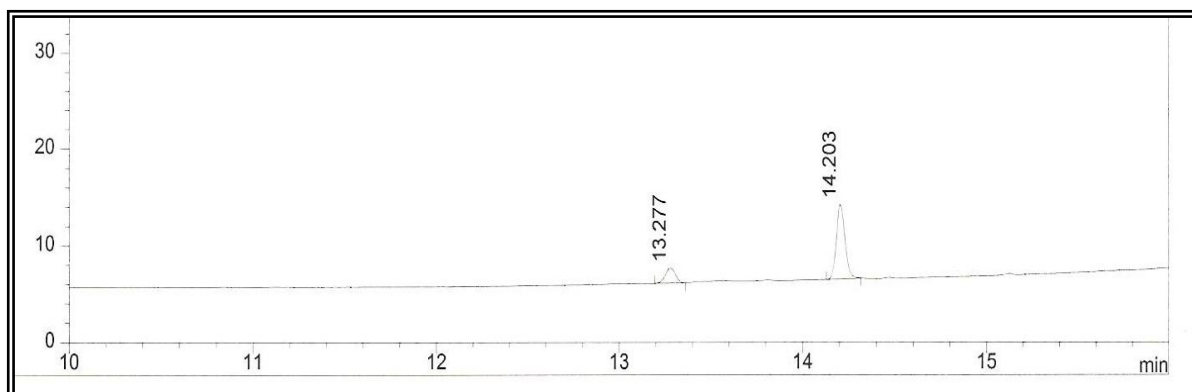
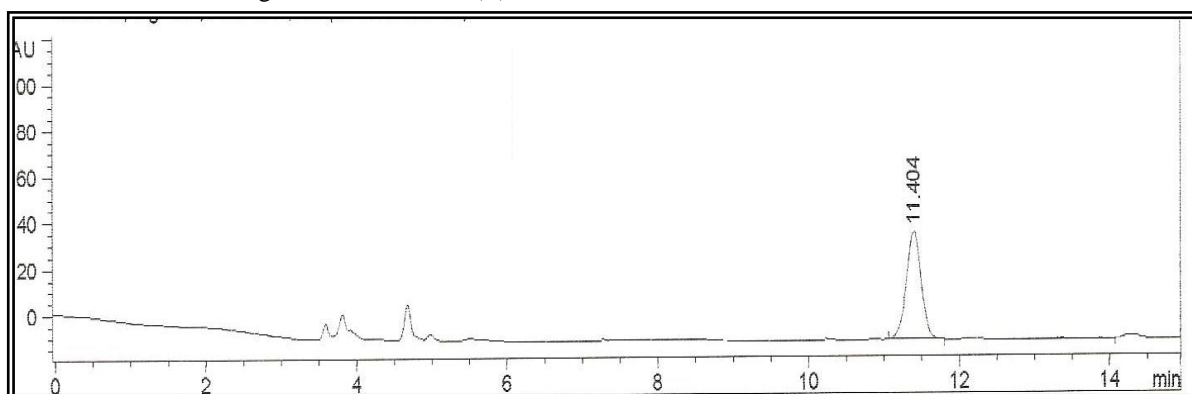
ANEXO 25 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 22

ANEXO 26 – Cromatograma de CLAE do (*R*)- álcool 22a

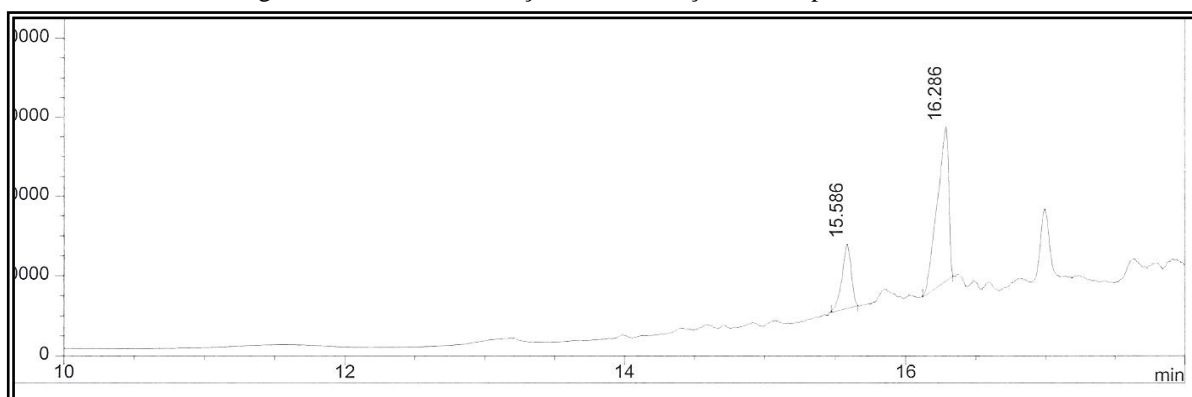
ANEXO 27 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 23



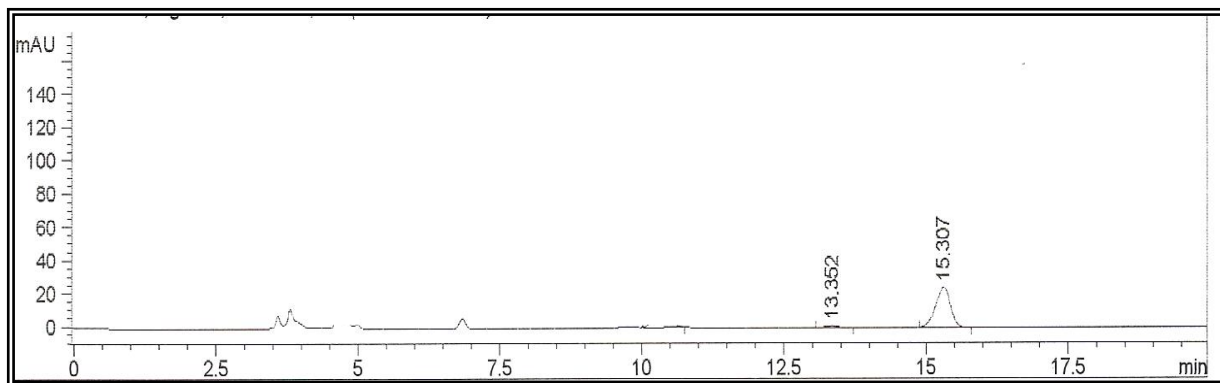
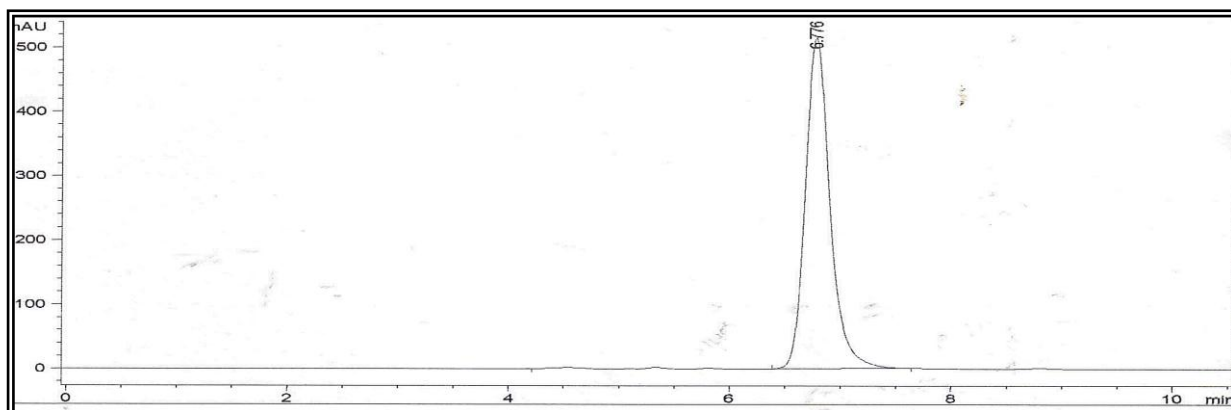
ANEXO 28 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 24

ANEXO 29 – Cromatograma de CLAE do (*R*)- álcool 24a

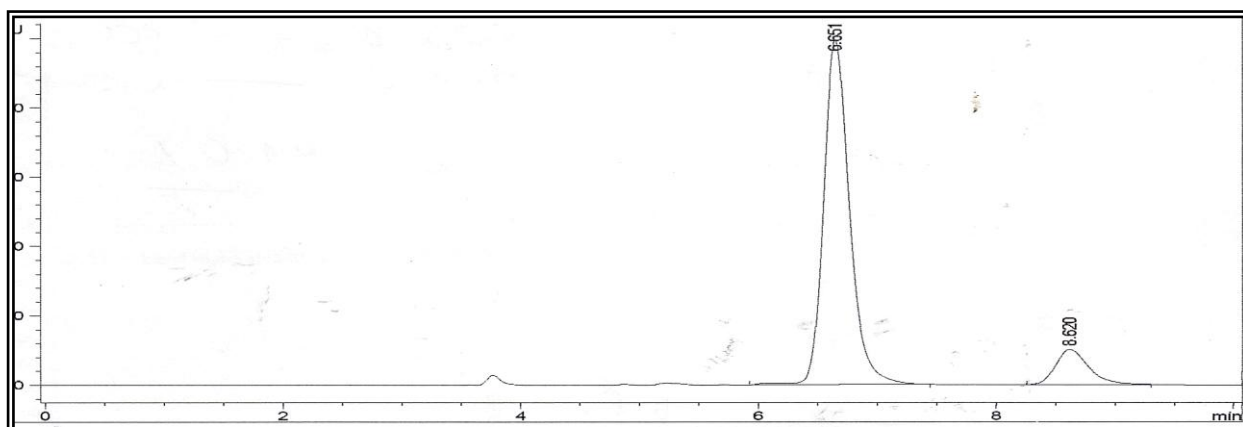
ANEXO 30 – Cromatograma de CG/FID da reação de biorredução do composto 25



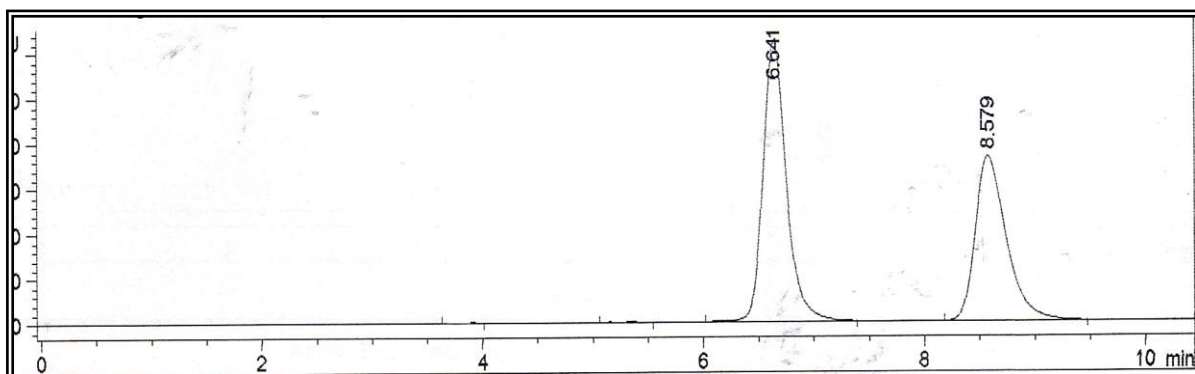
ANEXO 31 – Cromatograma de CLAE do (R)- álcool 25a

ANEXO 32 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com laurato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 48h.

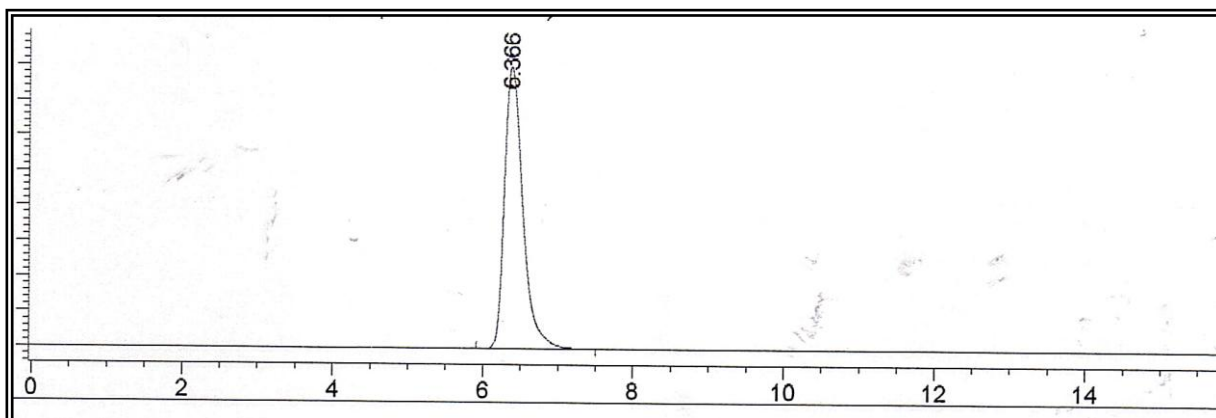
ANEXO 33 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com laurato de vinilo, PSL-C(I), Dioxano, 30°, 48h.



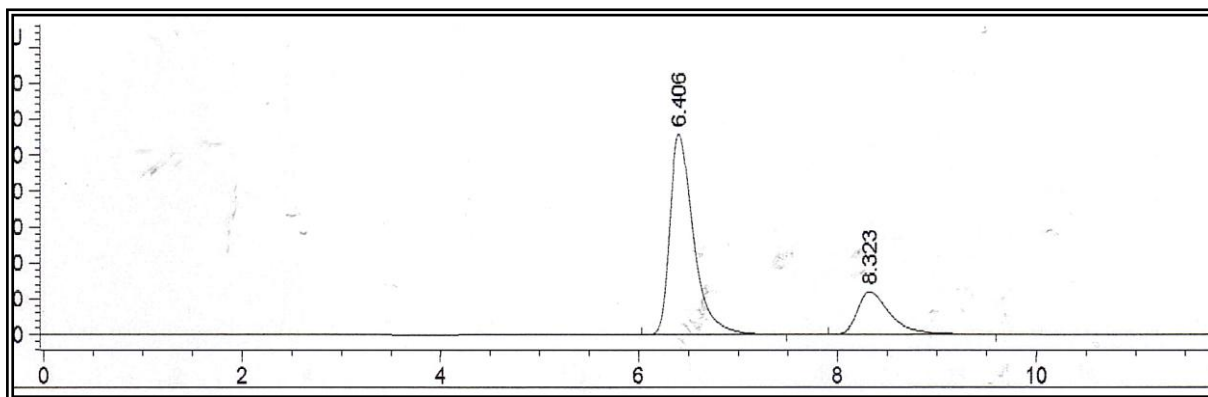
ANEXO 34 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com laurato de vinilo, PSL-C(Amano), Dioxano, 30°, 48h.



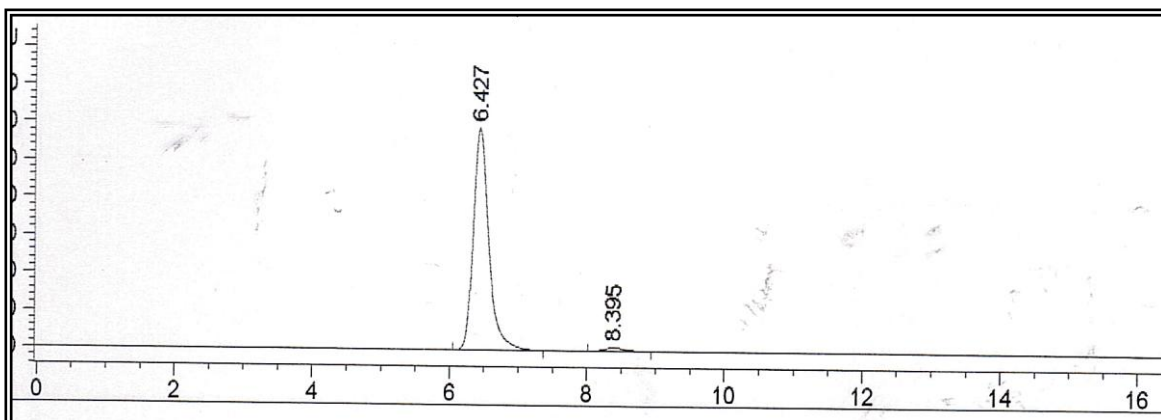
ANEXO 35 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com laurato de vinilo, 015M, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 4h.



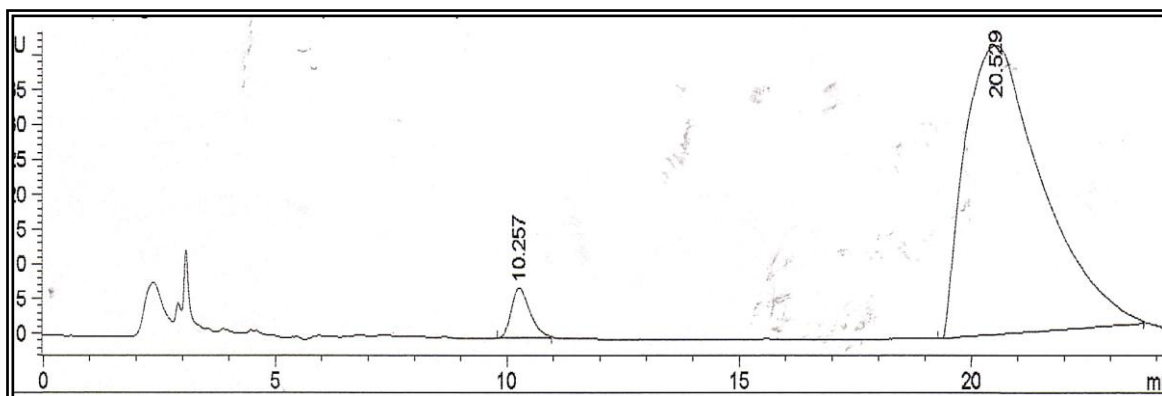
ANEXO 36 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com laurato de vinilo, PSL-C(I), Dioxano, 30°, 0,15M, 4h.



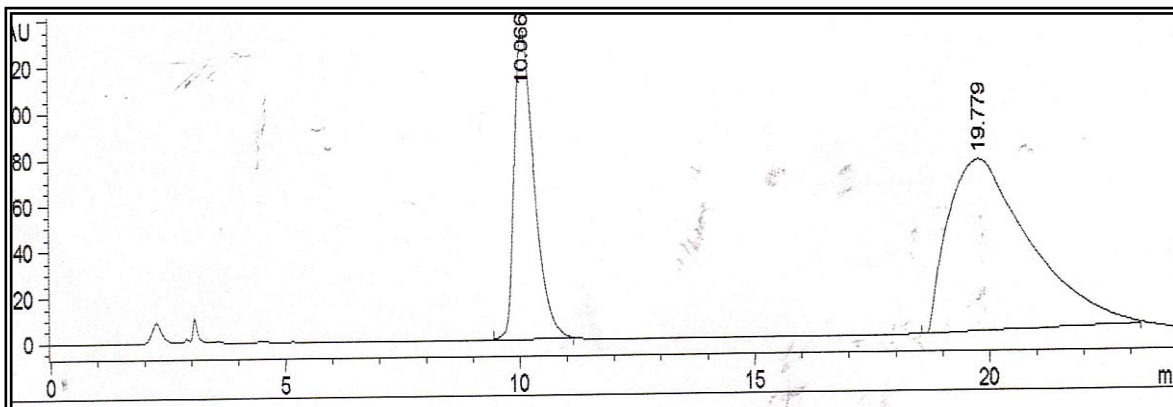
ANEXO 37 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com laurato de vinilo, PSL-C(Amano), Dioxano, 30°, 0,15M, 10h.



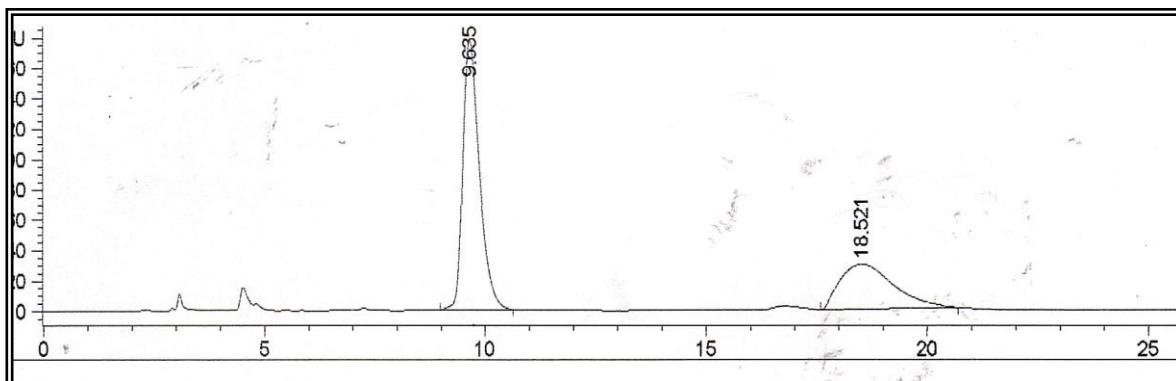
ANEXO 38 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, CAL-B, Dioxano, 20°, 24h.



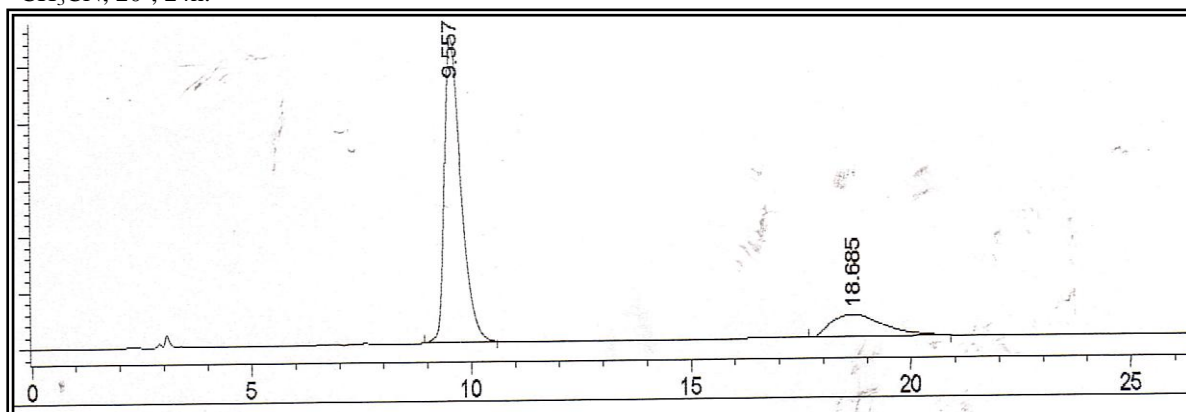
ANEXO 39 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 20°, 24h.



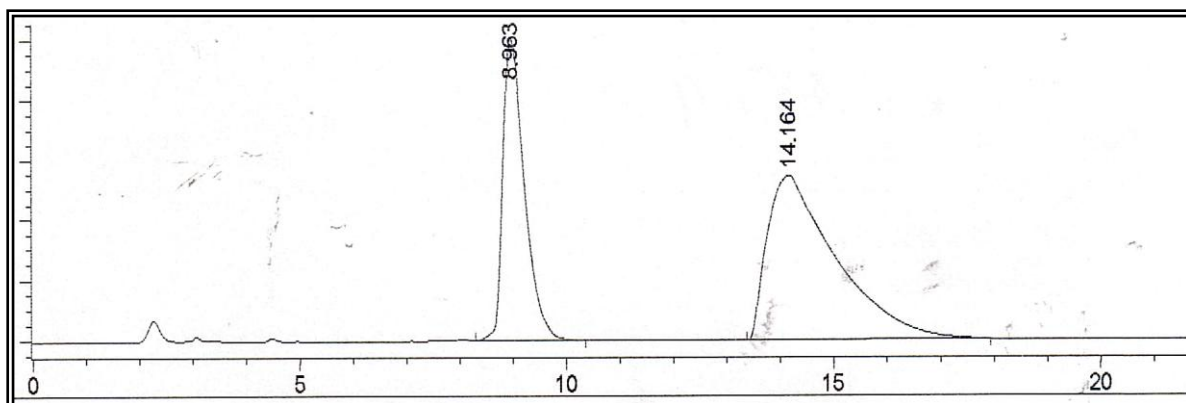
ANEXO 40 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 40°, 24h.



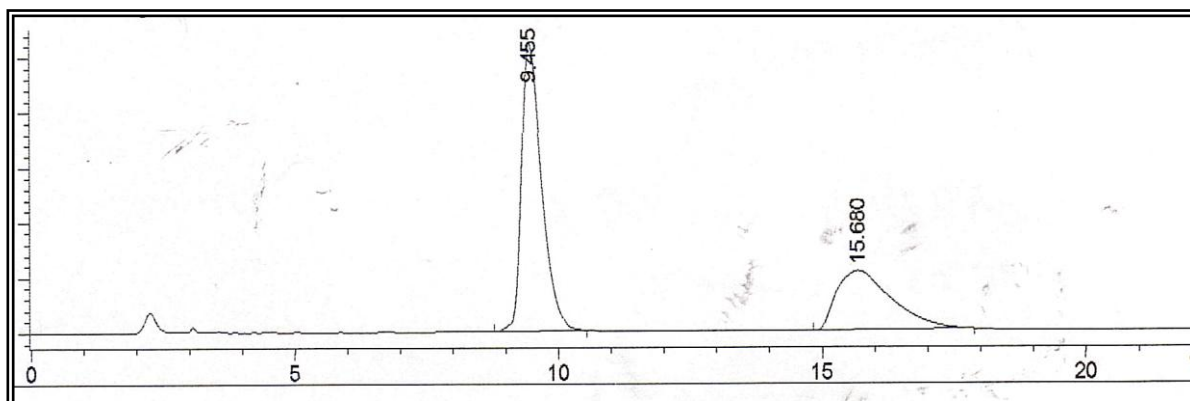
ANEXO 41 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 24h.



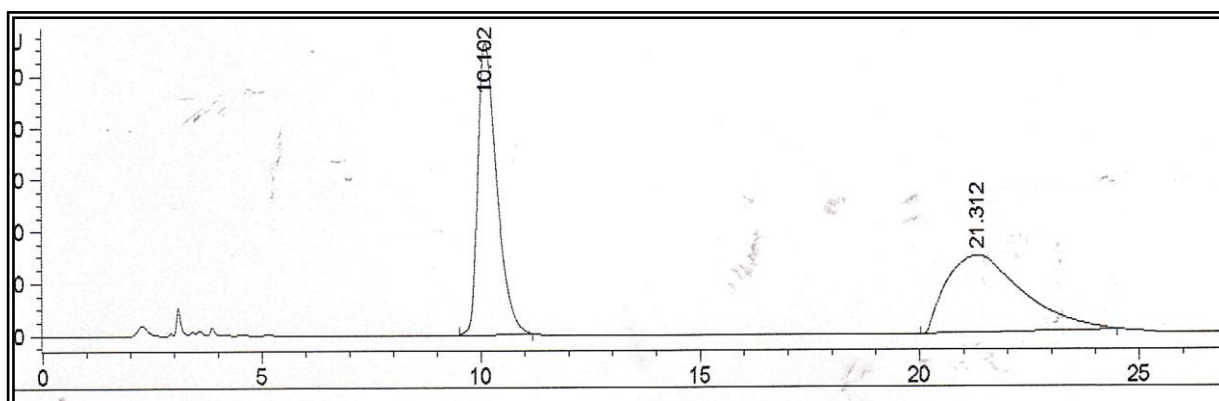
ANEXO 42 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 45°, 48h.



