

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



IVAN SÉRGIO COLÁS GONZALEZ

***Periconia hispidula* UM NOVO BIOCATALISADOR DO
SEMIÁRIDO PARA A REDUÇÃO DE CETONAS
AROMÁTICAS PRÓ-QUIRAIS**

Feira de Santana - BA

2013

IVAN SÉRGIO COLÁS GONZALEZ

***Periconia hispidula* UM NOVO BIOCATALISADOR DO
SEMIÁRIDO PARA A REDUÇÃO DE CETONAS
AROMÁTICAS PRÓ-QUIRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de
Santana.

Orientadora: Profa. Dra Heiddy Marquez Alvarez

Co-Orientadora: Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese

Feira de Santana - BA

2013

Ficha catalogafica: Biblioteca Central Julieta Carteado

Colás Gonzalez, Ivan Sérgio

C65p *Periconia hispidula* um novo biocatalisador do semiárido para a redução de cetonas aromáticas pró-quirais / Ivan Sérgio Colás Gonzalez, 2013.

62f. : il.

Orientadora: Heiddy Marquez Alvarez

Co-orientadora: Angélica Maria Lucchese

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de

Feira de Santana, 2013.

1. Álcool desidrogenase. 2. Células integras, 3. Compostos carbonílicos pró-quirais. 4. Fungos. I. Marquez Alvarez, Heiddy, orient. II. Lucchese, Angélica Maria, co-orient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU : 664.644.5

BANCA EXAMINADORA

Dra. Elisa Teshina

(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Dr. Ernesto Acosta Martínez

(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Dra. Heiddy Márquez Alvarez

(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Feira de Santana - BA

2013

Dedico este trabajo a todos ustedes, a quienes, a mi familia en Cuba, a mis amigos que andan dispersos por todo El mundo, que son parte de mí; ellos lo saben, a todos los que me ofrecieron su valiosa ayuda, a MARIA.

AGRADECIMENTOS

Agradezco a mí mismo por llevar a cabo esta OSADIA.

A la UEFS por darme esta oportunidad, a CAPES, a la FAPESB.

A Marcos y Coneição por acogerme en su laboratório como uno más.

A Heiddy, a la Dra. Santiago,,,,,,por TODO.

A los meninos y meninas de LAPRON.

A la vida, que me ha dado tanto,,,,,decía el poeta,,,y espero que me siga dando.

Gracias!!!!!!!

SUMÁRIO

| | PAGINA |
|--|-----------|
| 1. - INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. - OBJETIVOS | 4 |
| 2.1 Objetivos Específicos | 4 |
| 3. - REVISÃO DE LITERATURA | 5 |
| 3.1 Biocatálises – Aspectos Gerais | 5 |
| 3.2 Fungos como biocatalisadores | 10 |
| 4. - MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 4.1 Materiais | 18 |
| 4.2 Métodos | 19 |
| 4.2.1 Micro-organismos | 19 |
| 4.2.2 Avaliação da fase de crescimento para o acréscimo do substrato | 20 |
| 4.2.3 Avaliação da forma de uso do biocatalisador | 20 |
| 4.2.4 Avaliação da influencia da presença do íon Fe^{2+} no meio reacional | 21 |
| 4.2.5 Tolerância do biocatalisador à acetofenona | 21 |
| 4.2.6 Reatividade e seletividade do biocatalisador frente a distintas cetonas aromáticas. | 22 23 |
| 4.2.7 Análises Cromatográficas | |
| 5. - RESULTADOS E DISCUSSÃO | 26 |
| 5.1 Avaliações da fase de crescimento para acréscimo do substrato | 26 |
| 5.2 Avaliações da forma de uso do biocatalisador | 28 |
| 5.3 Avaliações da influencia da presença do íon Fe^{2+} no meio reacional | 30 |
| 5.4 Tolerâncias do biocatalisador à acetofenona | 31 |
| 5.5 Reatividade e seletividade do biocatalisador frente a distintas cetonas aromáticas | 33 |
| 5.5.1 Com acetofenonas substituídas | 33 |
| 5.5.2 Com outros compostos carbonílicos. | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 6. - CONSIDERAÇÕES FINAIS | 39 |
| 7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 41 |
| ANEXOS | 46 |

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a ação biocatalítica do fungo *Periconia hispidula* em reações de redução de compostos carbonílicos aromáticos pró-quirais. A influência de parâmetros reacionais (meio, tempo, quantidade de substrato, forma de utilização do biocatalisador) na conversão e enantioseletividade da redução de acetofenona foi inicialmente avaliada. A partir da curva de crescimento, determinou-se o tempo de incubação prévio a adição de substrato (4 e 7 dias). Os melhores resultados de conversão para a obtenção do (S)-1-feniletanol, com excesso enantiomérico (e.e) de 98% foram atingidos após quatro dias de incubação prévia do micro-organismo. Duas formas de utilização do biocatalisador foram avaliadas: células em crescimento e células em repouso. Os melhores resultados de conversão foram obtidos com as células em crescimento. Pela comparação entre meios de cultura batata-dextrose (BD) e batata-dextrose (BD) suplementado com Fe^{2+}) selecionou-se o meio BD suplementado com Fe^{2+} (0,02 g/L). A influência da quantidade de acetofenona (entre 20 μL e 200 μL) também foi analisada com o objetivo de avaliar a toxicidade do substrato. Verificou-se que quantidades de substrato maiores a 100 μL (0,1%) levaram a queda da conversão e da enantioseletividade. O biocatalisador também foi testado frente a 23 cetonas pró-quirais: 2, 3 e 4-nitroacetofenona; 2, 3 e 4-metilacetofenona; 2, 3 e 4-metoxiacetofenona; 2, 3 e 4-bromoacetofenona; 2, 3 e 4-fluoracetofenona; 2,4-dimetilacetofenona; 2,5-dimetilacetofenona; 4-etilacetofenona, octanofenona, 1-indanona e 2-indanona. As conversões dos alcoóis quirais oscilaram entre 8% e 100% com excessos enantioméricos de 54 até mais de 99%, demonstrando que o fungo *Periconia hispidula* é um biocatalisador estereosseletivo promissor para aplicação em processos de redução de compostos carbonílicos.