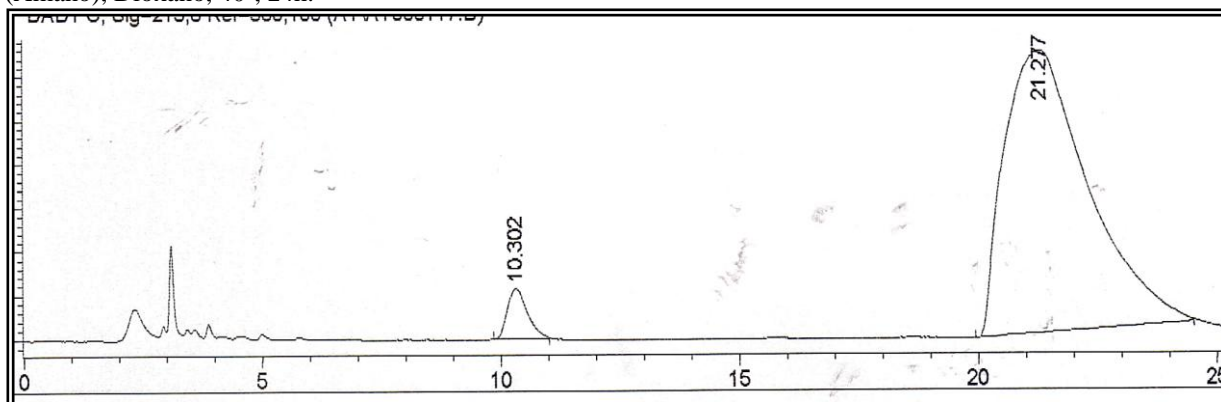
ANEXO 43 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 30°, 48h.



ANEXO 44 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 40°, 48h.

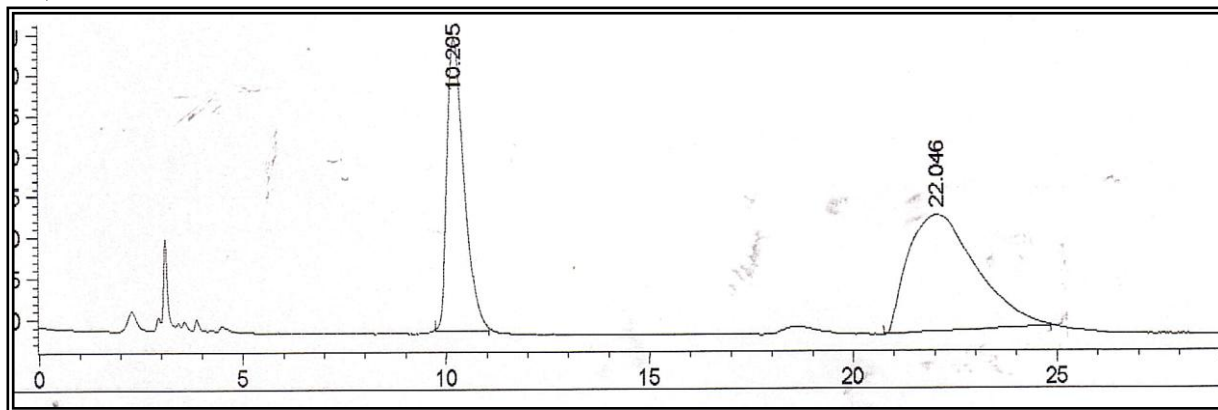


ANEXO 45 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (Amano), Dioxano, 40°, 24h.

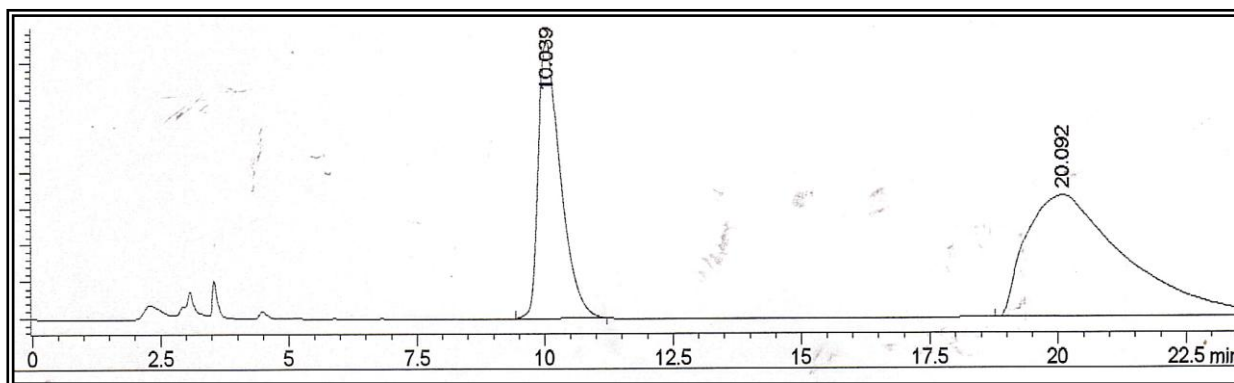




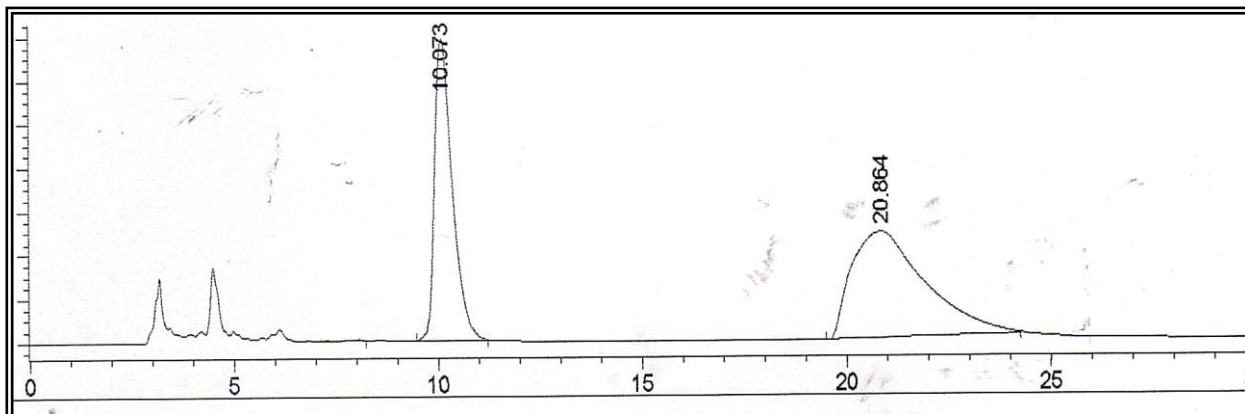
ANEXO 46 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, CAL-B, Dioxano, 40°, 48h.



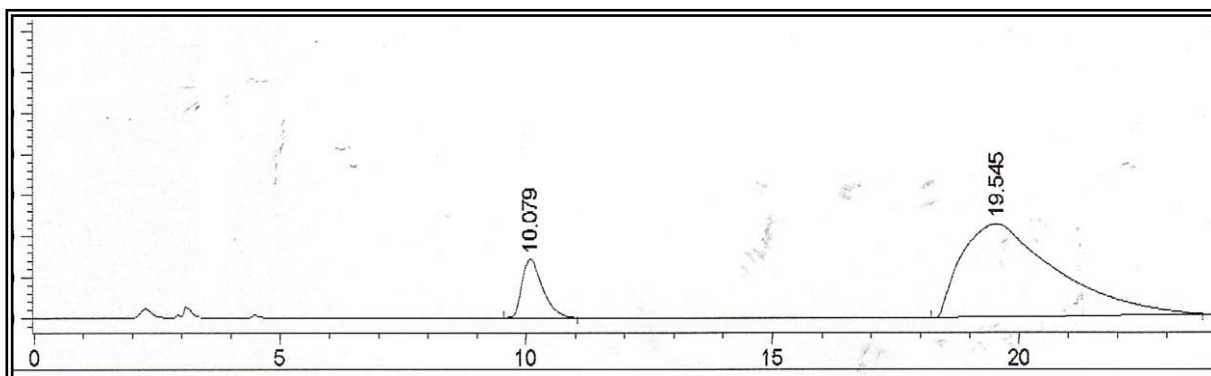
ANEXO 47 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (I), TBME, 30°, 48h.



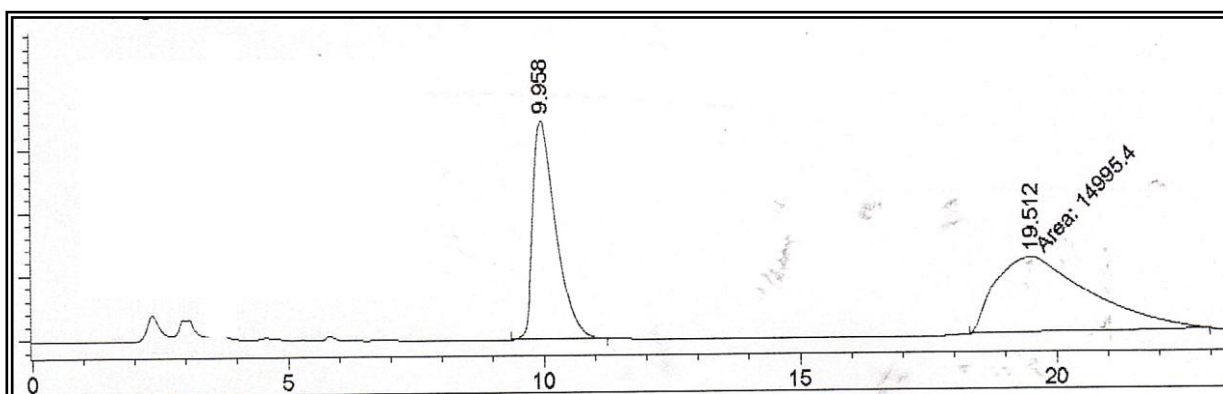
ANEXO 48 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (I), CH<sub>3</sub>CN, 20°, 48h.



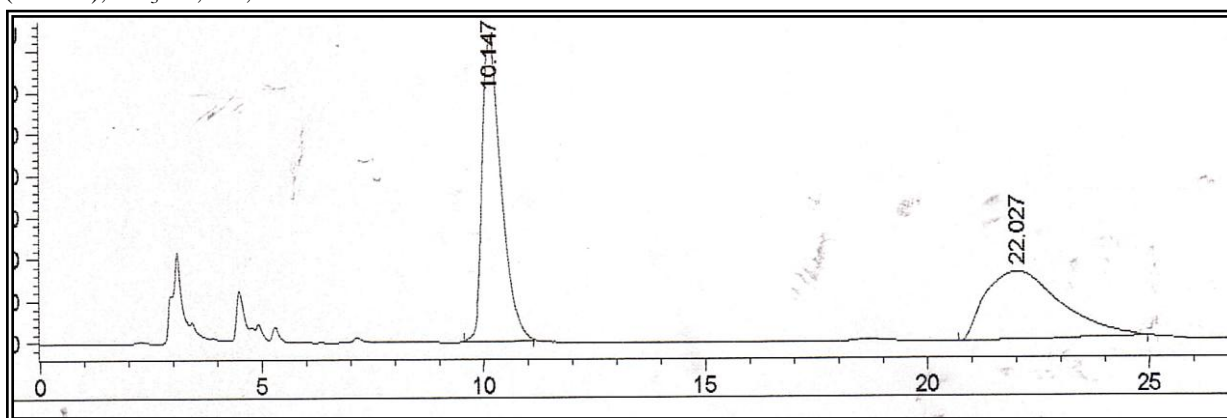
ANEXO 49 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (I), THF, 30°, 48h.



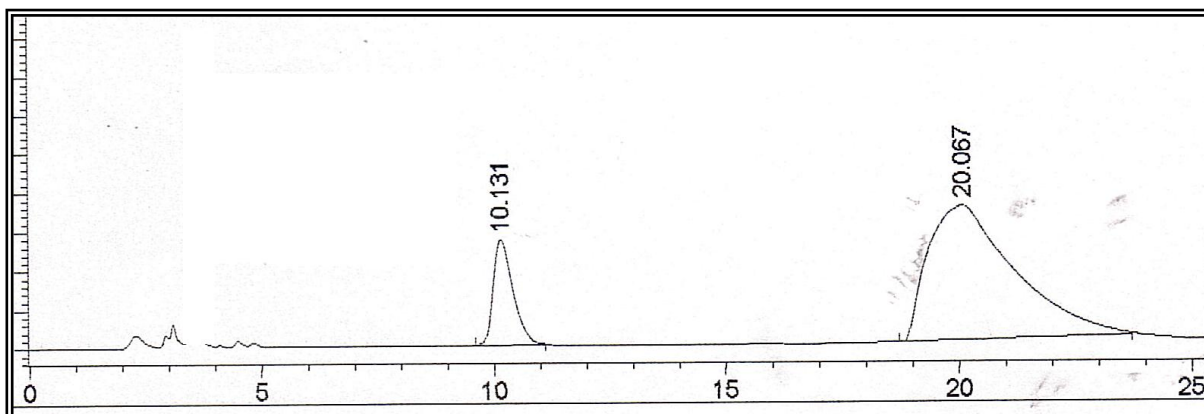
ANEXO 50 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (Amano), TBME, 30°, 48h.



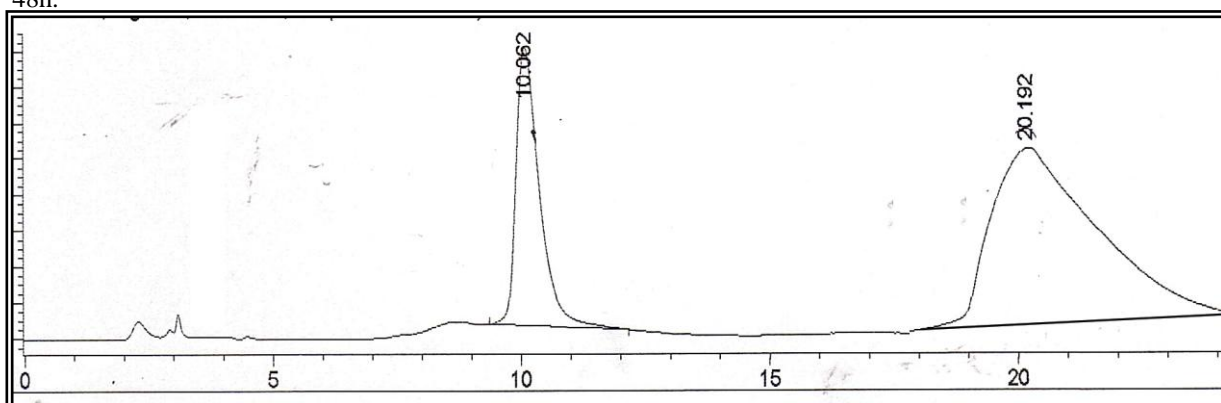
ANEXO 51 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (Amano), CH<sub>3</sub>CN, 30°, 48h.



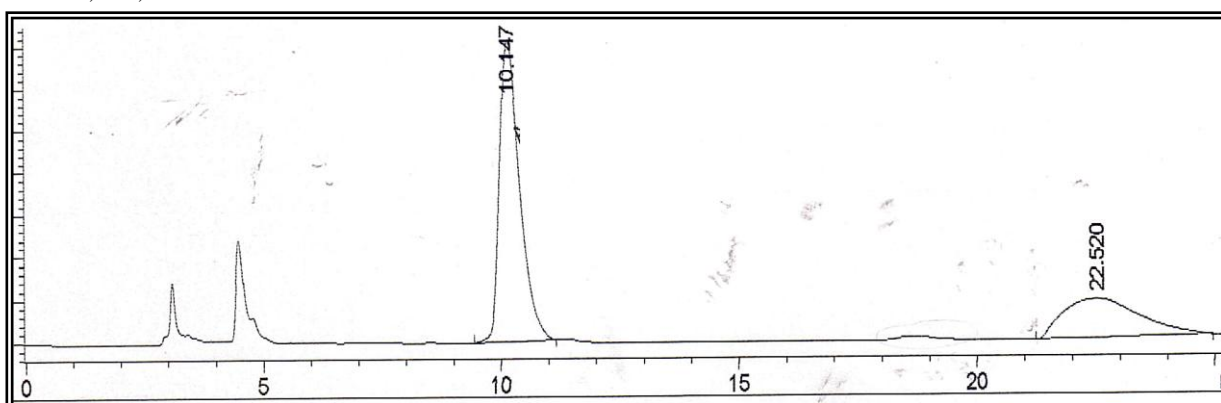
ANEXO 52 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, PSL-C (Amano), THF, 30°, 48h.



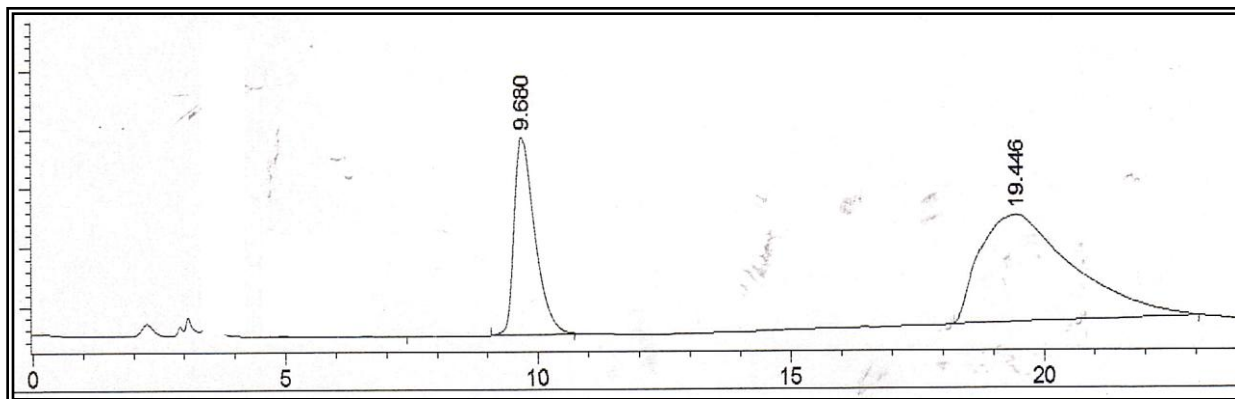
ANEXO 53 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, CAL-B, TBME, 30°, 48h.



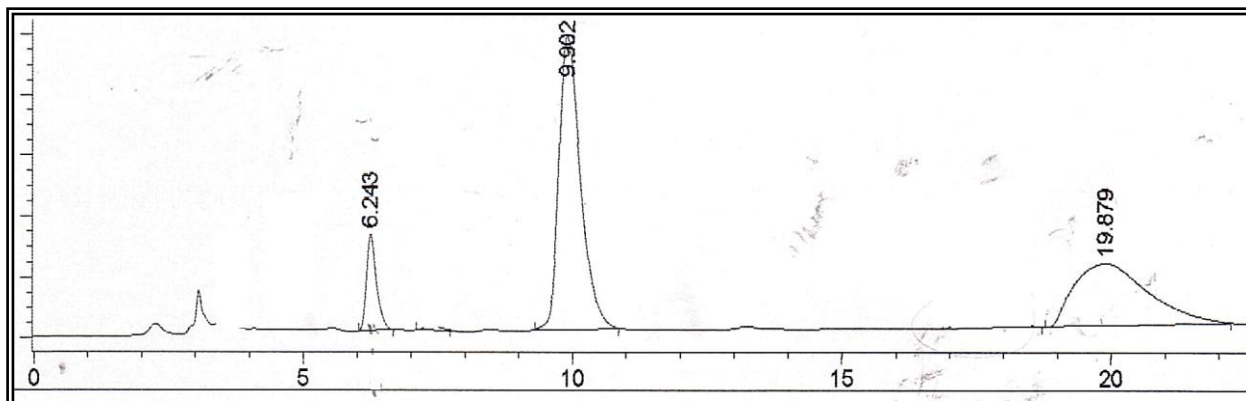
ANEXO 54 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 30°, 48h.



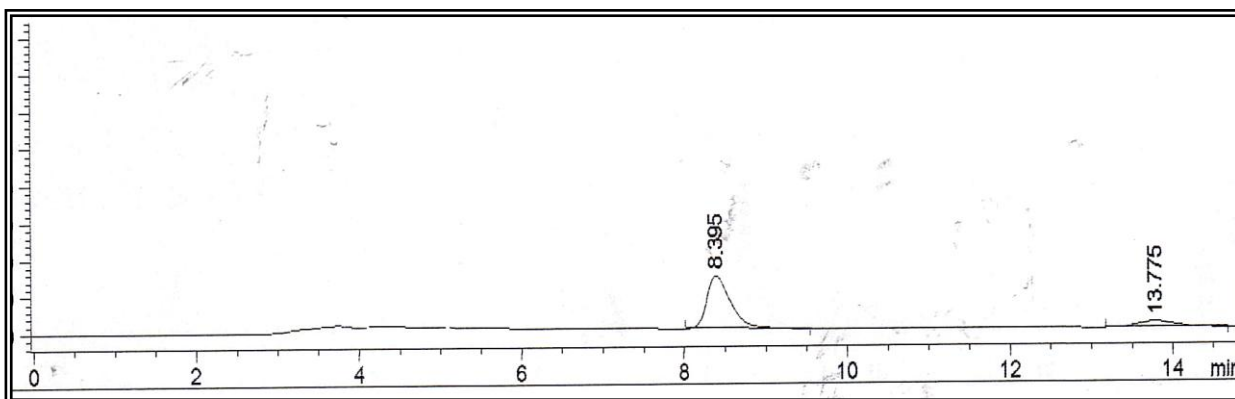
ANEXO 55 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, CAL-B, THF, 30°, 48h.



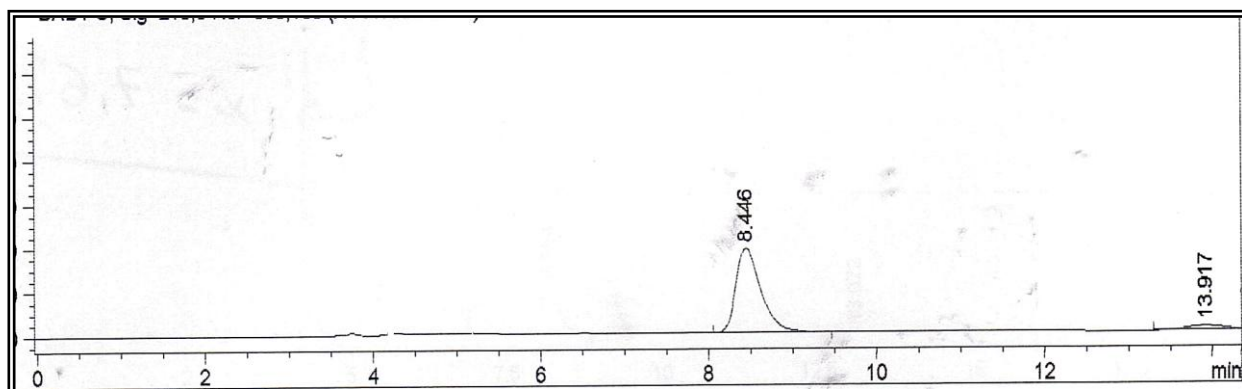
ANEXO 56 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com decanoato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 40°, 48h.



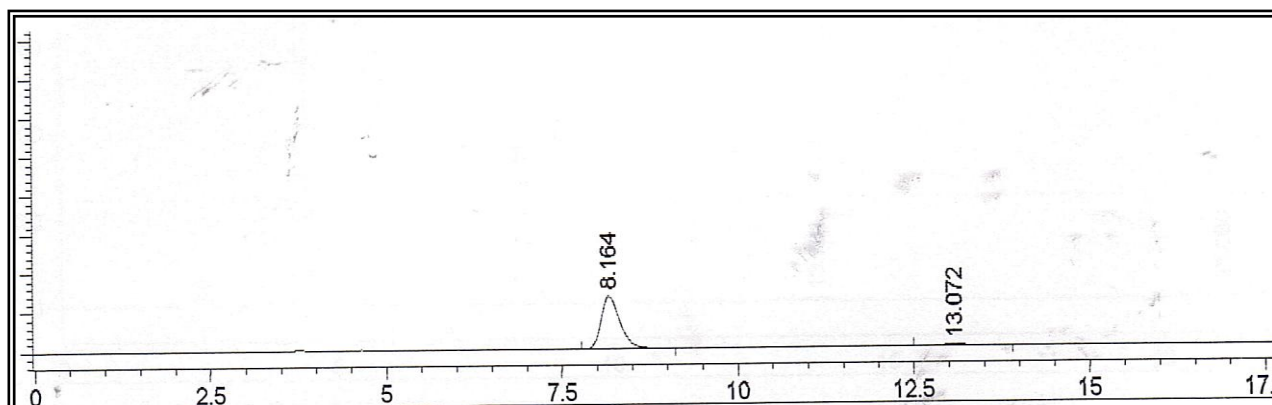
ANEXO 57 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com benzoato de vinilo, PSL-C (Amano), Dioxano, 30°, 48h.



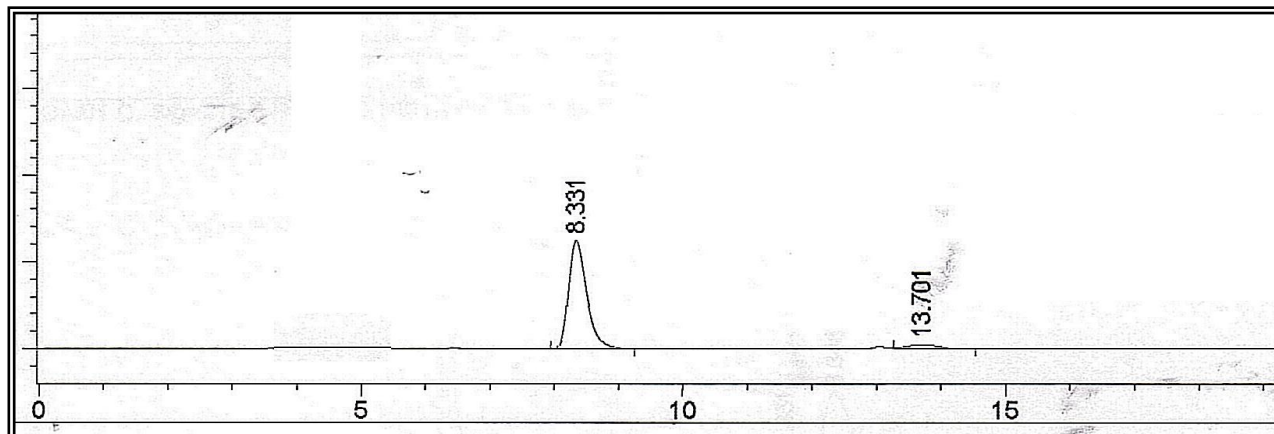
ANEXO 58 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com benzoato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 30°, 48h.



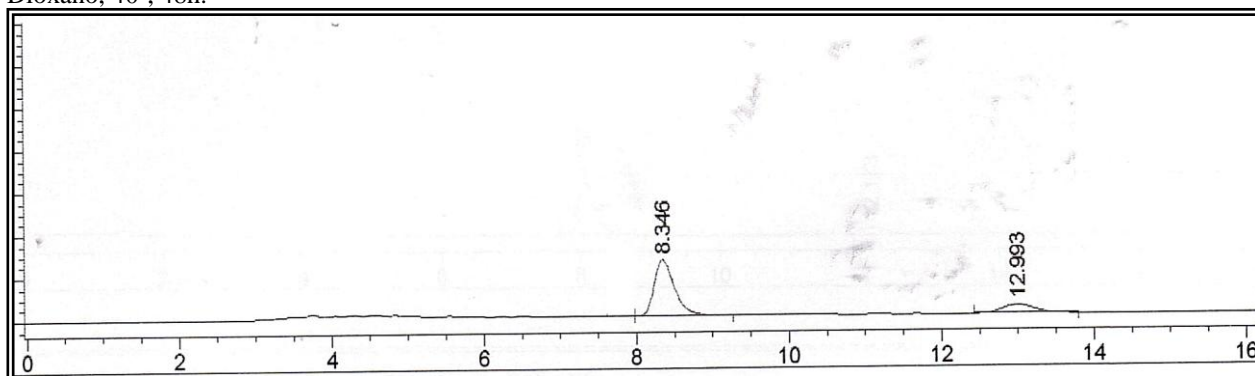
ANEXO 59 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com benzoato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 48h.



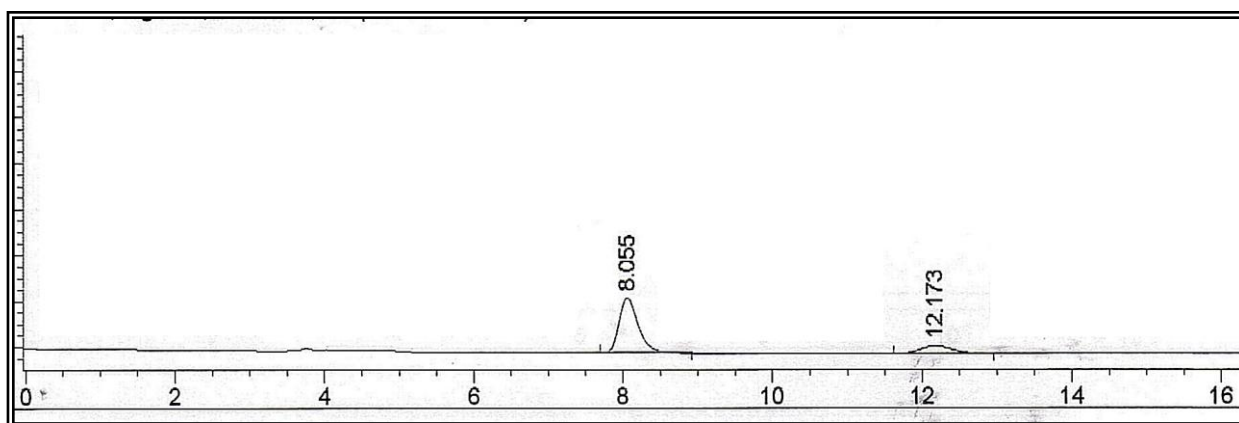
ANEXO 60 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com benzoato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 60°, 48h.



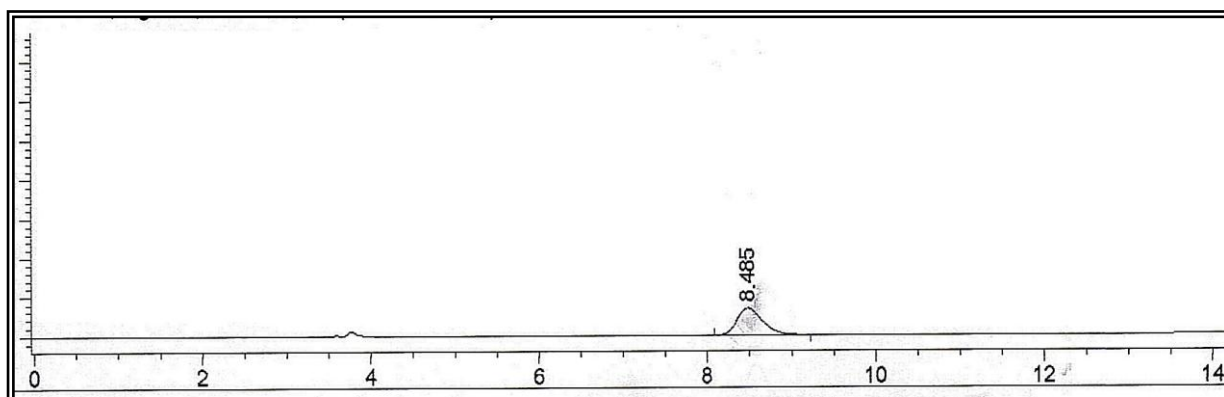
ANEXO 61 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com benzoato de vinilo, PSL-C (Amano), Dioxano, 40°, 48h.



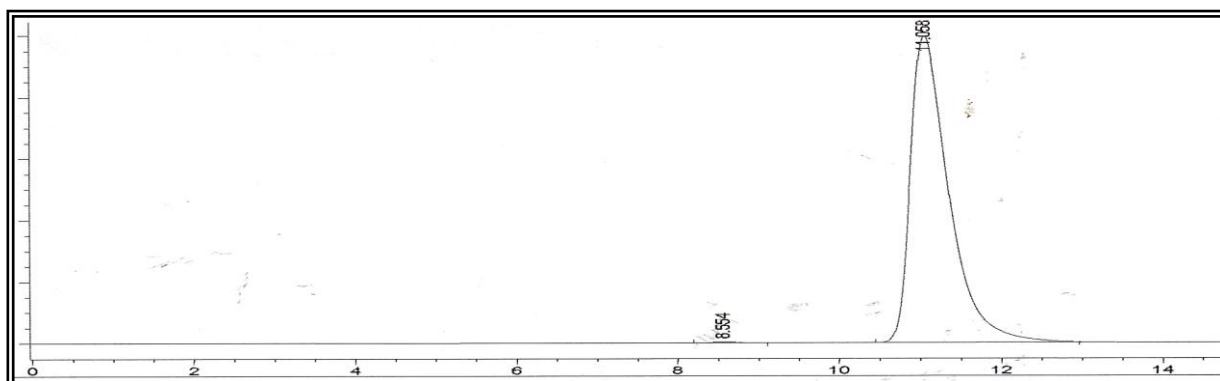
ANEXO 62 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com benzoato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 40°, 48h.



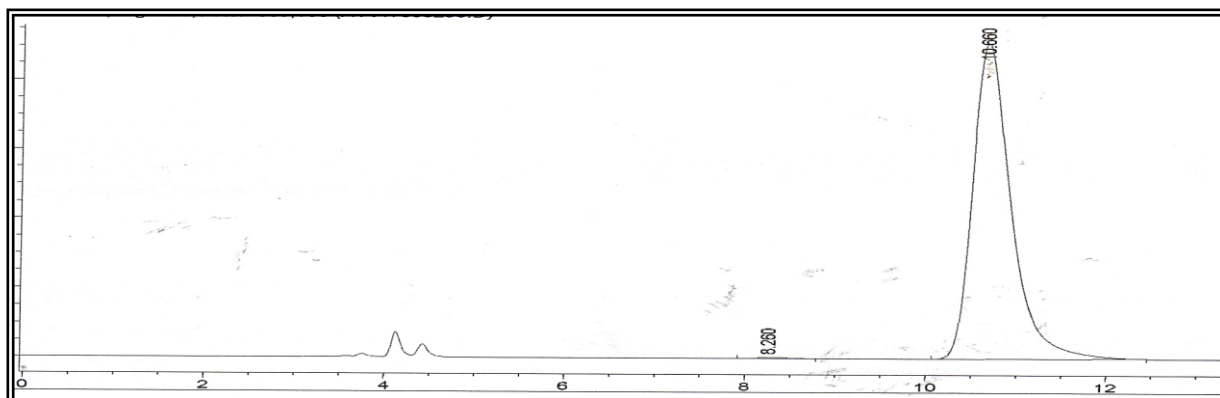
ANEXO 63 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com benzoato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 40°, 48h.



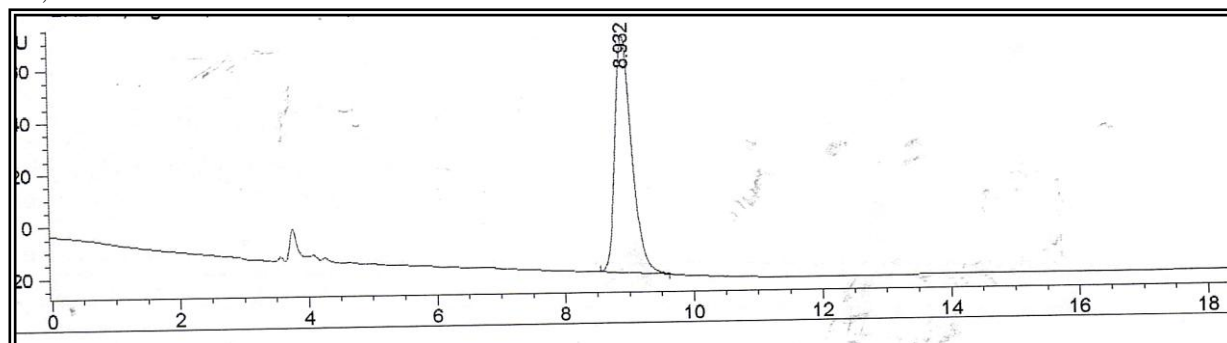
ANEXO 64 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com propanoato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 30°, 6h, 0,15M



ANEXO 65 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com propanoato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 3h, 0,15M

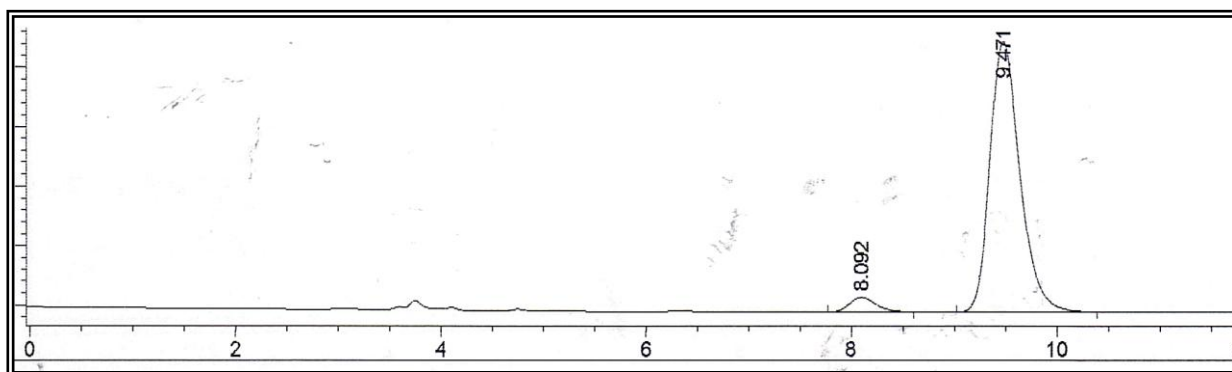


ANEXO 66 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com propanoato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 24h

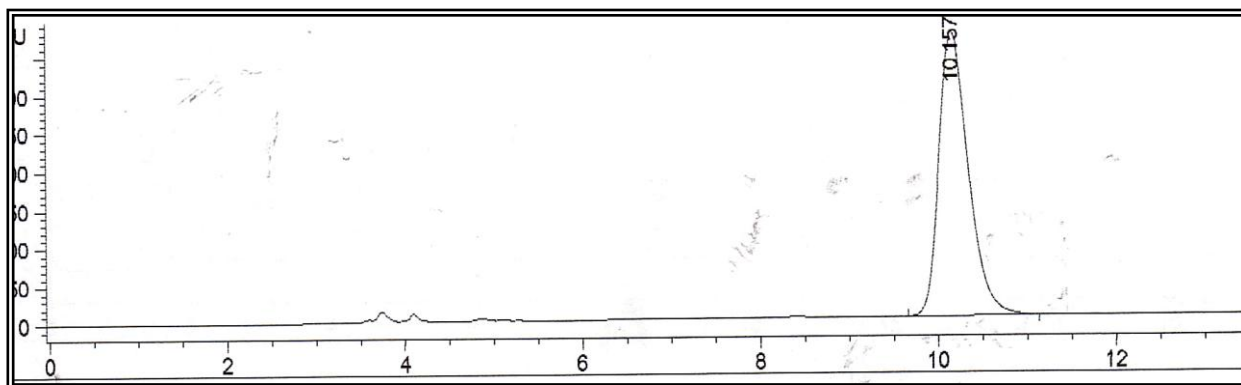




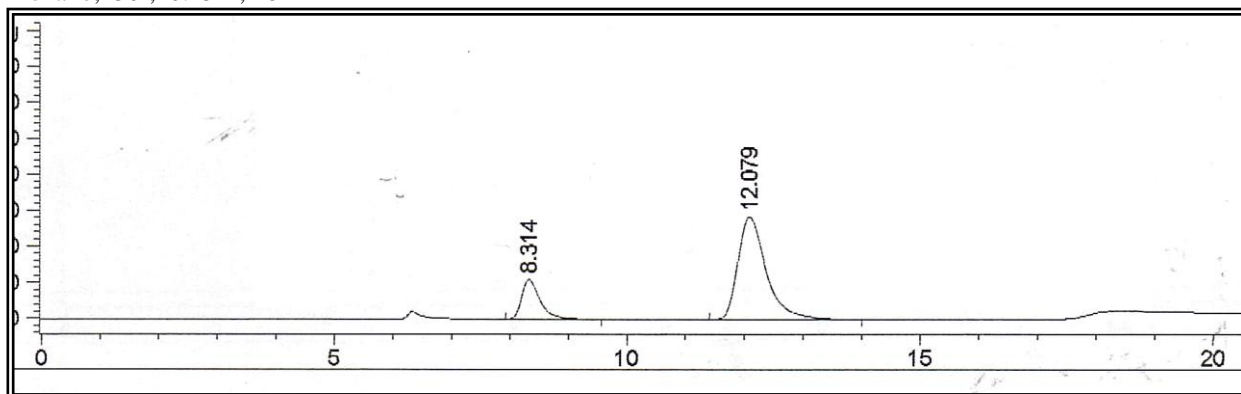
ANEXO 67 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com propanoato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 30°, 30h



ANEXO 68 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com propanoato de vinilo, PSL-C (Amano), Dioxano, 30°, 30h

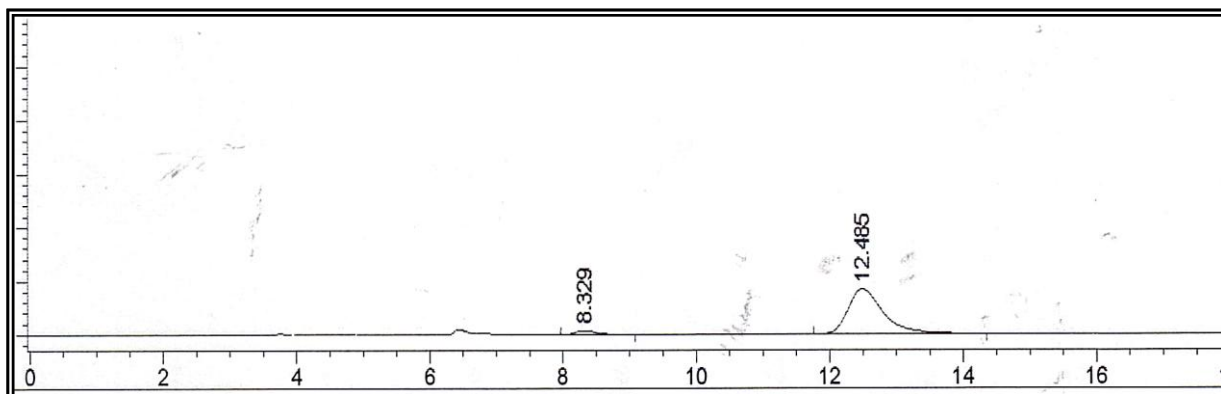


ANEXO 69 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com crotonato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 30°, 0.15M, 48h

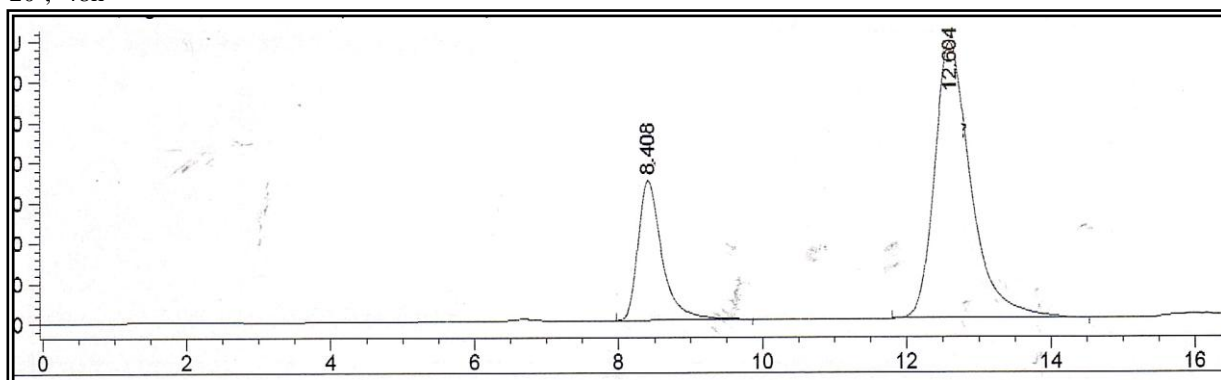




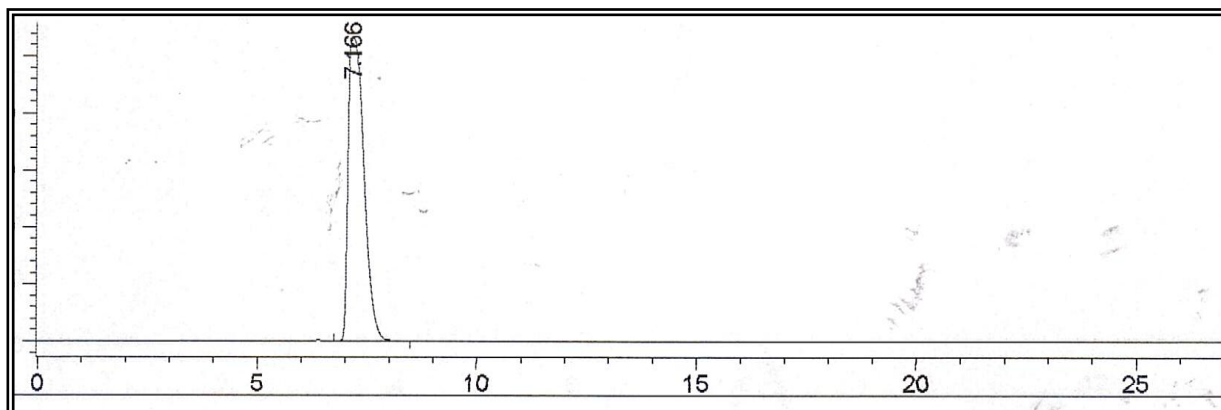
ANEXO 70 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com crotonato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 0.15M, 9h



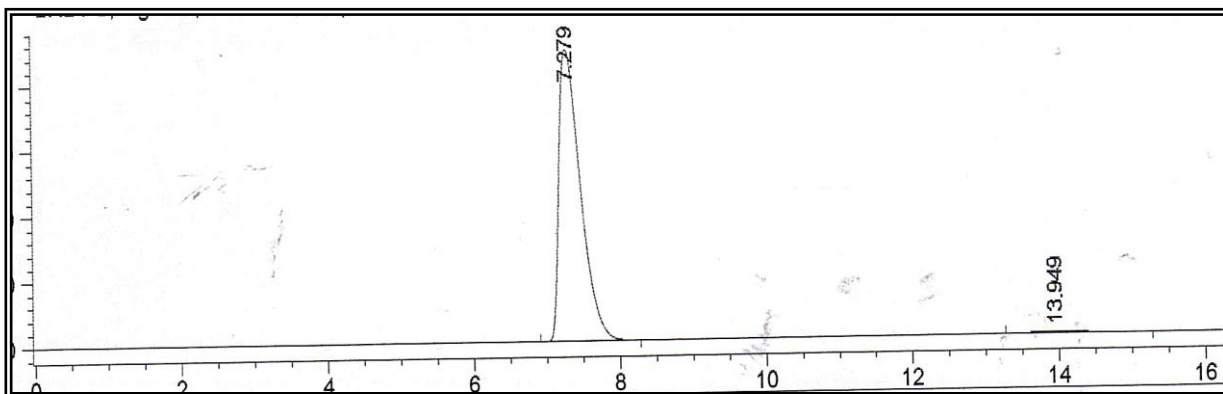
ANEXO 71 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com crotonato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 48h



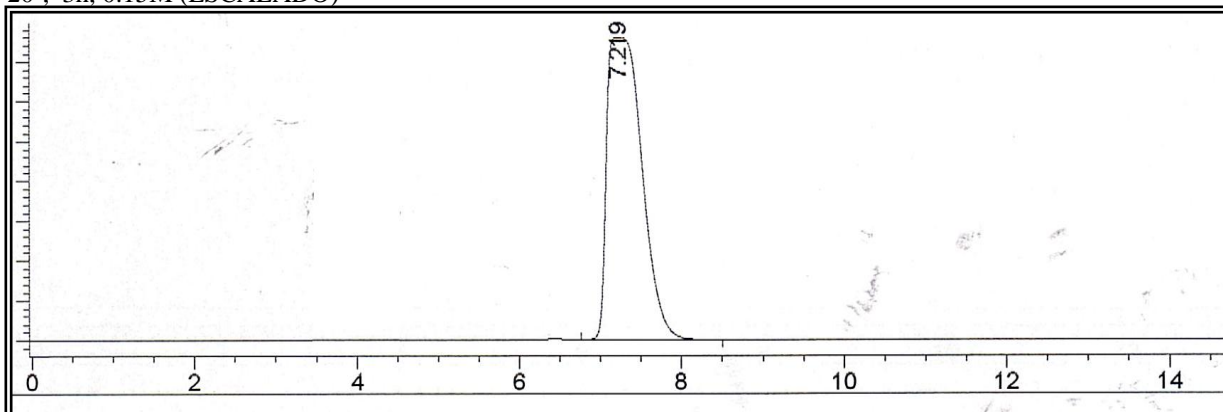
ANEXO 72 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 3h, 0.15M



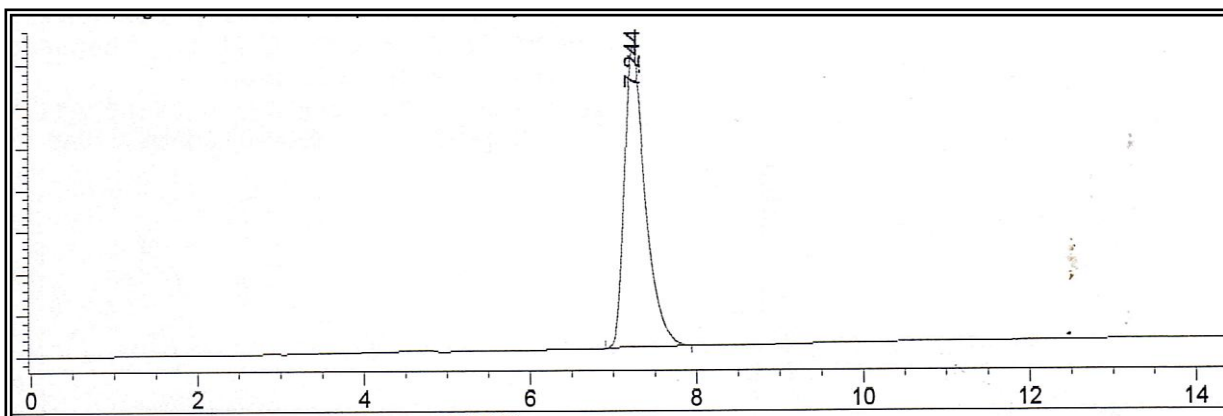
ANEXO 73 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, PL-C (I), Dioxano, 30°, 3h, 0.15M



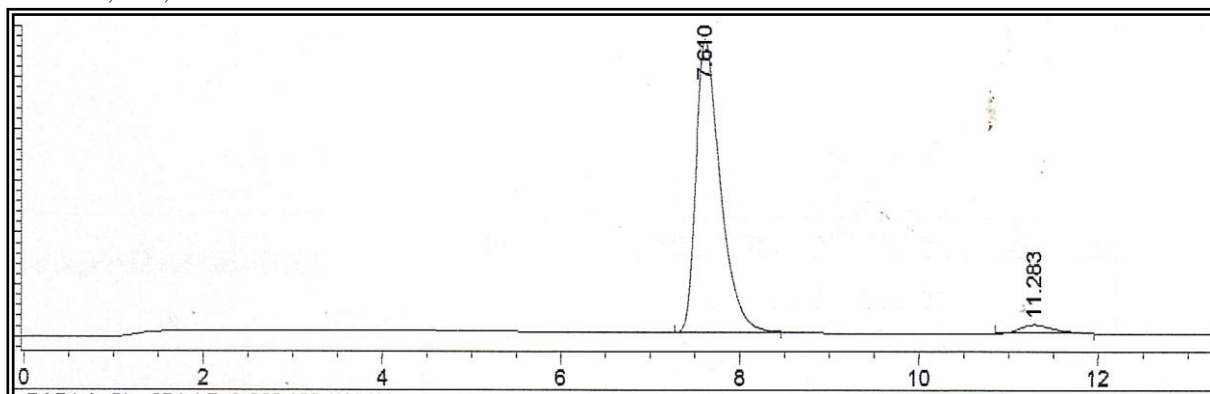
ANEXO 74 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, CAL-B, CH3CN, 20°, 3h, 0.15M (ESCALADO)



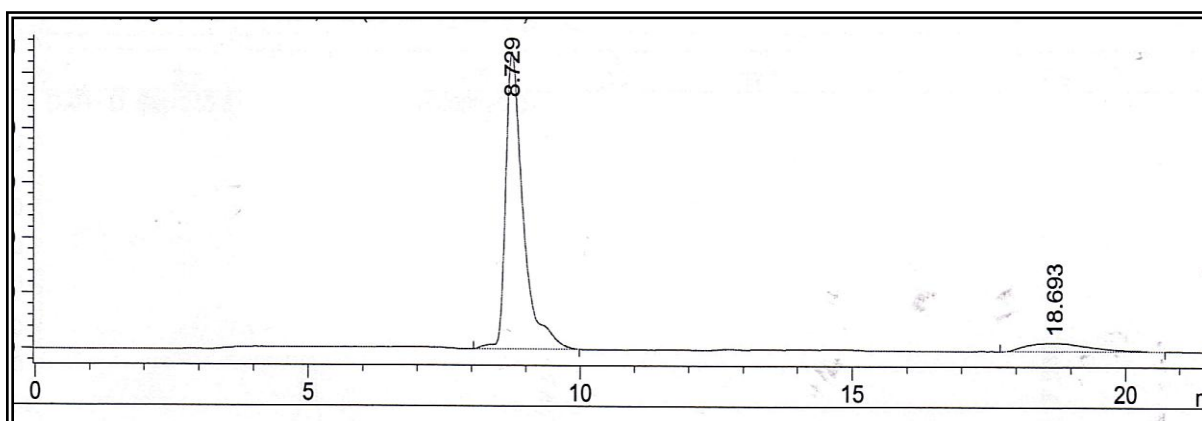
ANEXO 75 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, CAL-B, CH3CN, 20°, 24h



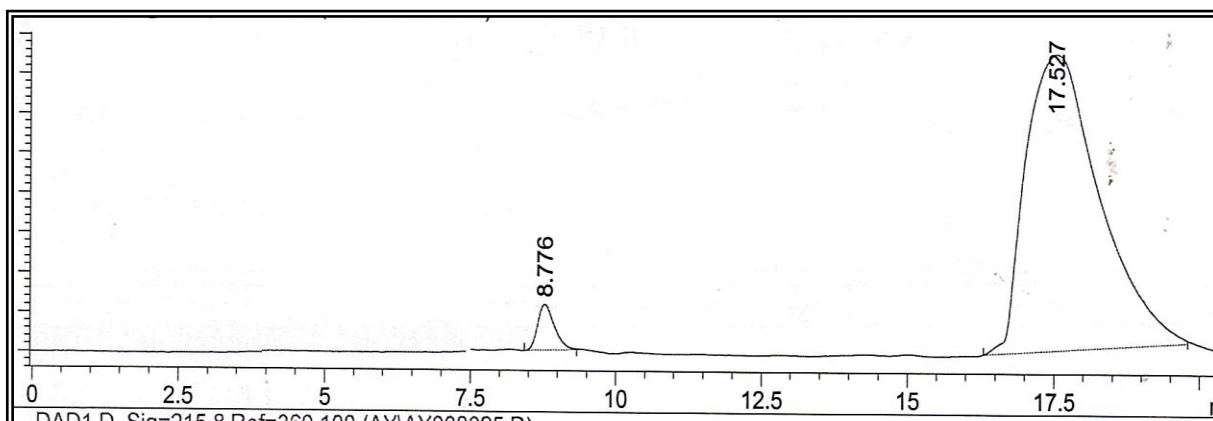
ANEXO 76 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, PSL-C (I), CH<sub>3</sub>CN, 30°, 30h



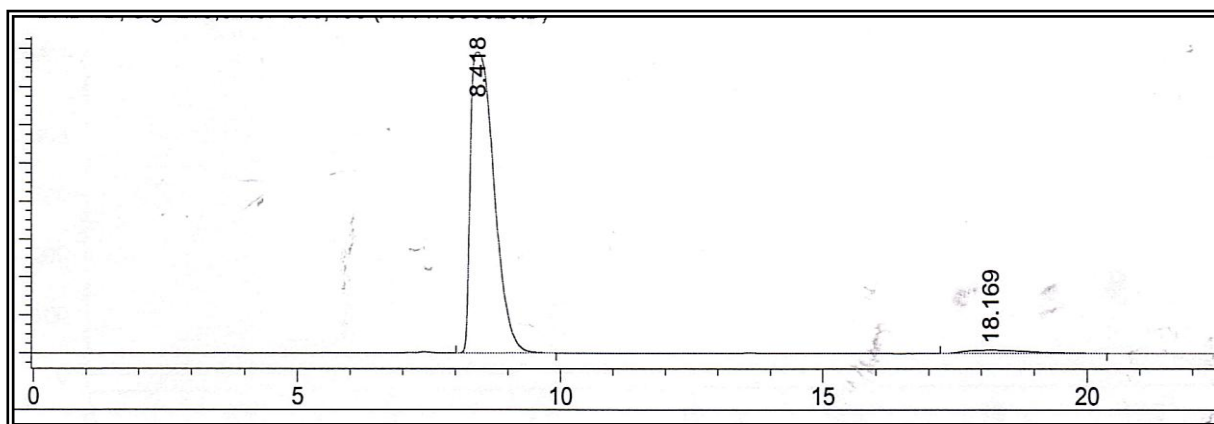
ANEXO 77 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 30°, 48h



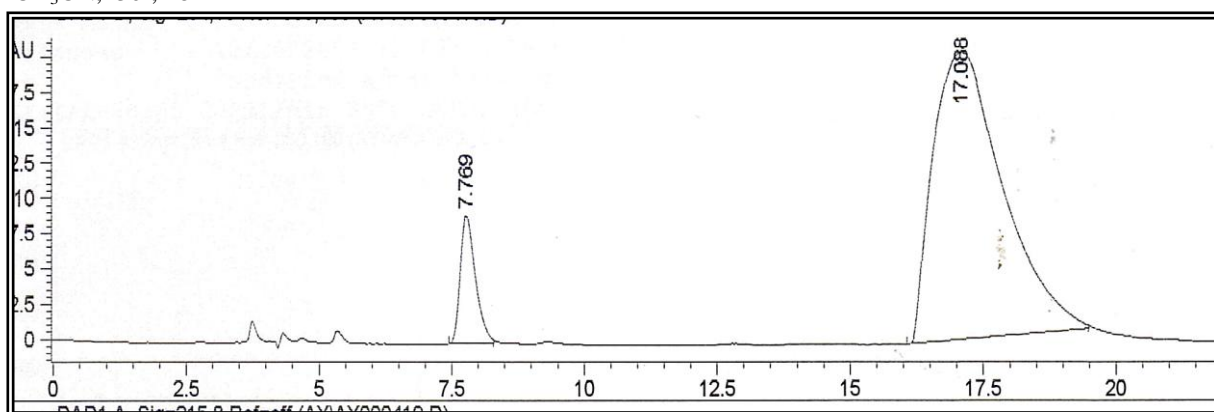
ANEXO 78 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, PSL-C (Amano), Dioxano, 30°, 48h



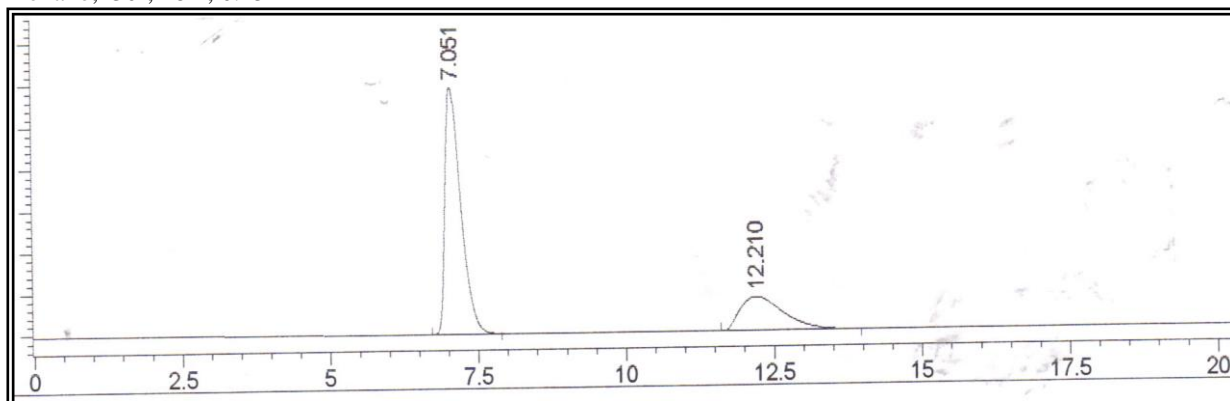
ANEXO 79 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, CAL-B, 0.25M, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 1h



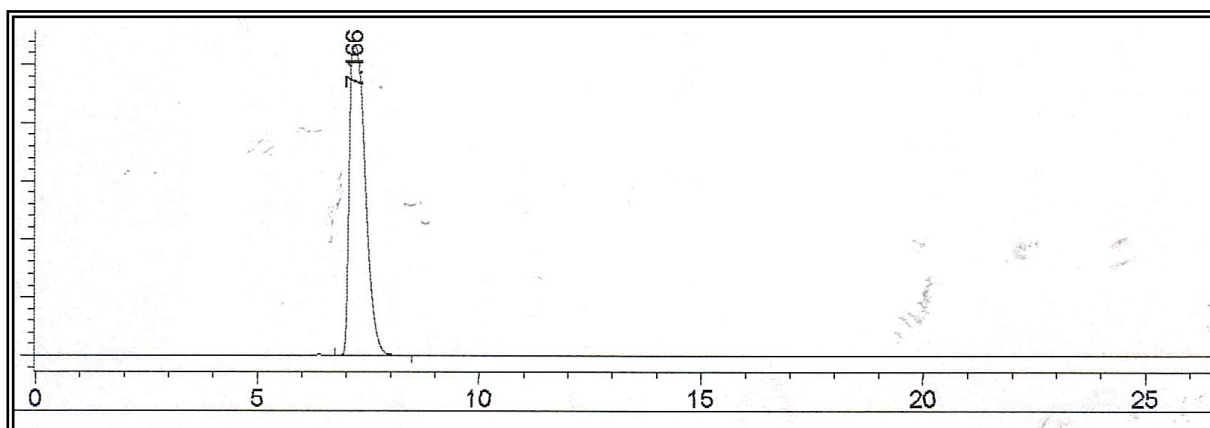
ANEXO 80 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, PSL-C (Amano), CH<sub>3</sub>CN, 30°, 48 h



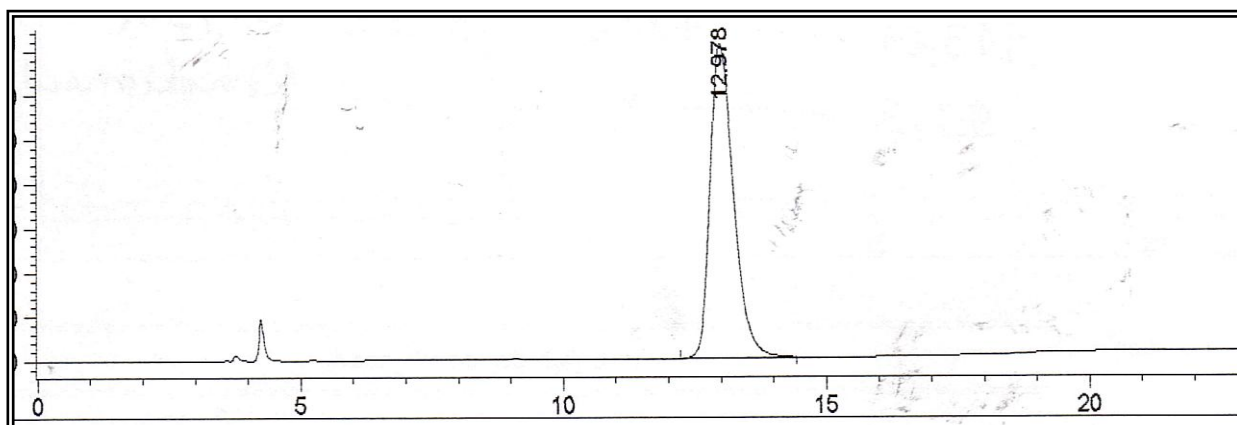
ANEXO 81 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, PSL-C (Amano), Dioxano, 30°, 48 h, 0.15M



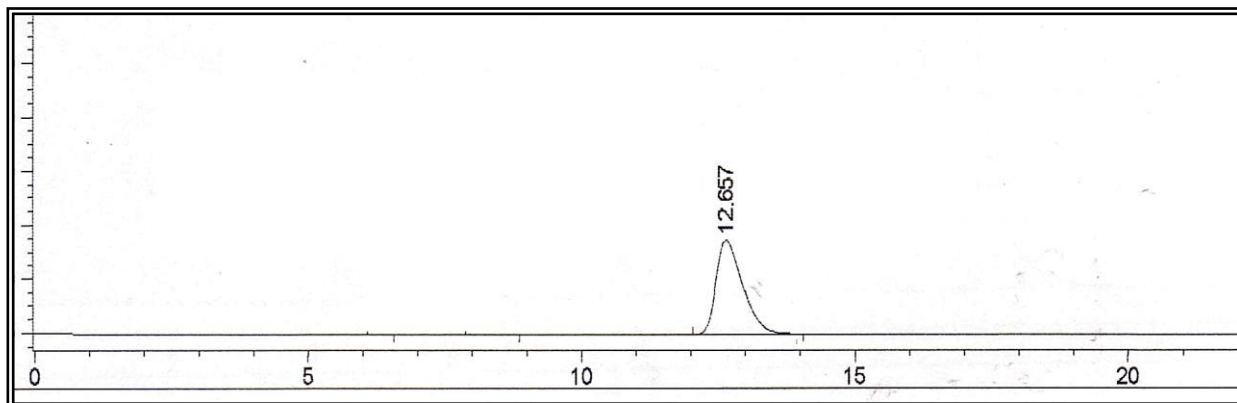
ANEXO 82 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com palmitato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 3h, 0.15M



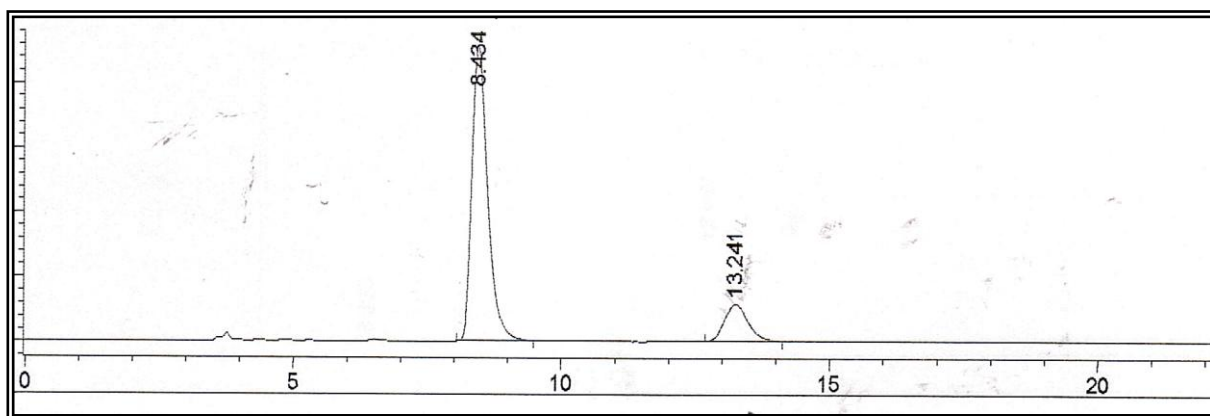
ANEXO 83 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com acetato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 3h, 0.15M (ESCALADO)



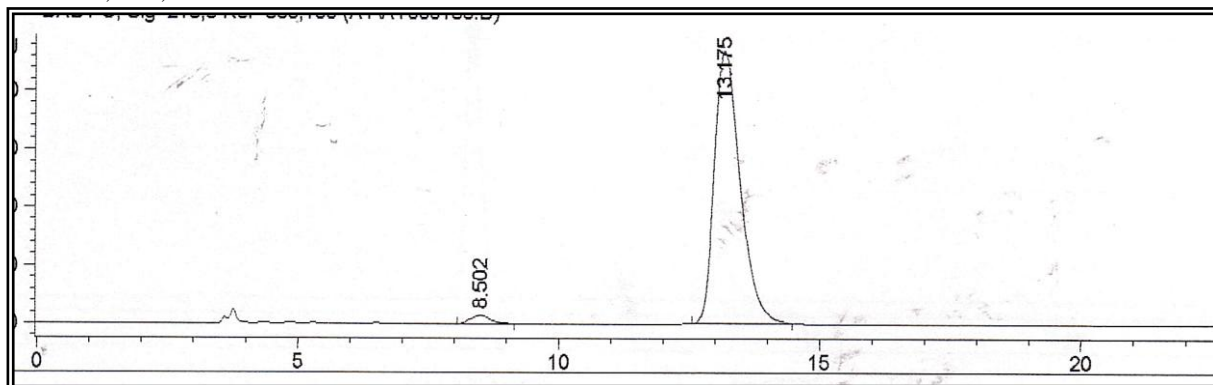
ANEXO 84 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com acetato de vinilo, CAL-B, CH<sub>3</sub>CN, 20°, 40h



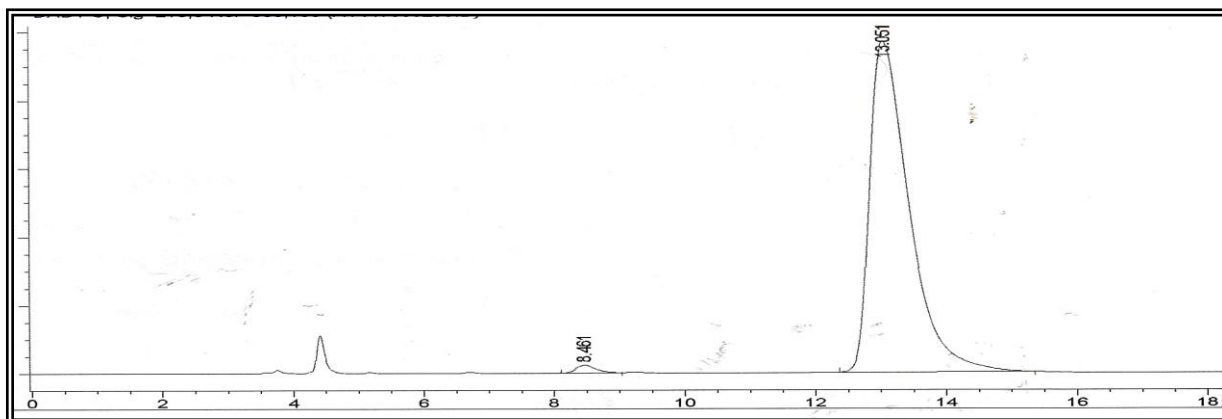
ANEXO 85 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com acetato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 30°, 40h



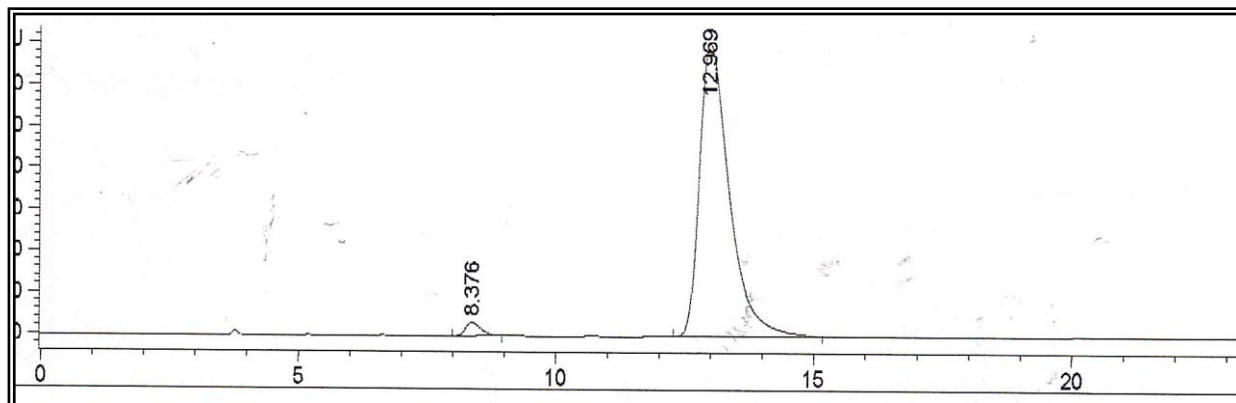
ANEXO 86 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com acetato de vinilo, PSL-C (Amano), Dioxano, 30°, 40h



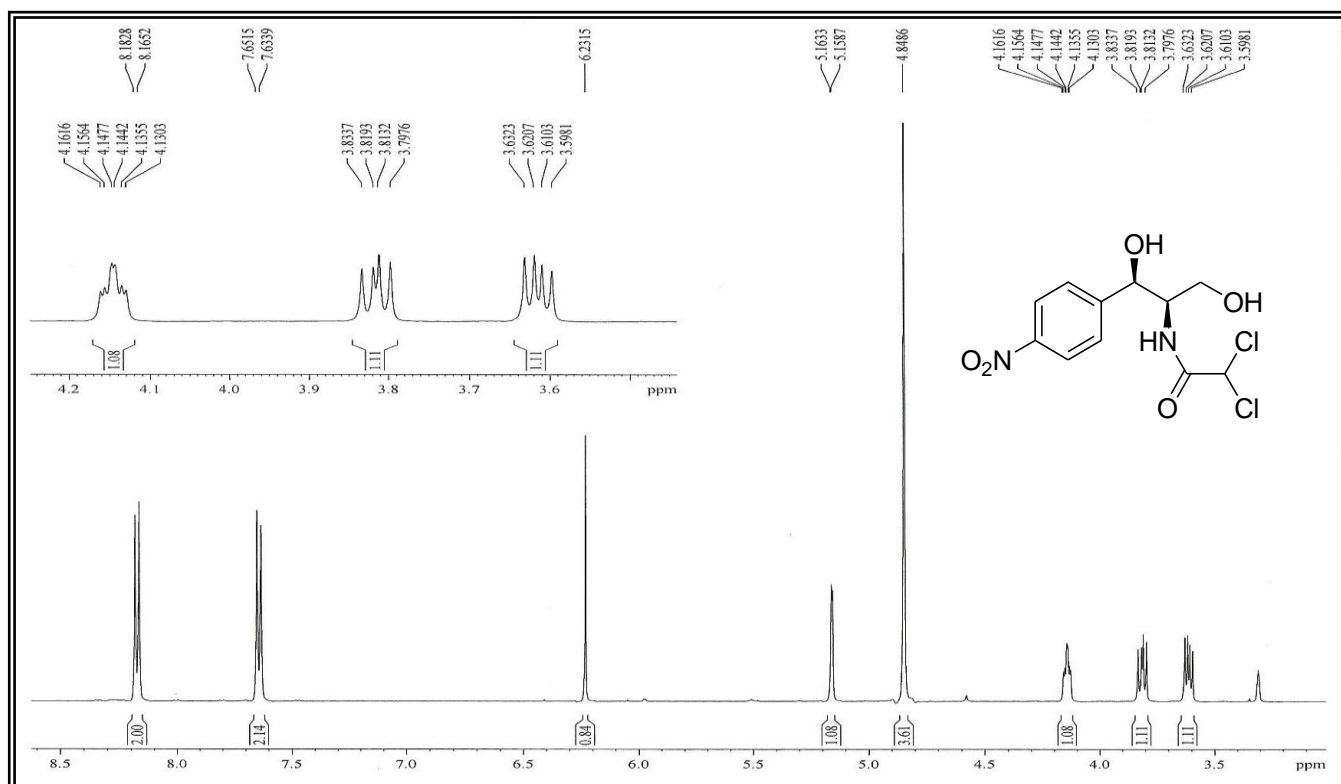
ANEXO 87 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com acetato de vinilo, PSL-C (I), Dioxano, 30°, 6h, 0.15M

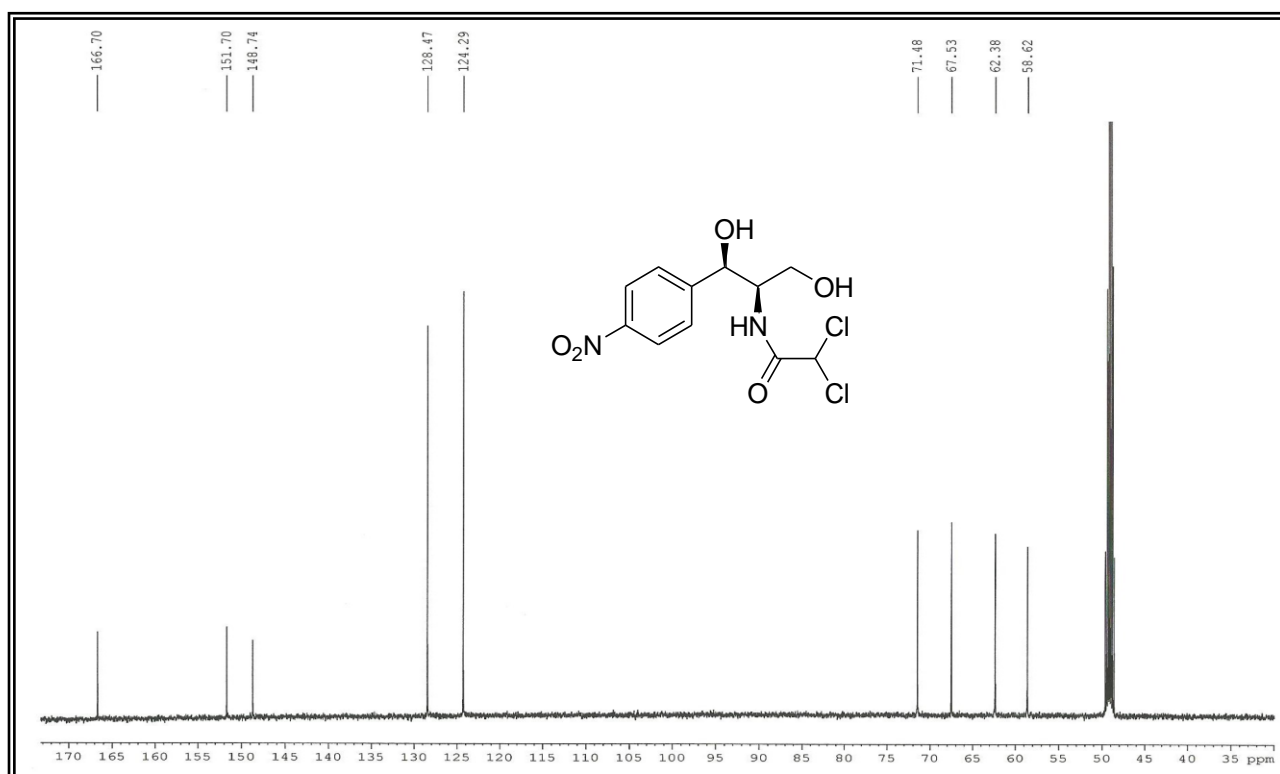
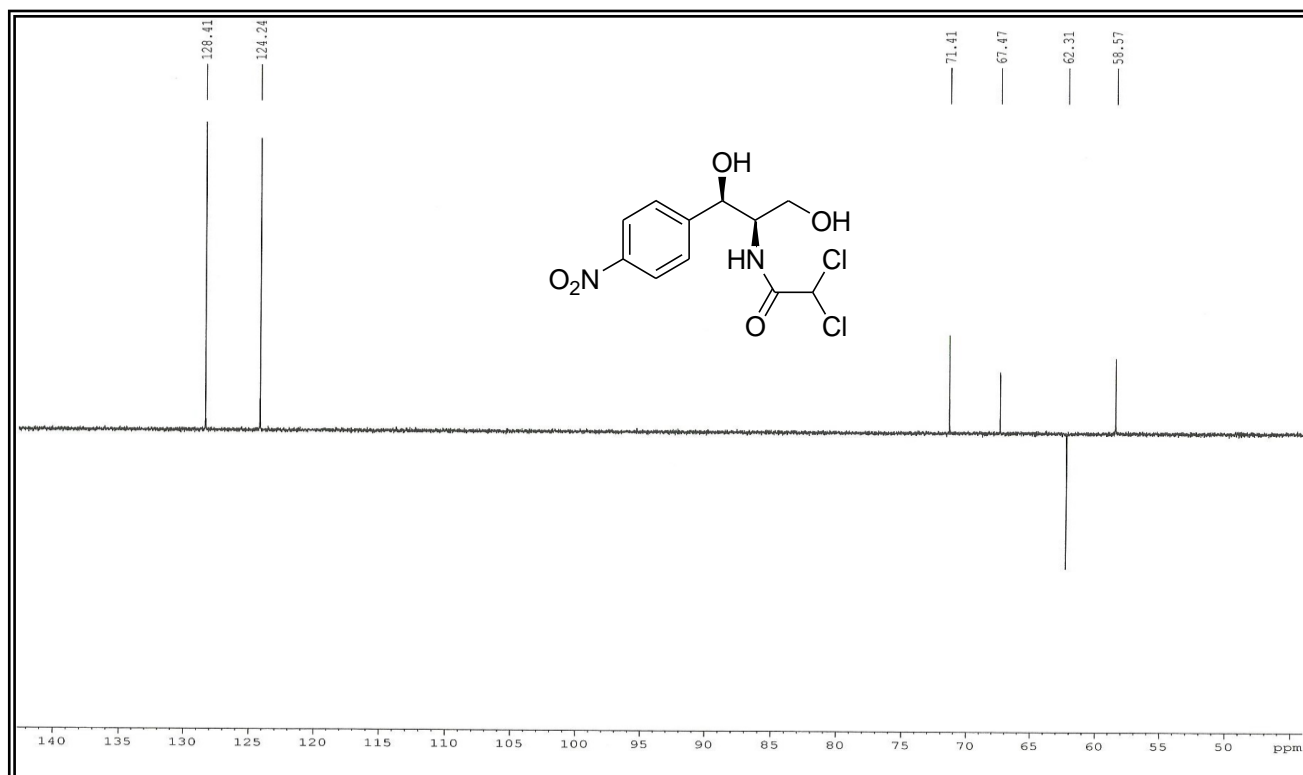


ANEXO 88 – Cromatograma de CLAE da acilação de cloranfenicol com acetato de vinilo, PSL-C (Amano), Dioxano, 30°, 9h, 0.15M



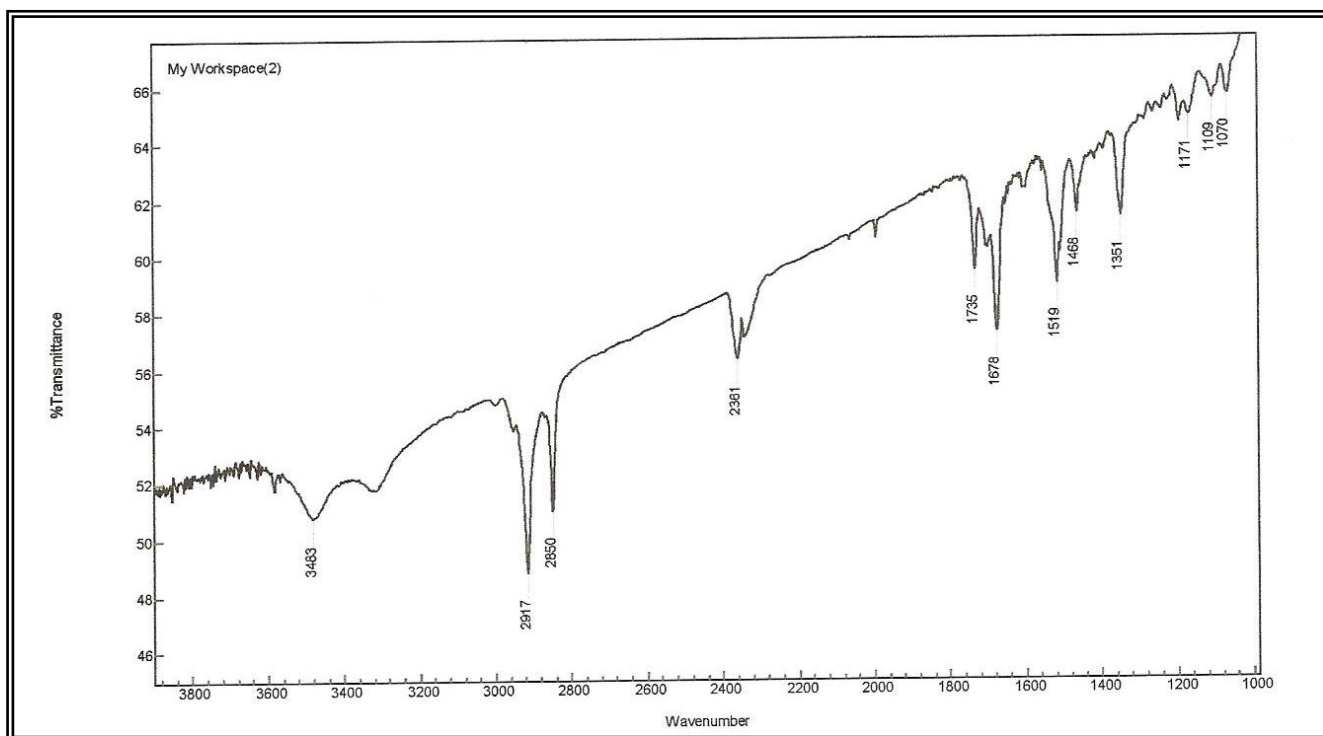
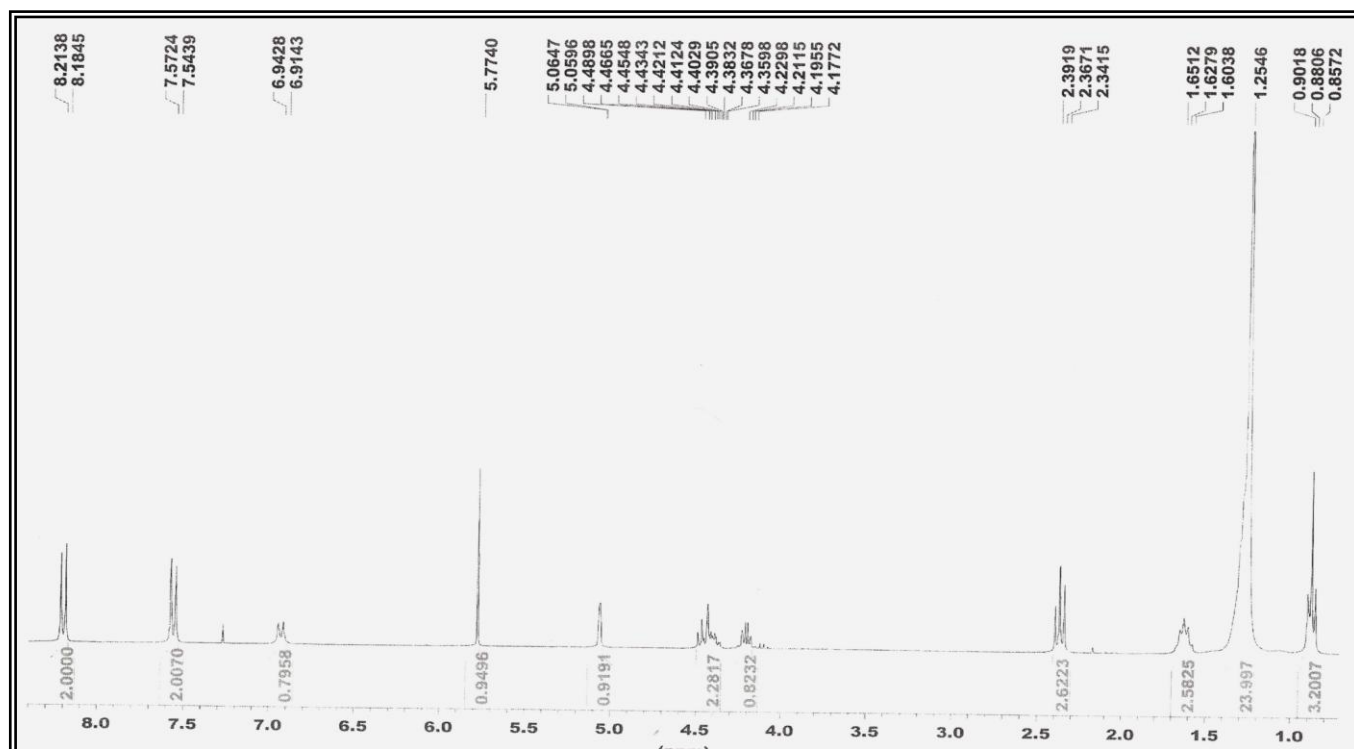
ANEXO 89 – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) de Cloranfenicol

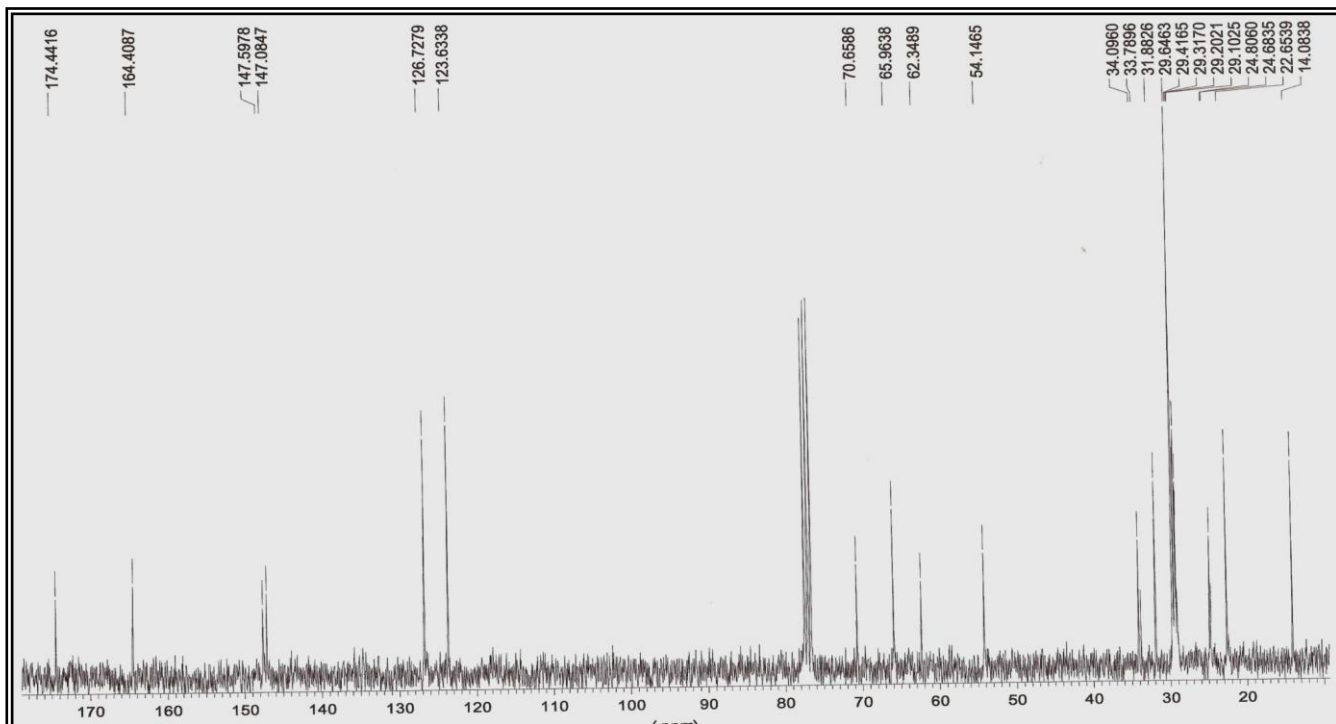
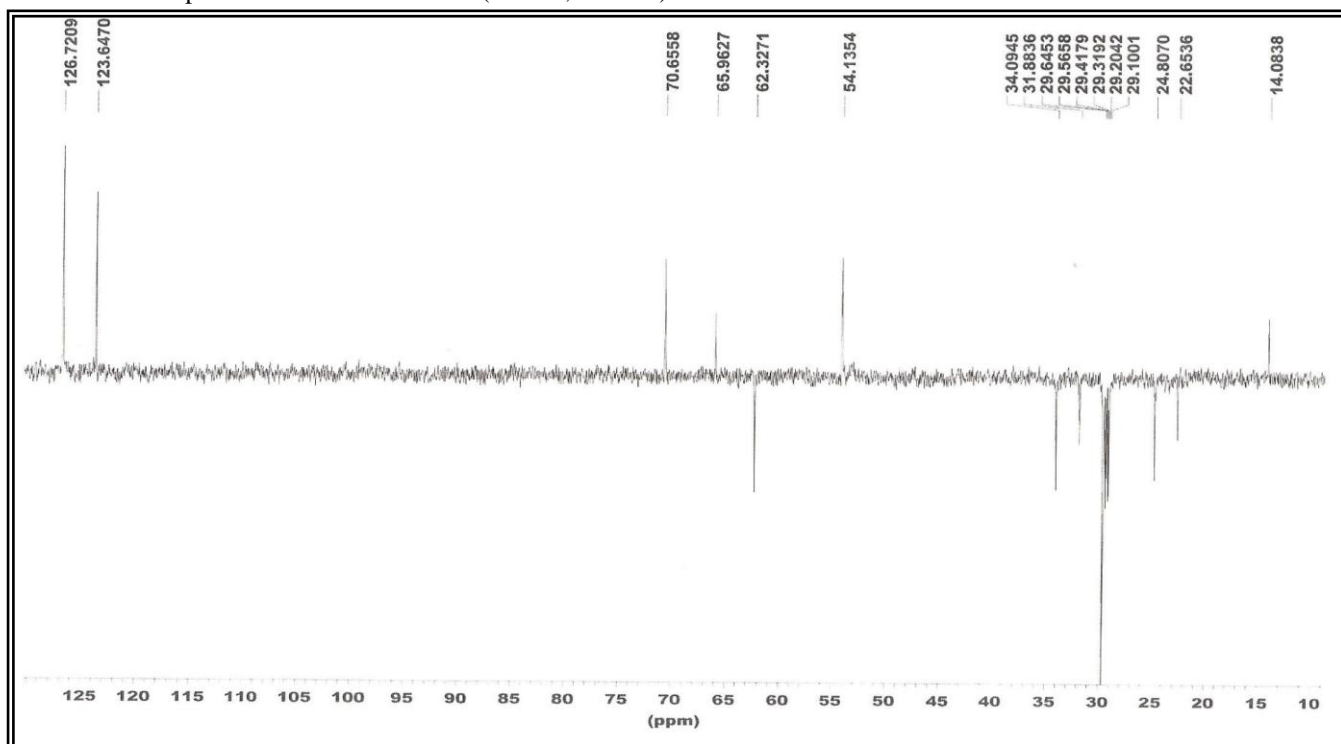


ANEXO 90 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de CloranfenicolANEXO 91 – Espectro de RMN DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de Cloranfenicol

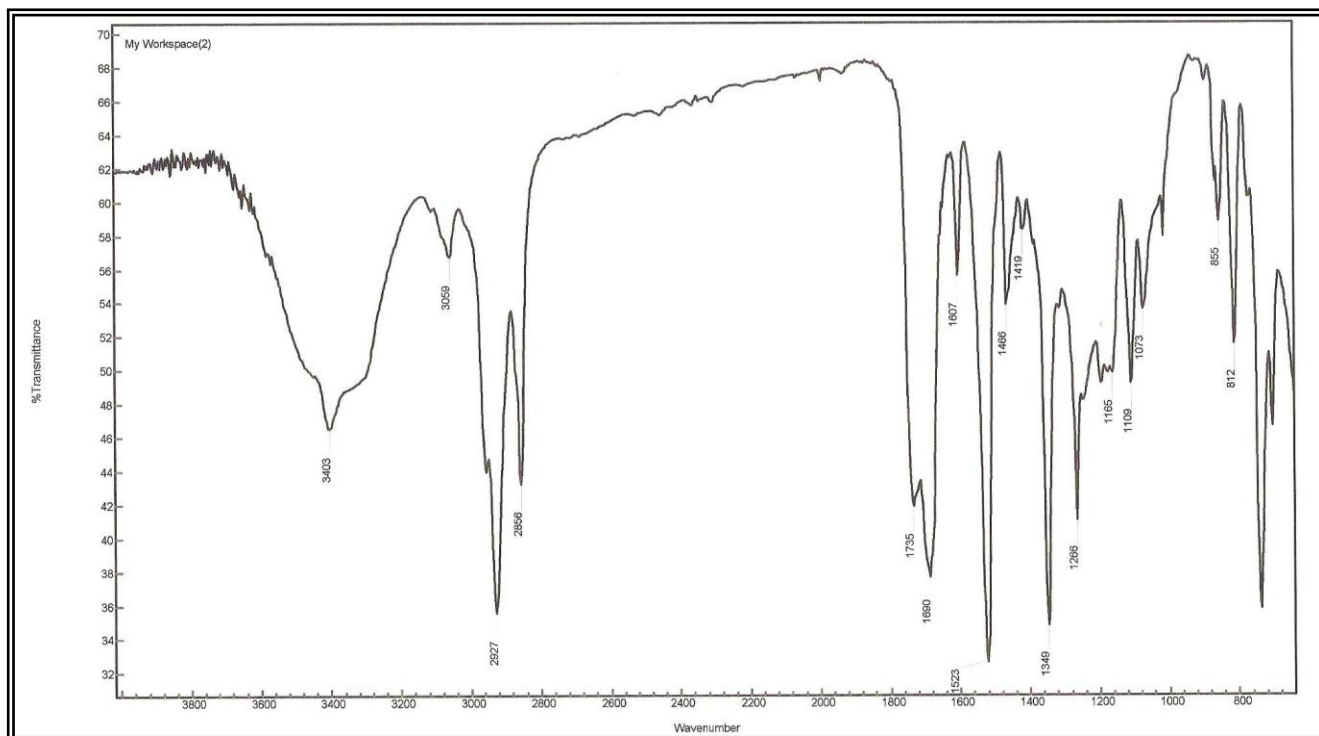
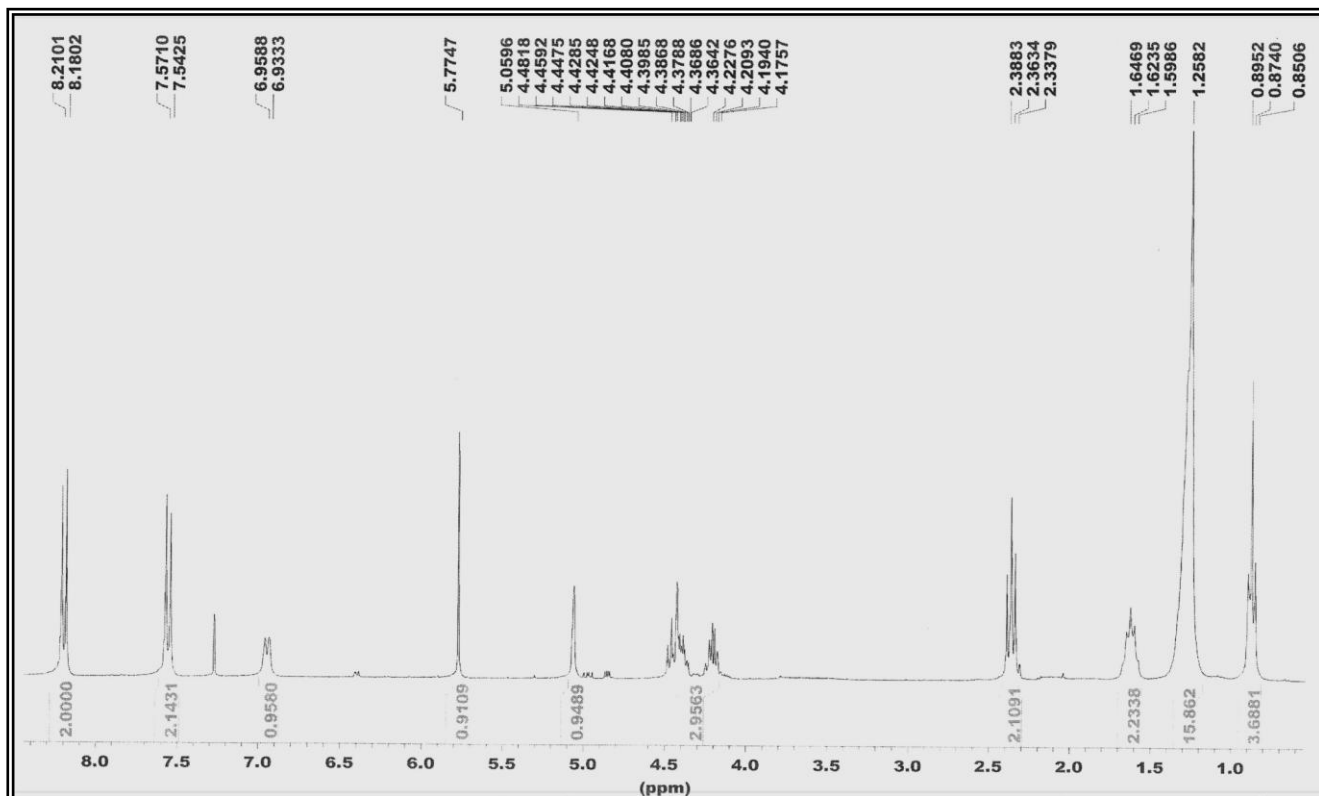


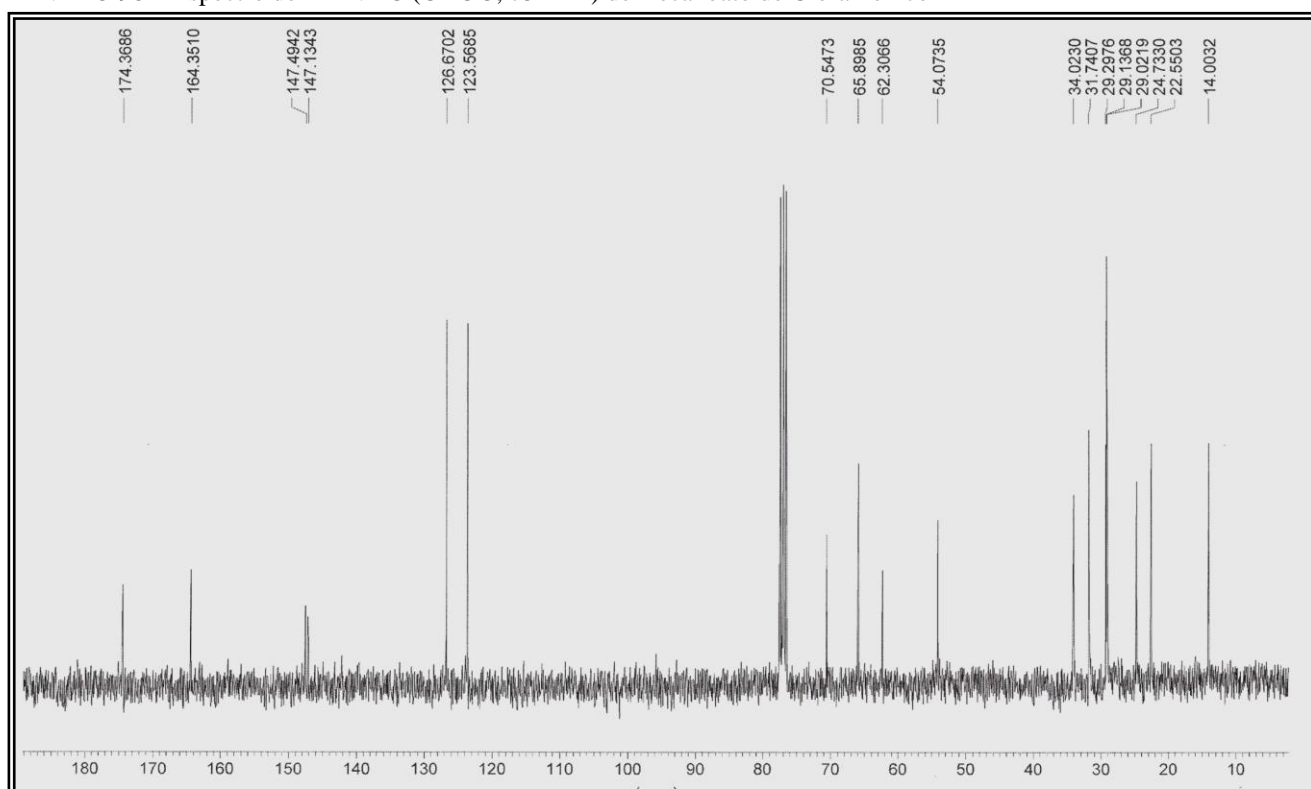
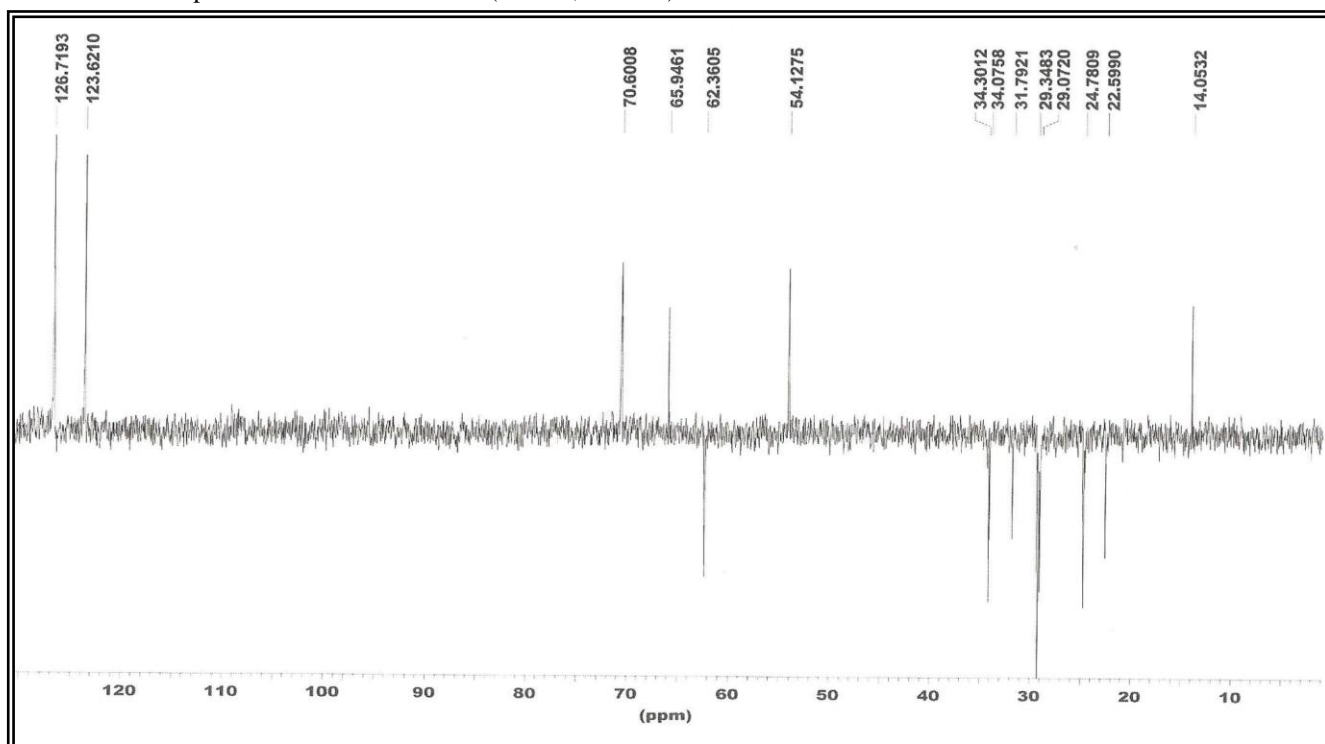
## ANEXO 92 – Espectro de IV de Palmitato de Cloranfenicol

ANEXO 93 – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) de Palmitato de Cloranfenicol

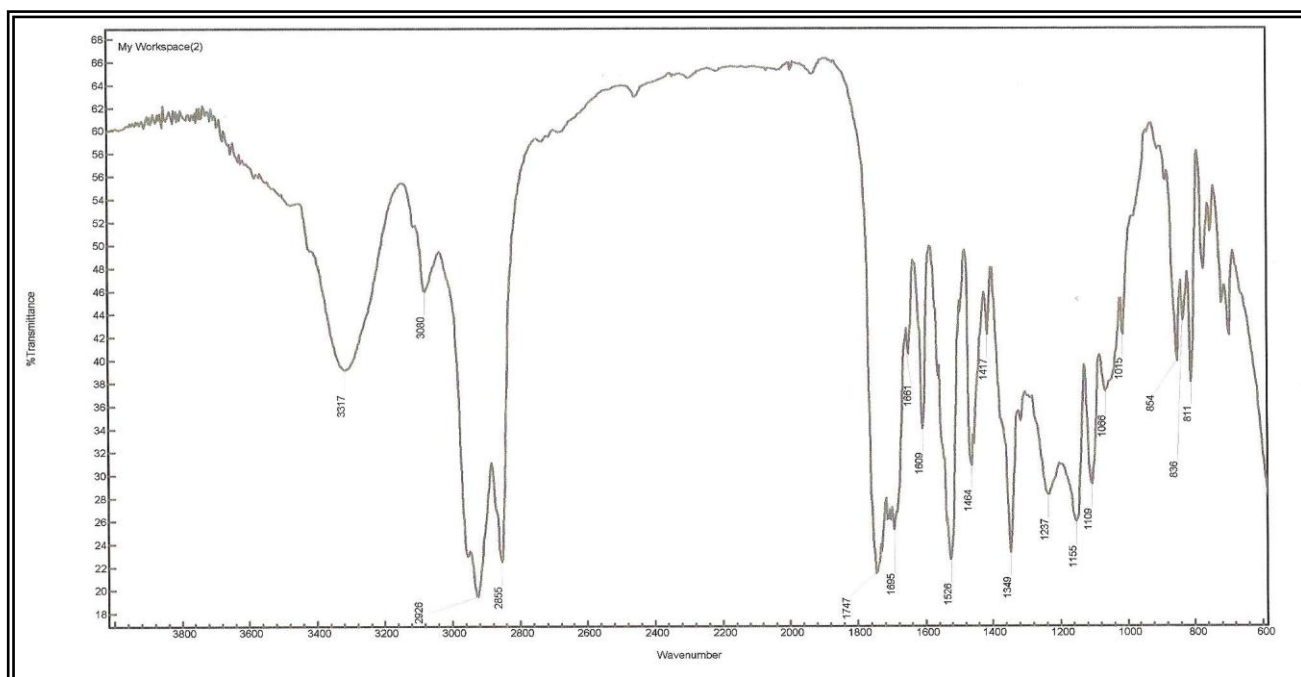
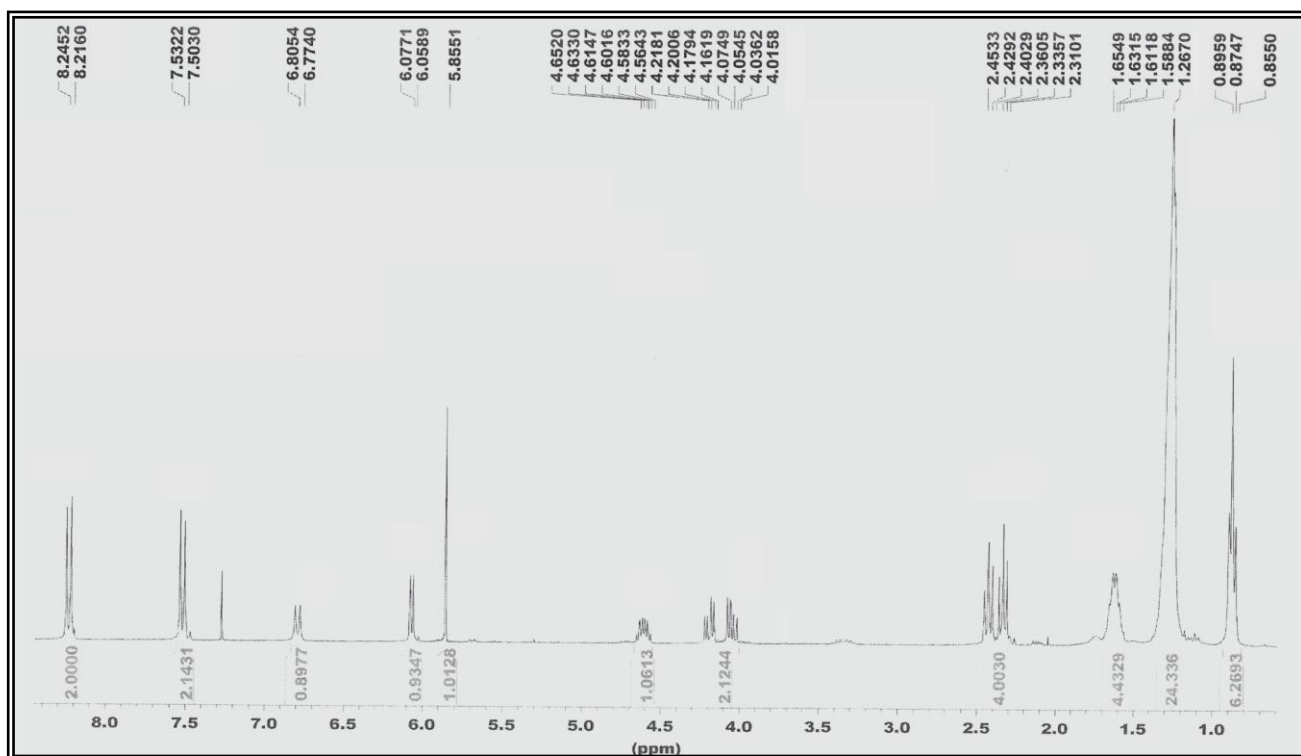
ANEXO 94 – Espectro de RMC  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de Palmitato de CloranfenicolANEXO 95 – Espectro de RMN DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de Palmitato de Cloranfenicol

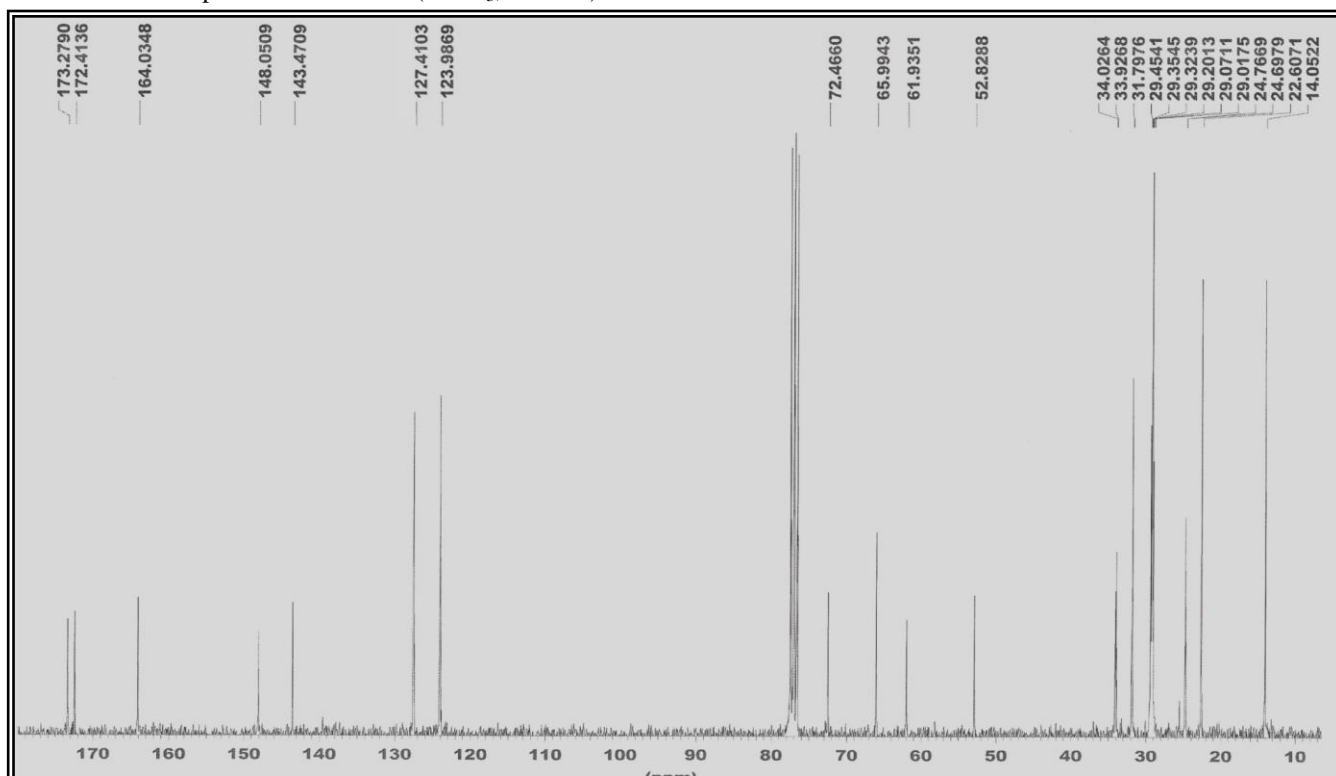
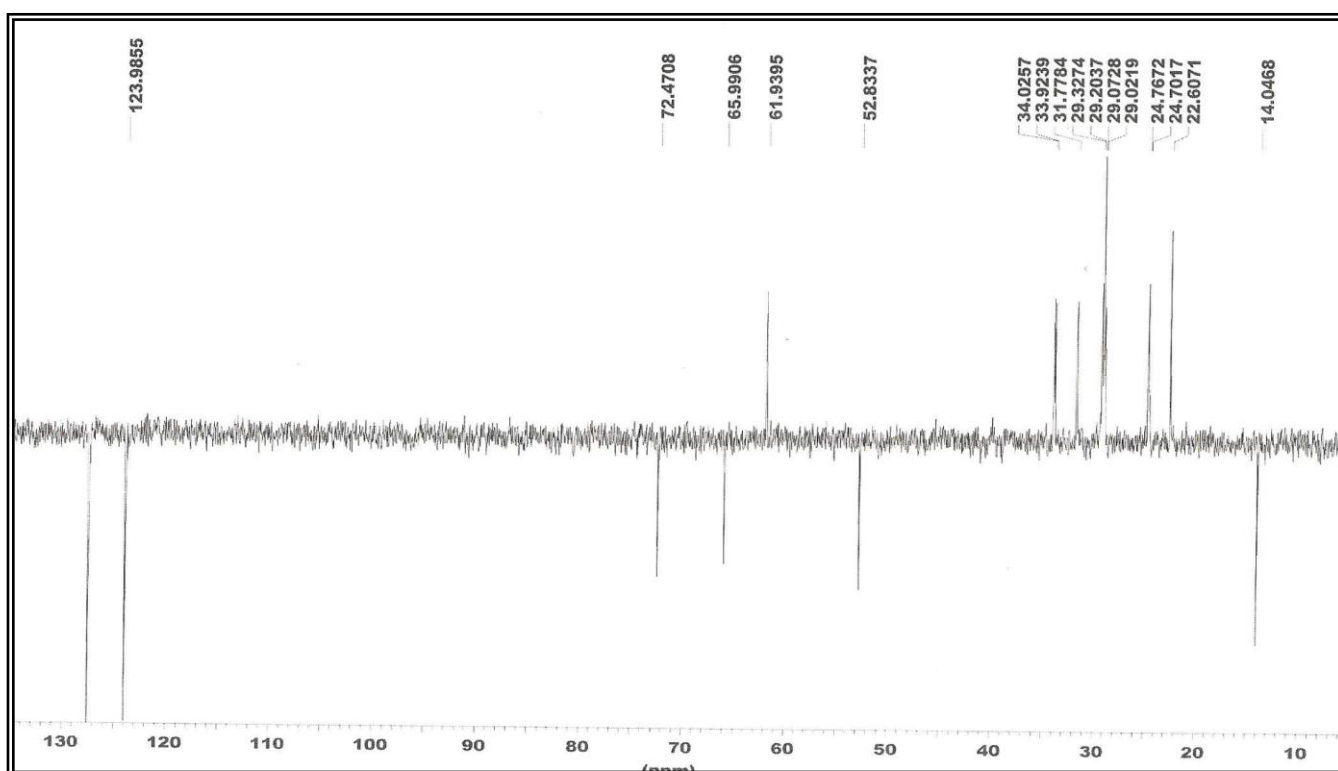
## ANEXO 96 – Espectro de IV de Decanoato de Cloranfenicol

ANEXO 97 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) de Decanoato de Cloranfenicol

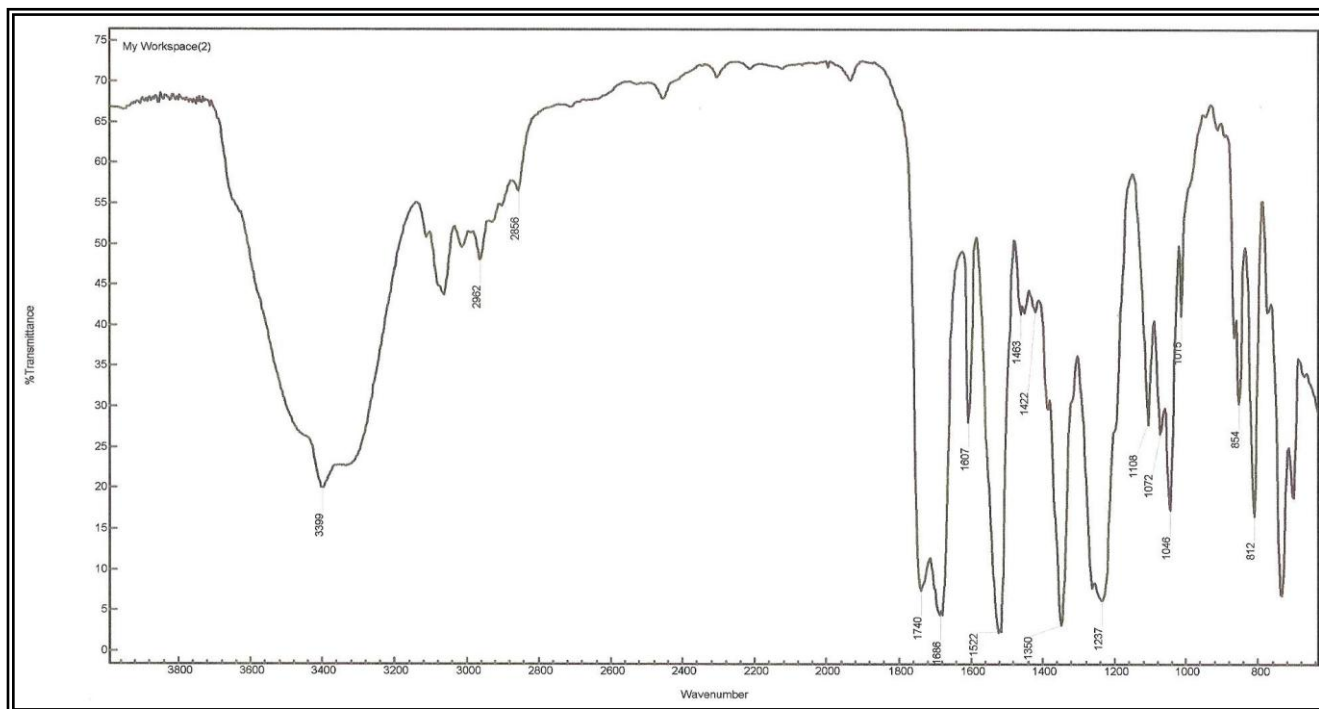
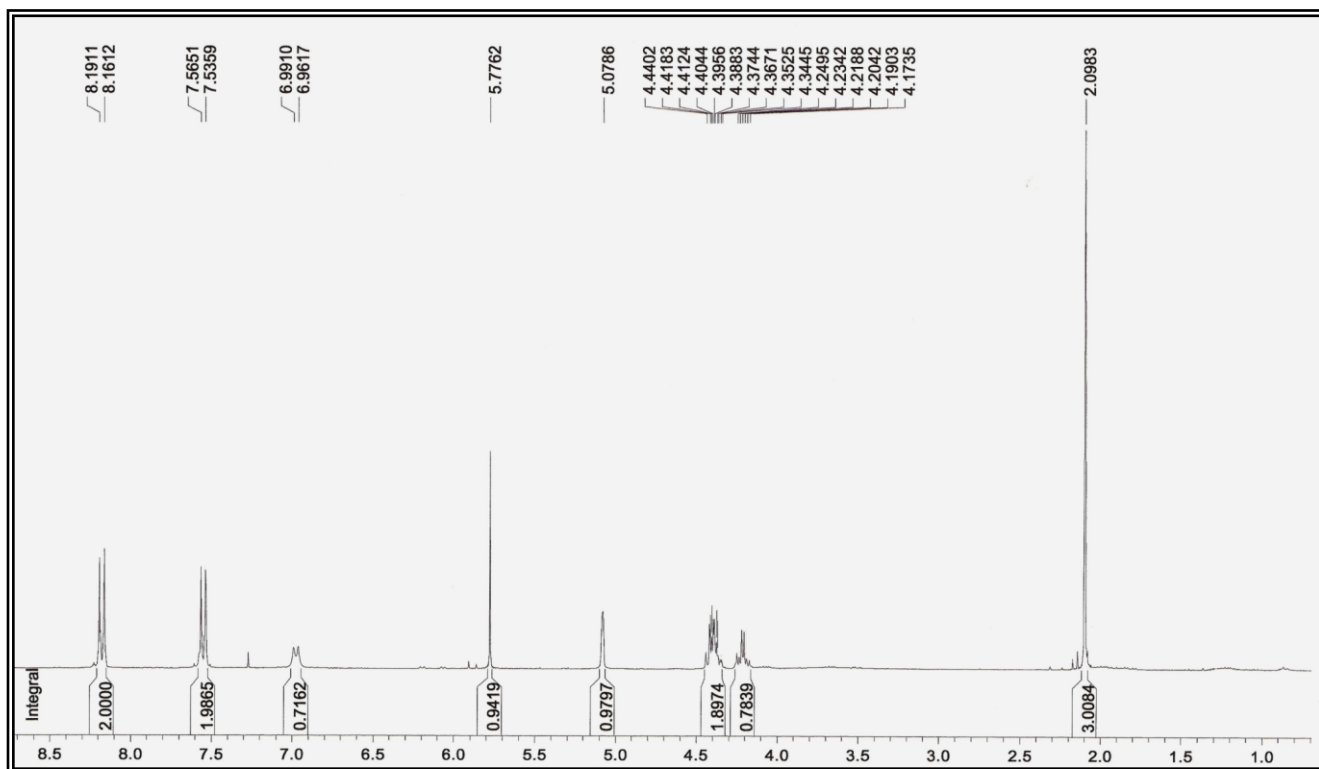
ANEXO 98 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de Decanoato de CloranfenicolANEXO 89 – Espectro de RMN DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de Decanoato de Cloranfenicol

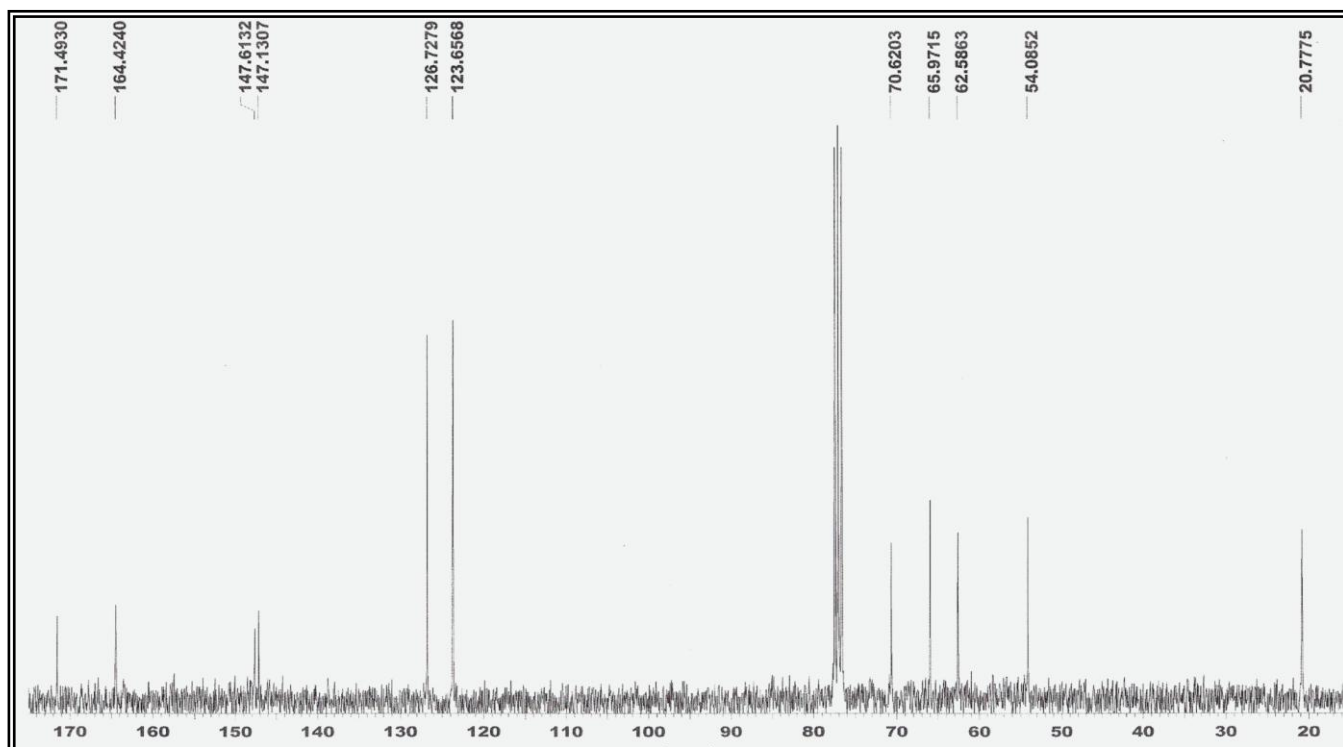
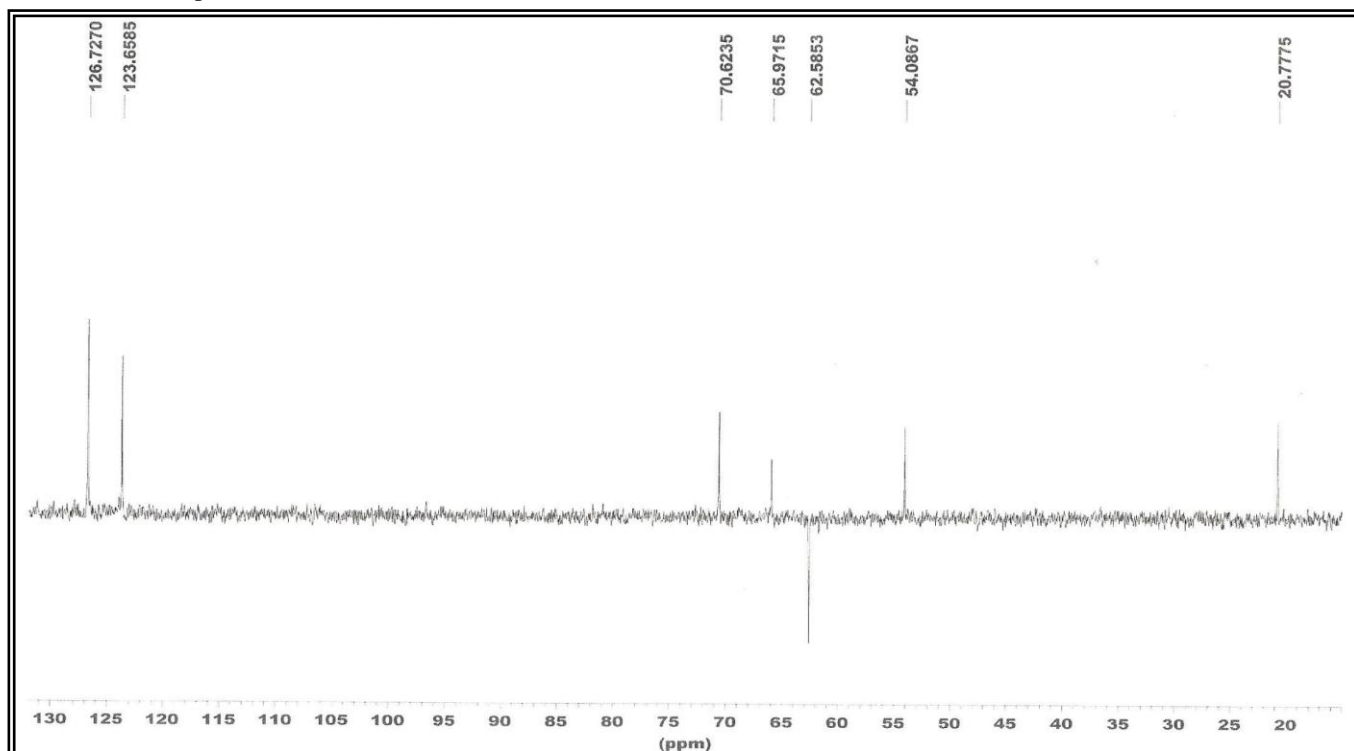
ANEXO 90 – Espectro de IV de Di-decanoato de Cloranfenicol

ANEXO 91 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) de Di-decanoato de Cloranfenicol

ANEXO 92 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de Di-decanoato de CloranfenicolANEXO 93 – Espectro de RMN DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de Di-decanoato de Cloranfenicol

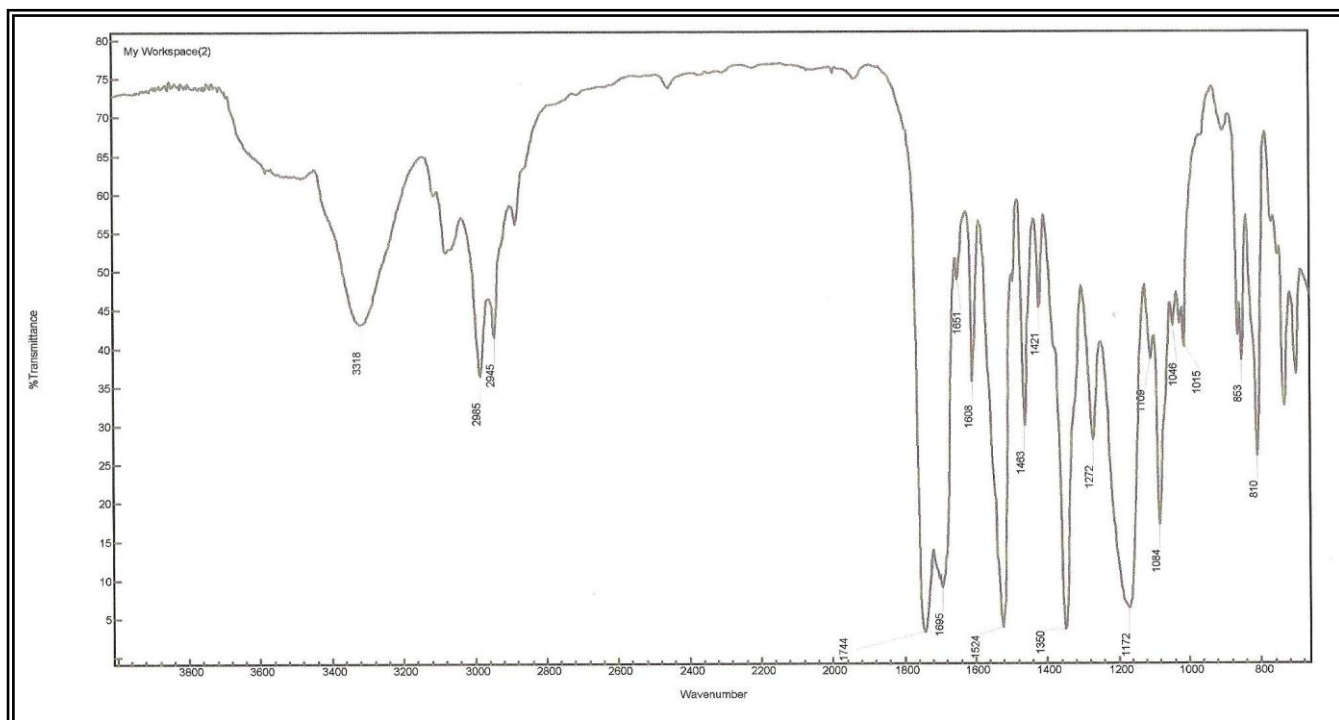
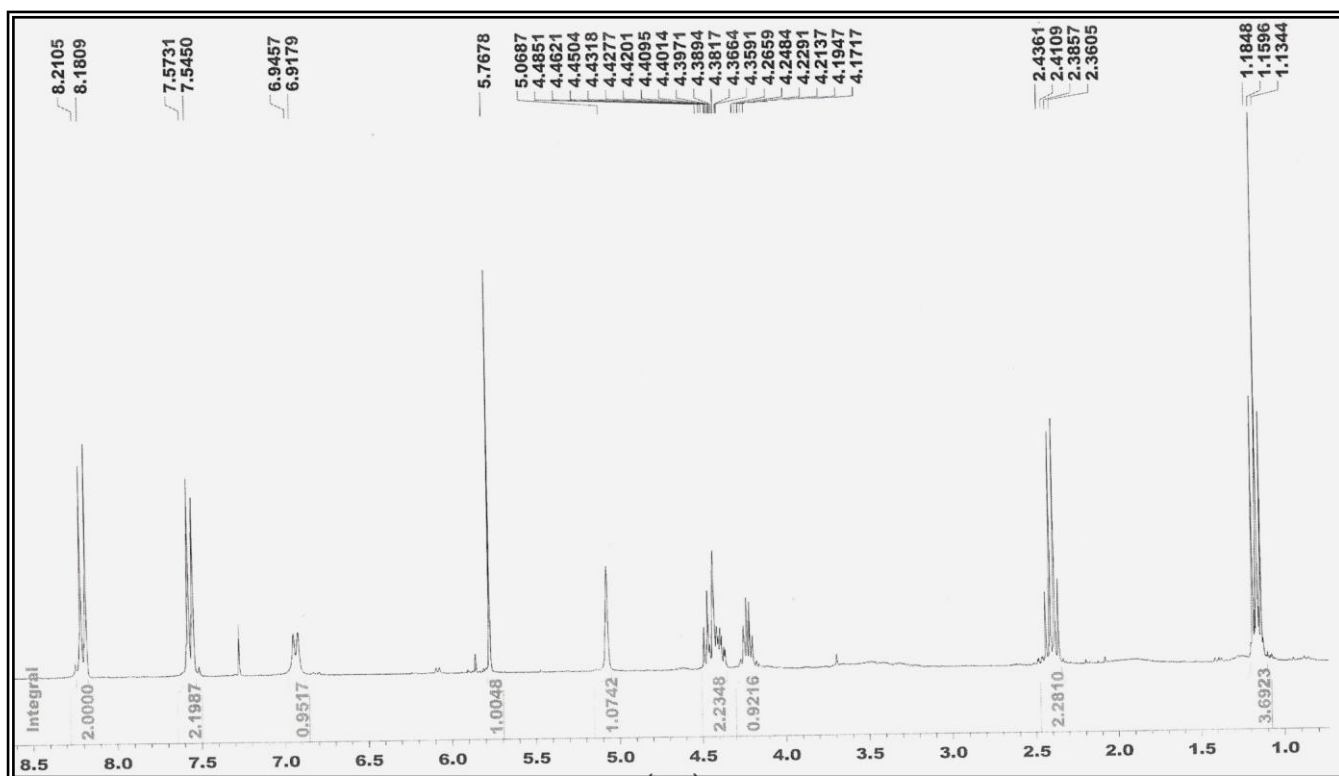
## ANEXO 94 – Espectro de IV de Acetato de Cloranfenicol

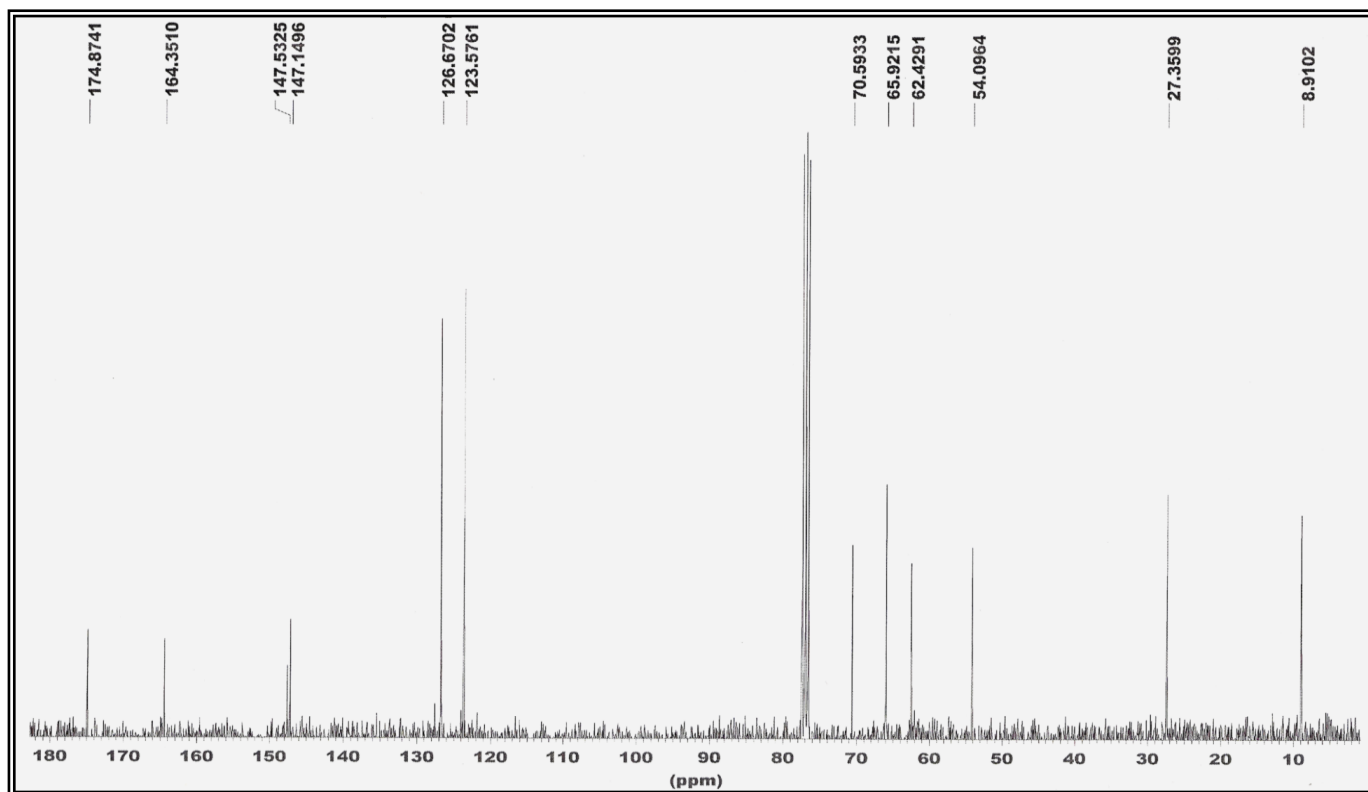
ANEXO 95 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) de Acetato de Cloranfenicol

ANEXO 96 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) de Acetato de CloranfenicolANEXO 97 – Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) de Acetato de Cloranfenicol

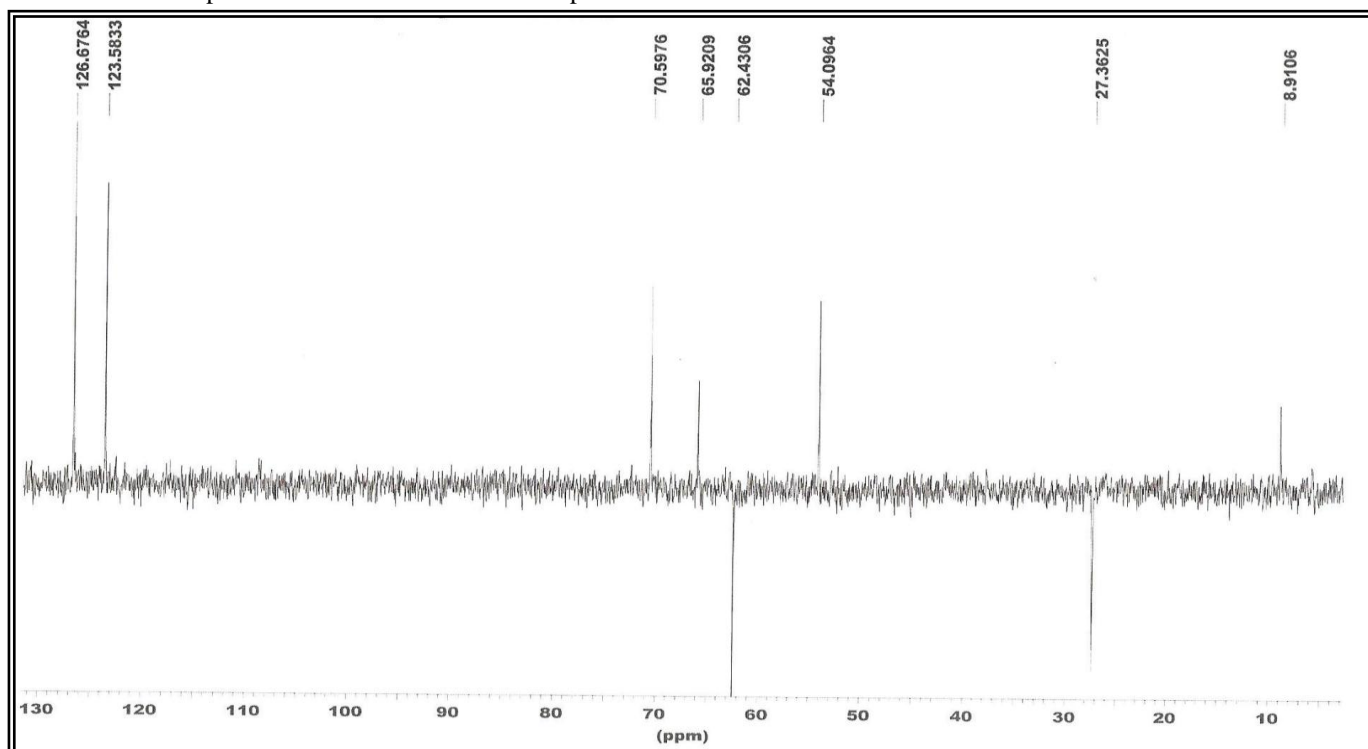


## ANEXO 98 – Espectro de IV de Propanoato de Cloranfenicol

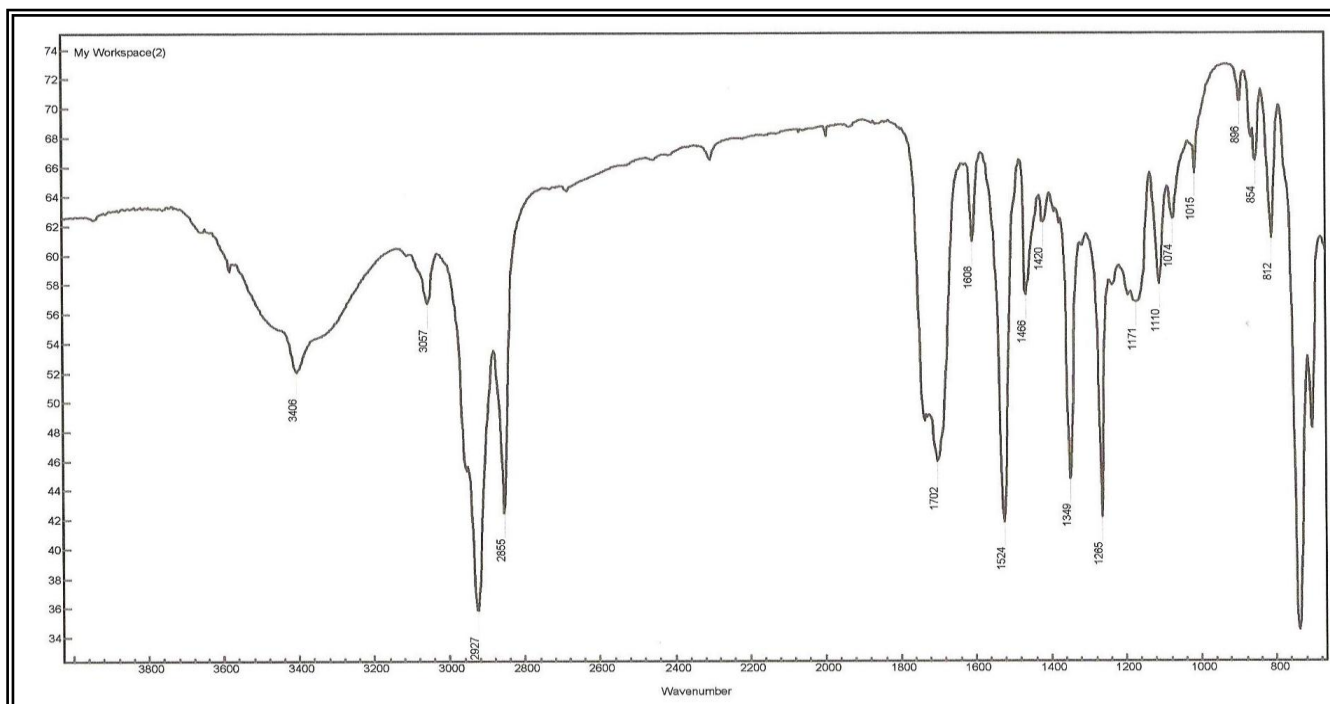
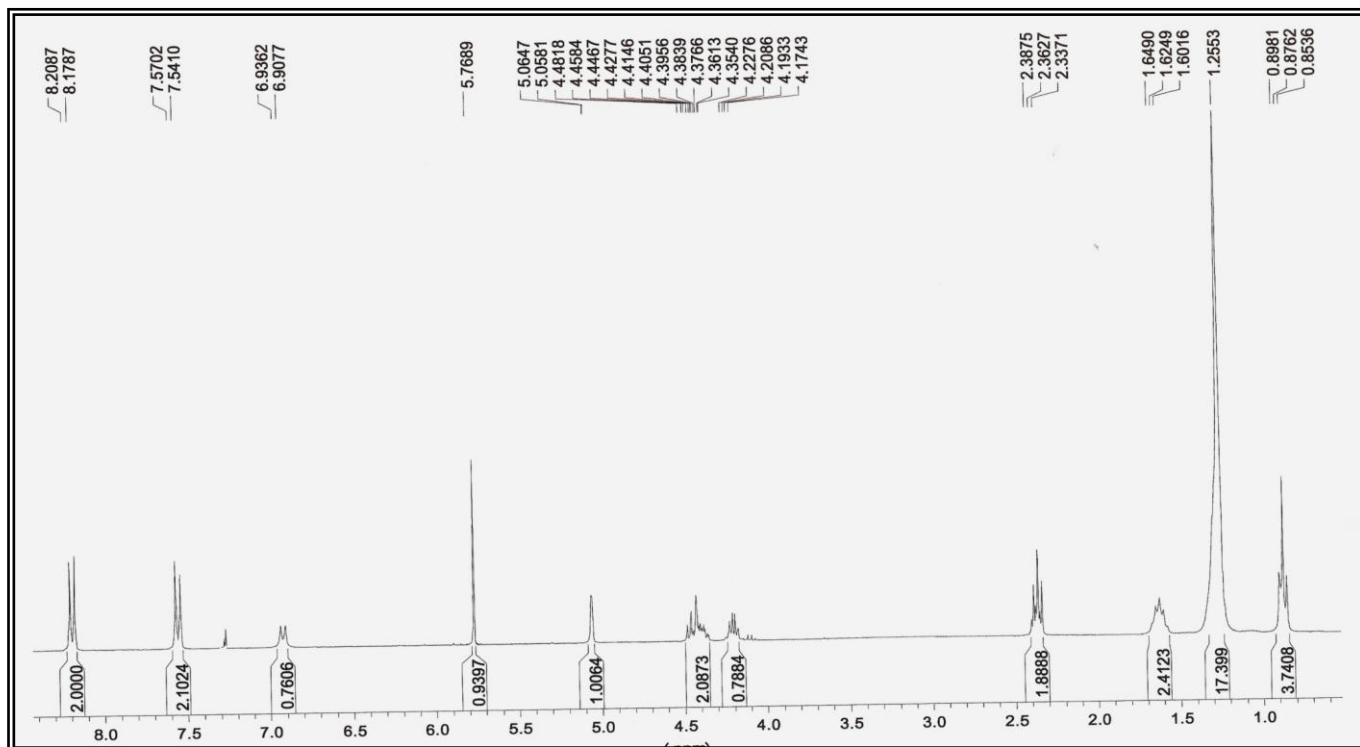
ANEXO 99 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) de Propanoato de Cloranfenicol

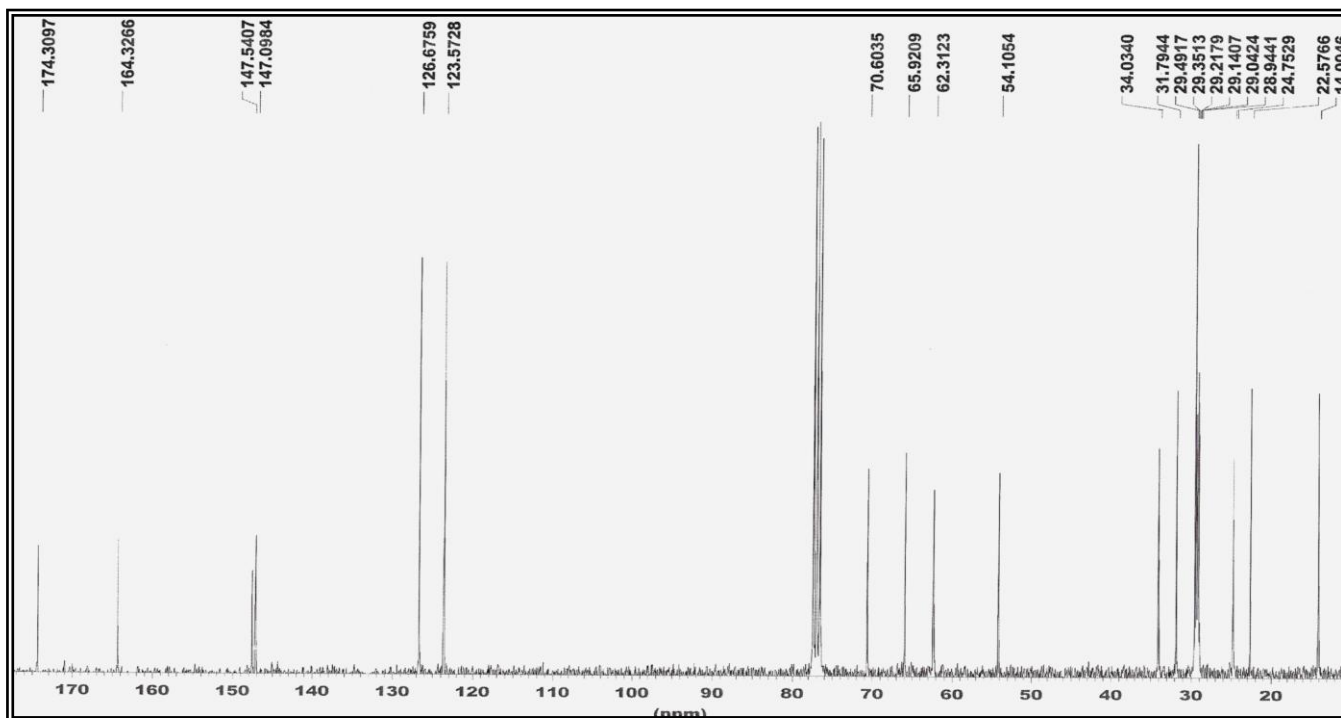
ANEXO 100 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de Propanoato de Cloranfenicol

ANEXO 101 – Espectro de RMN DEPT-135 de Propanoato de Cloranfenicol

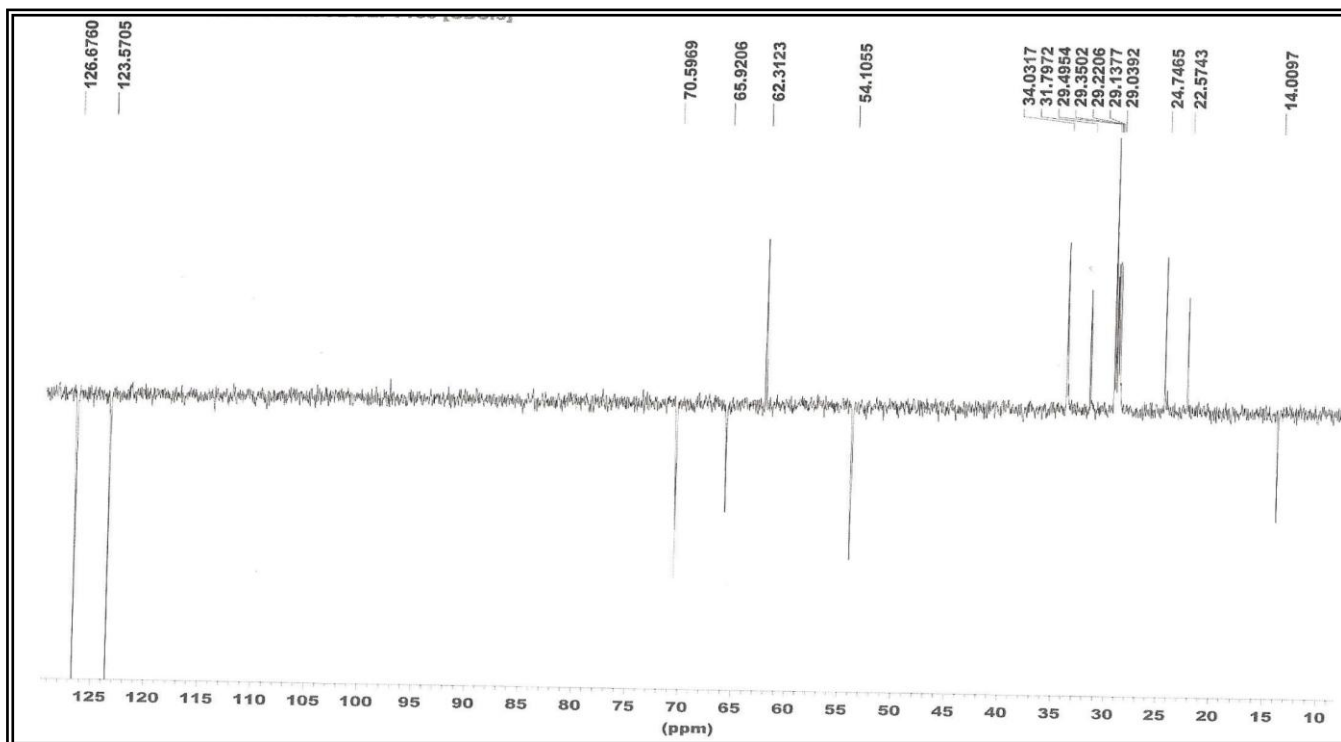


ANEXO 102 – Espectro de IV de Laurato de Cloranfenicol

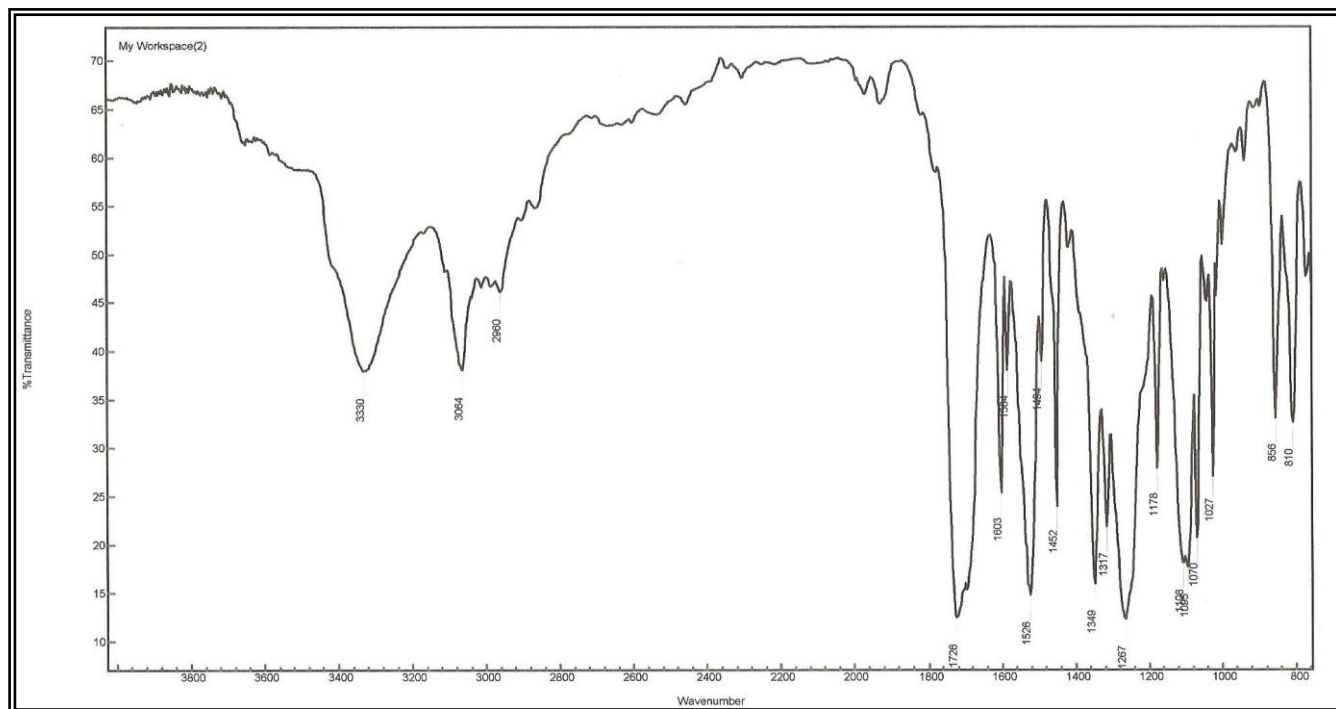
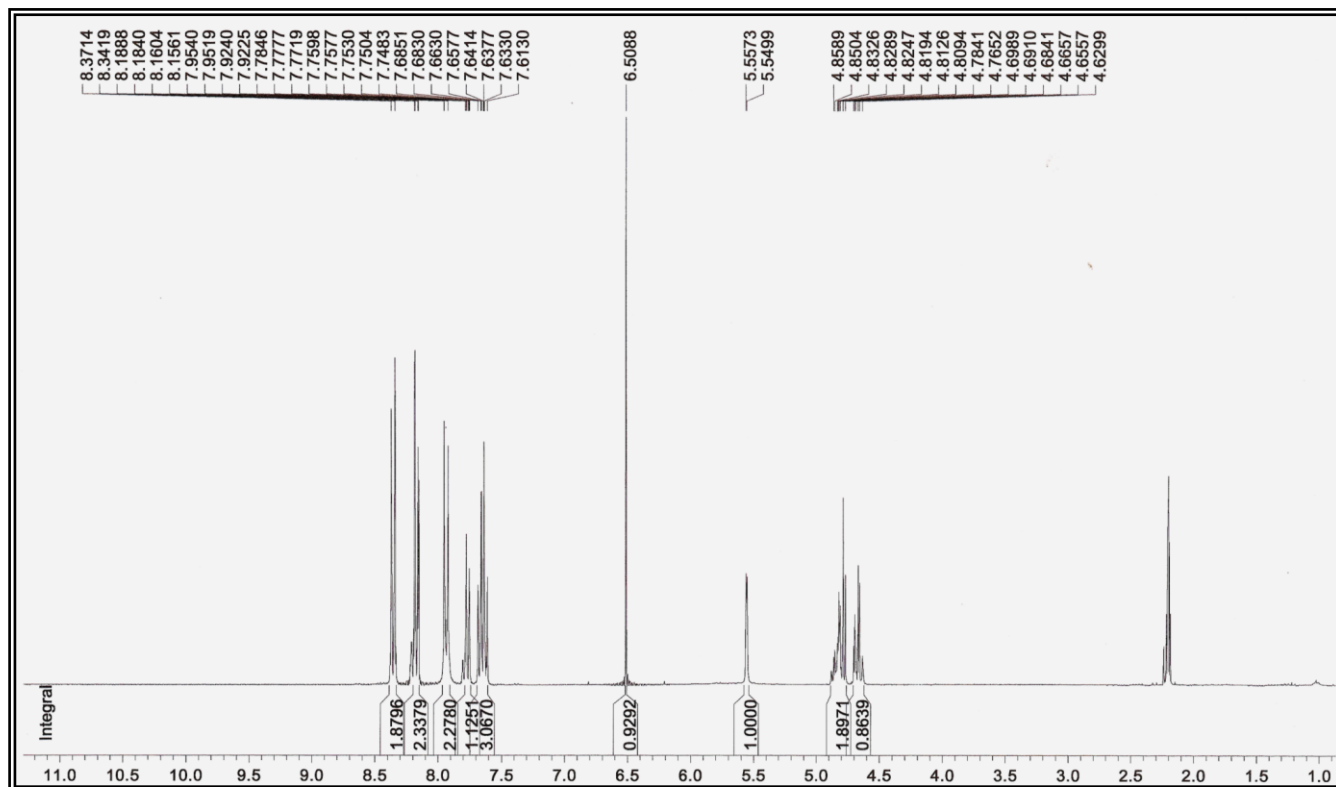
ANEXO 103 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) de Laurato de Cloranfenicol

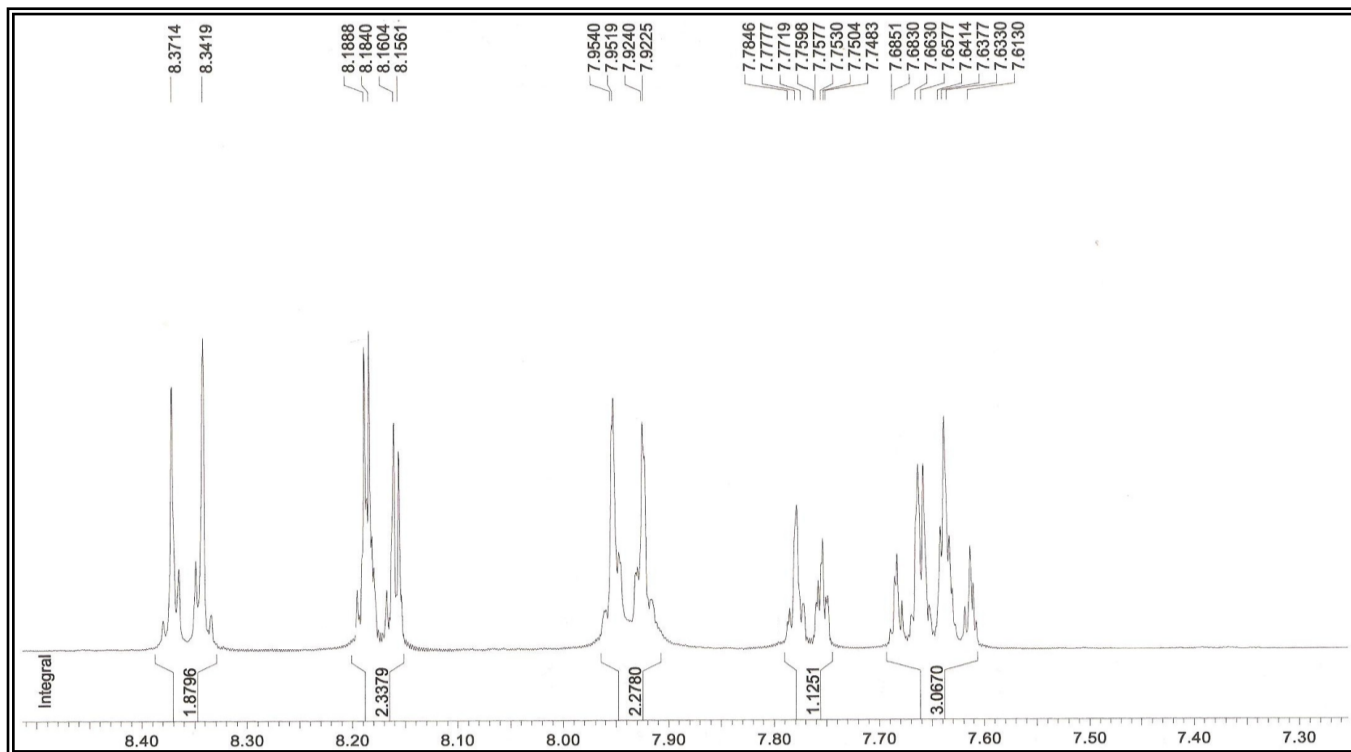
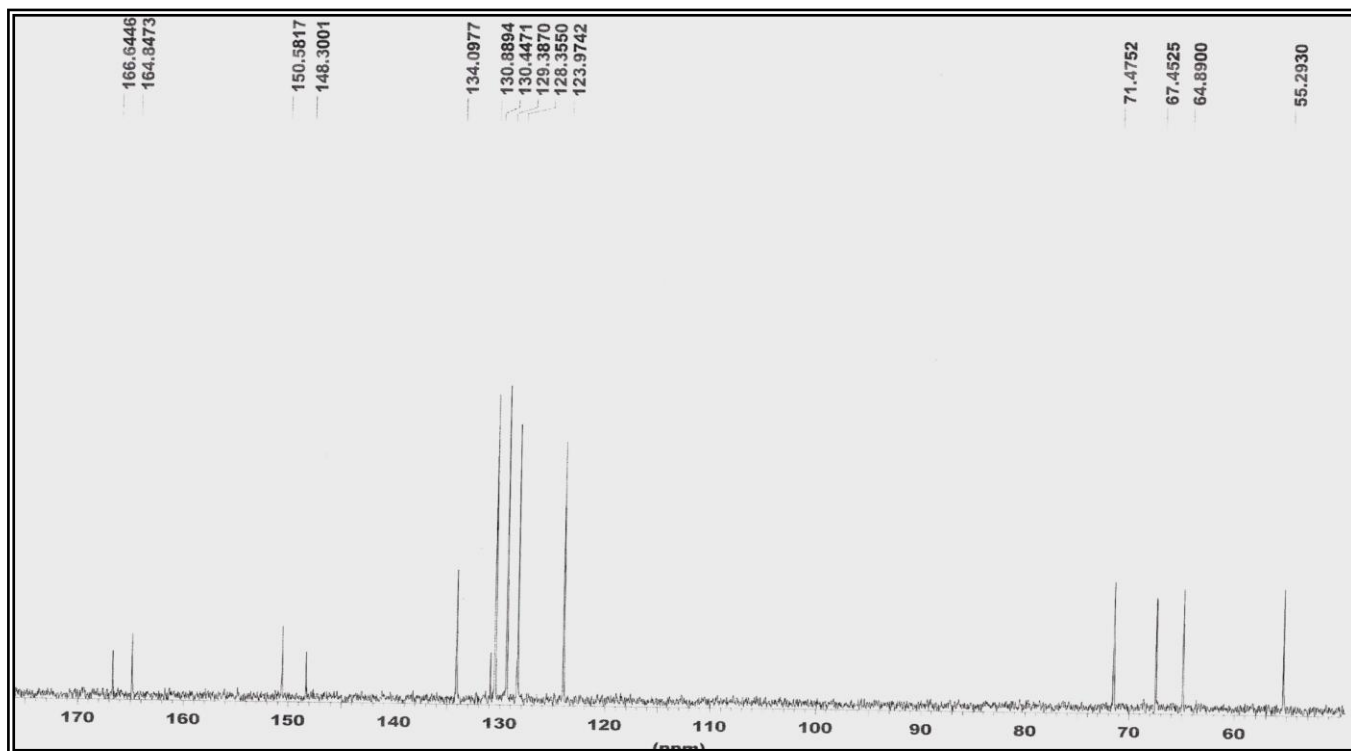
ANEXO 104 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de Laurato de Cloranfenicol

ANEXO 105 – Espectro de DEPT-135 de Laurato de Cloranfenicol

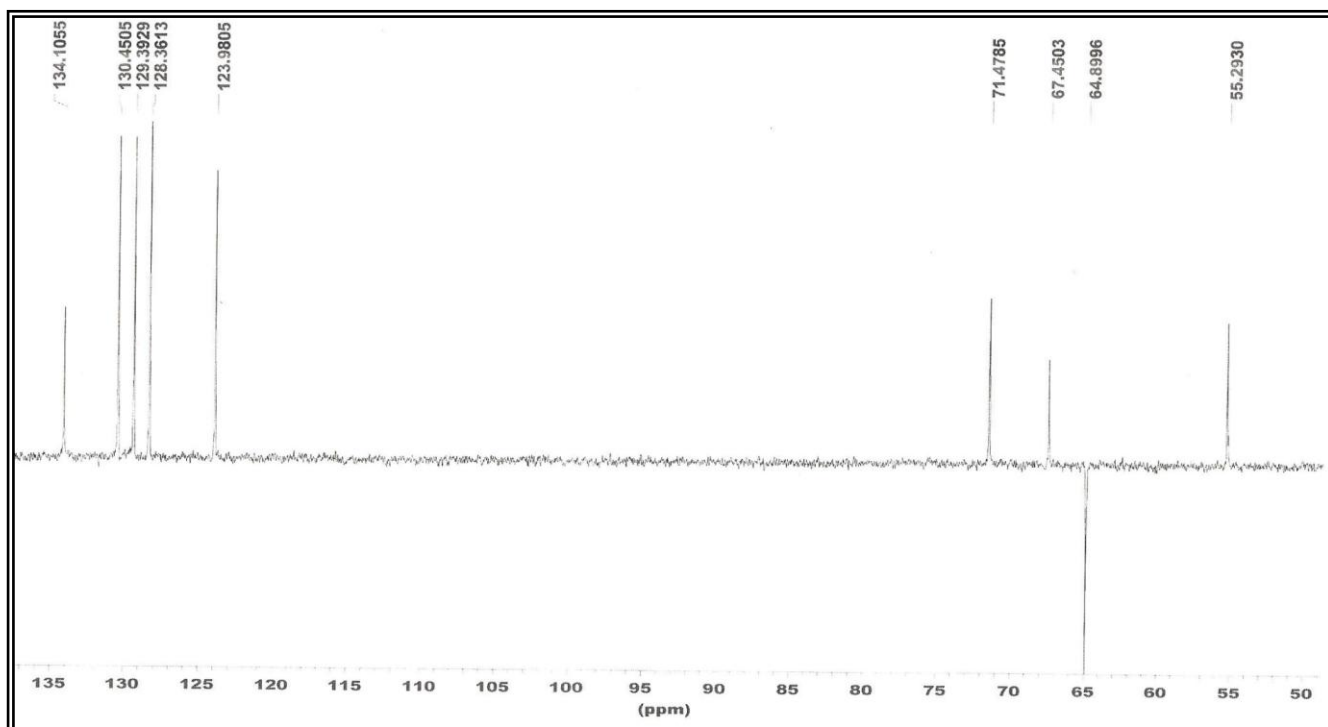


## ANEXO 106 – Espectro de IV de Benzoato de Cloranfenicol

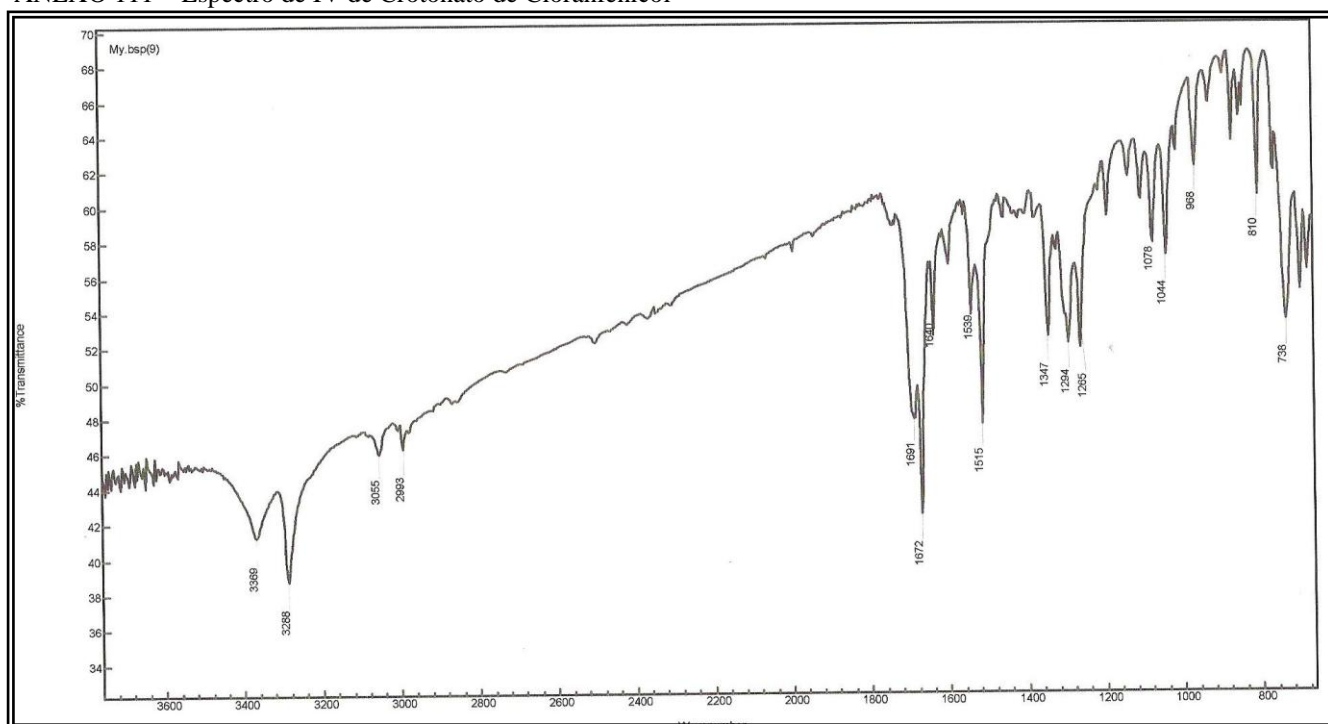
ANEXO 107 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (CDC13, 300MHz) de Benzoato de Cloranfenicol

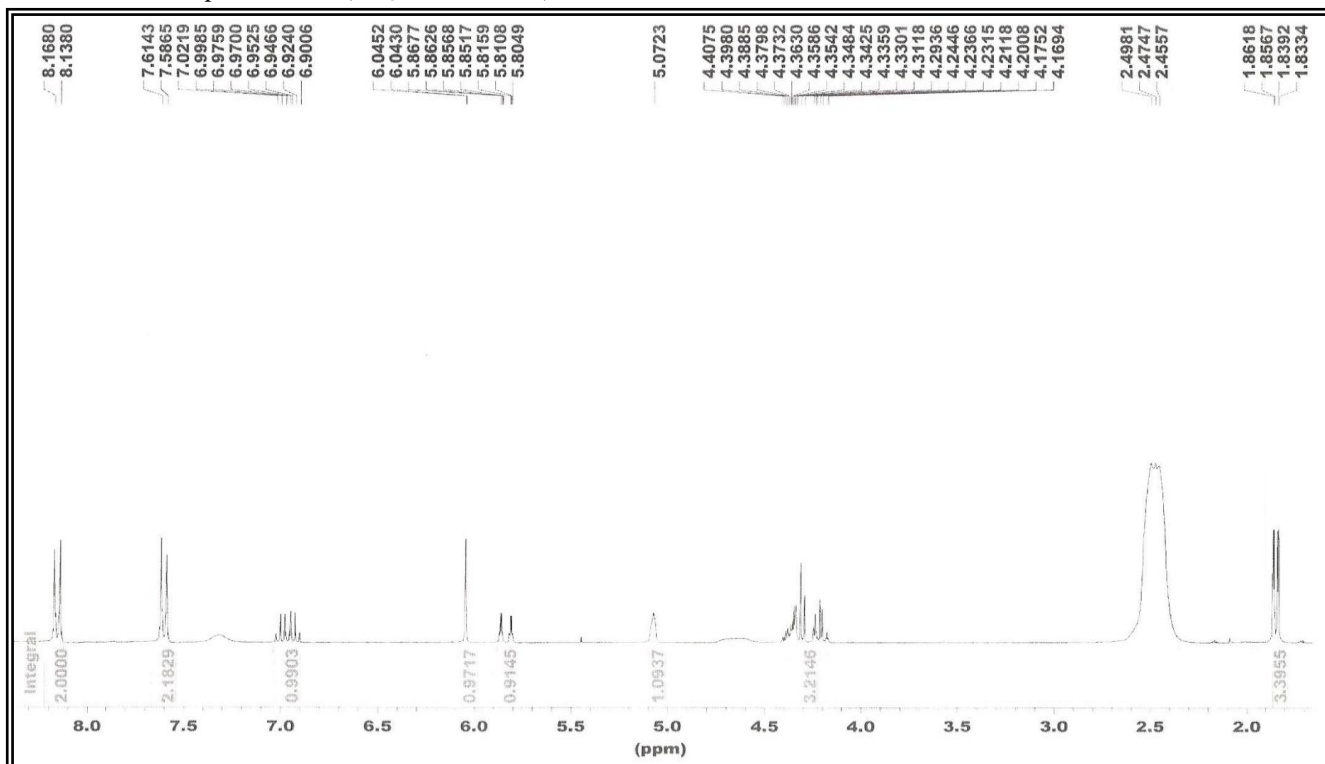
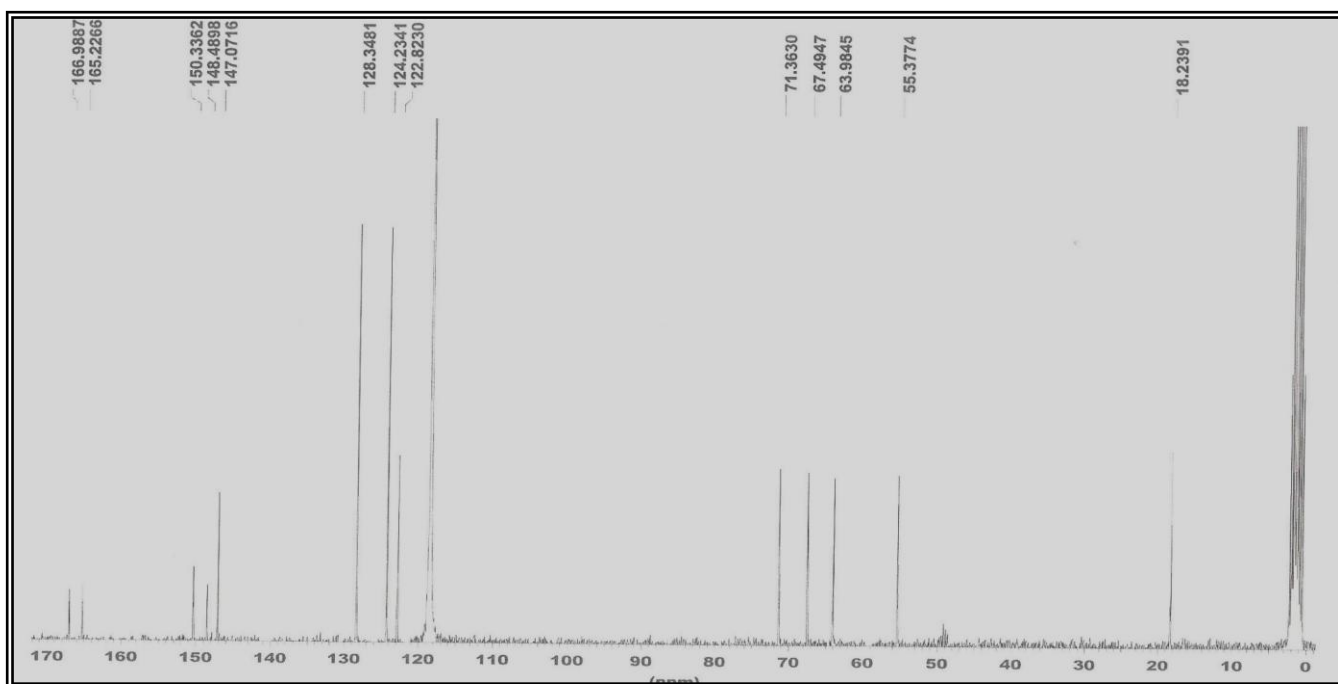
ANEXO 108 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) Expandido de Benzoato de CloranfenicolANEXO 109 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de Benzoato de Cloranfenicol

ANEXO 110 – Espectro de DEPT-135 de Benzoato de Cloranfenicol

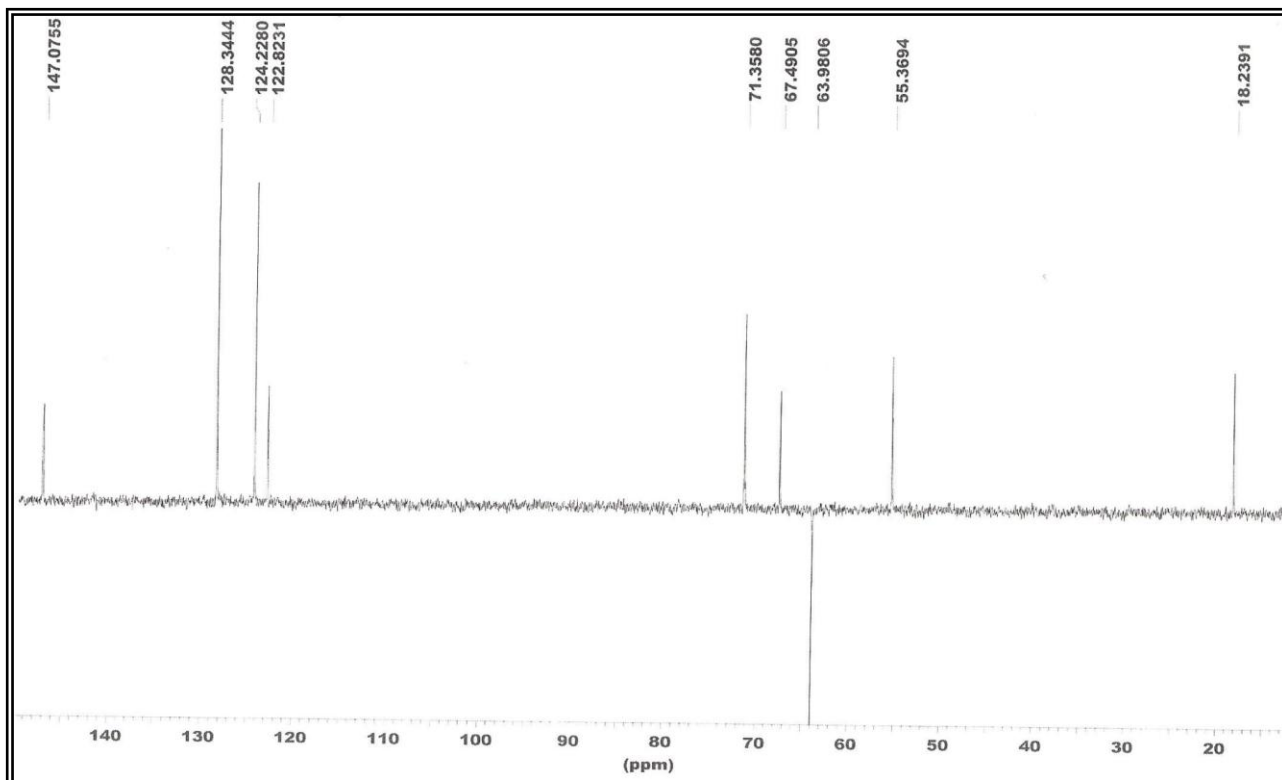


ANEXO 111 – Espectro de IV de Crotonato de Cloranfenicol




ANEXO 112 – Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 300MHz) de Crotonato de CloranfenicolANEXO 113 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 75MHz) de Crotonato de Cloranfenicol



ANEXO 114 – Espectro de DEPT-135 (CD<sub>3</sub>CN, 75MHz) de Crotonato de Cloranfenicol

## ARTIGOS PUBLICADOS:


Tetrahedron: *Asymmetry* 21 (2010) 566–570



Contents lists available at ScienceDirect

**Tetrahedron: *Asymmetry***

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tetasy](http://www.elsevier.com/locate/tetasy)



---

**Reduction processes biocatalyzed by *Vigna unguiculata***


Ayla M. C. Bizerra<sup>a,b</sup>, Gonzalo de Gonzalo<sup>b</sup>, Iván Lavandera<sup>b</sup>, Vicente Gotor-Fernández<sup>b</sup>,  
Marcos Carlos de Mattos<sup>a</sup>, Maria da Conceição F. de Oliveira<sup>a</sup>, Telma L. G. Lemos<sup>a,\*</sup>, Vicente Gotor<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais (LBPn), Universidade Federal do Ceará, 60451-970 Fortaleza, Ceará, Brazil  
<sup>b</sup> Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo, c/ Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

---

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Article history:</i> Received 2 February 2010 Accepted 4 March 2010 Available online 10 April 2010</p>	<p>Whole cells from the Brazilian beans <i>feijão de corda</i> (<i>Vigna unguiculata</i>) have been employed as biocatalysts in different bioreduction processes. Good to excellent selectivities can be obtained in the reduction of aromatic and aliphatic ketones, as well as <math>\beta</math>-ketoesters, depending on the conversions and the chemoselectivity on the substrate structure. This biocatalyst was also able to reduce the nitro moiety of different aromatic nitro compounds, showing as well enoate reductase activity, and chemoselectively catalyzing the double bond reduction of 4-phenyl-3-buten-2-one with moderate conversion.</p> <p style="text-align: right;">© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.</p>


Tetrahedron 67 (2011) 2858–2862



Contents lists available at ScienceDirect

**Tetrahedron**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tet](http://www.elsevier.com/locate/tet)



---

**Enzymatic regioselective production of chloramphenicol esters**

Ayla M.C. Bizerra<sup>a,b</sup>, Tasso G.C. Montenegro<sup>a,b</sup>, Telma L.G. Lemos<sup>b,\*</sup>, Maria C.F. de Oliveira<sup>b</sup>,  
Marcos C. de Mattos<sup>b</sup>, Iván Lavandera<sup>a</sup>, Vicente Gotor-Fernández<sup>a</sup>, Gonzalo de Gonzalo<sup>a</sup>,  
Vicente Gotor<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo, c/ Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain  
<sup>b</sup> Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60451-970 Fortaleza, Ceará, Brazil

---

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Article history:</i> Received 19 January 2011 Received in revised form 21 February 2011 Accepted 22 February 2011 Available online 1 March 2011</p> <p><i>Keywords:</i> Biocatalysis Chloramphenicol Lipases Regioselective processes Medium engineering</p>	<p>An enzymatic study has been performed in the search for synthetic routes to produce chloramphenicol derivatives through regioselective processes using lipases. Complementary transesterification and hydrolytic reactions have been carried to synthesize chloramphenicol regioisomers. Reaction parameters, such as biocatalyst, solvent, acyl donor, and temperature have been optimised in order to obtain chloramphenicol esters with high yields through acylation processes. Scale-up of the enzymatic reactions (1 g-scale at 0.25 M) and catalyst recycling (up to 10 cycles) have been successfully achieved. Furthermore, monoacylated derivatives at the more hindered secondary position could also be obtained employing hydrolysis processes.</p> <p style="text-align: right;">© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.</p>