Palavras-chave: Álcool desidrogenase, células integras, compostos carbonílicos pró-quirais, fungo.

ABSTRACT

In this work was investigated the biocatalytic action of fungus *Periconia hispidula* to perform reduction reactions of aromatic prochiral carbonyl compounds. Firstly, the influence of the reaction parameters (medium, time, amount of substrate, forms to use the biocatalyst) over the conversion rate and enantiomeric excess in the reduction of acetophenone was investigated. After the determination of the growth curve, the incubation time prior to addition of substrate, was evaluated (4 and 7 days). For 4 days of preincubation time, the best conversion rate to obtain the (S)-1-phenylethanol with e.e of 98% were achieved. Two types of biocatalysts were evaluated: growing cells and resting cells. The best results were obtained with growing cells. By comparing the results obtained from potato-dextrose (BD) culture medium and potato-dextrose (BD) supplemented with Fe^{2+} , BD medium supplemented with Fe^{2+} (0.02 g / L) was selected. The influence of the amount of acetophenone (20 to 200 μL) was also examined to evaluate the toxicity of the substrate. Quantities of the substrate higher than 100 μL (0.1%) decreased also conversion rate but the enantiomeric excess. The applicability of this biocatalyst was also evaluated to reduce acetophenone derivates compounds such as 2, 3 and 4-nitroacetophenone, 2, 3 and 4-methylacetophenone; 2, 3 and 4-methoxyacetophenone, 2, 3 and 4-bromoacetophenone, 2, 3 and 4-fluoroacetophenone, 2, 4-dimethylacetophenone, 2, 5-dimethylacetophenone; 4-ethylacetophenone, octanophenone, 1-indanone and 2-indanone. Chiral alcohols were obtained with conversion rates from 8% upto higher than 99% and the enantiomeric excess between 54% up to 100%, indicating that the fungus *Periconia hispidula* is a promising estereoselective biocatalyst for use in processes for reducing carbonyl compounds.

Keywords: Alcohol dehydrogenase, whole cells, prochiral carbonyl compounds, fungus.

LISTA DE FIGURAS

PAGINA

INTRODUÇÃO

- Figura 1. Exemplo de fármacos que apresentam função álcool ou derivados na estrutura. 1

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 2. Produção de L-(-)-efedrina a partir de Benzaldeído utilizando *Sacchromyces Cerevisiae*. 5
- Figura 3. Esquema da reação de oxidação do colesterol catalisada por *Nocardia sp.* 6
- Figura 4. Exemplos de reações quimiosseletiva (A), regioseletiva (B) e enantioseletiva (C) biocatalisadas. 7
- Figura 5. Transferência de hidreto as faces pseudo *si* e pseudo *si* da carbonila pela coenzima NAD(P)H. 9
- Figura 6 Representação esquemática do ataque a carbonila pelas fases pseudo *si* ou pseudo *re*. 11
- Figura 7 Cetonas aromáticas utilizadas na triagem de biocatalisadores. 12
- Figura 8 Biotransformação de cicloalcanos na presença de diversos micro-organismos. 14

METODOS

- Figura 9 Cultura do fungo *Periconia hispidula* (à direita) e suas estruturas (à esquerda). 19
- Figura 10 Estruturas dos substratos na biorredução pelo fungo *Periconia hispidula*. 22

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Figura 11 Curva de crescimento do fungo *Periconia hispidula* em meio BD. 26

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 12 | Gráfico da conversão (C) da biorredução da acetofenona em S-1-feniletanol para 96 e 168 h de crescimento do fungo <i>Periconia hispidula</i> em meio BD. | 28 |
| Figura 13 | Gráfico da conversão (C) para os experimentos realizados com células em crescimento em meio BD em repouso. | 29 |
| Figura 14 | Conversão (C) e excesso enantiomérico (e.e.) em meio BD com e sem adição de íon Fe²⁺. | 31 |
| Figura 15 | Conversão (C) e excesso enantiomérico (e.e.) em meio BD em função da quantidade inicial de acetofenona. | 33 |
| Figura 16 | Comparação dos valores de conversão (C) e de excesso enantiomérico (e.e) dos derivados de acetofenona mono substituídas na posição <i>para</i>. | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | PAGINA |
|---|--------|
| Tabela 1 Exemplos de redução de compostos carbpnílicos por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . | 13 |
| Tabela 2 Conversão e excesso enantiomérico dos produtos da transformação de derivados da acetofenona utilizando o fungo <i>Aspergillus niger</i> EBK - 19 como biocatalisador. | 16 |
| Tabela 3 Condições cromatográficas das análises por cromatografia gasosa da acetofenona e seus derivados. | 24 |
| Tabela 4 Condições cromatográficas das análises por cromatografia gasosa da 1-indanona, 2-indanona e octanofenona. | 26 |
| Tabela 5 Conversão (%) de acetofenona em S-1-feniletanol e exeso enantiomérico (%) da reação catalisada pelo fungo <i>Periconia hispidula</i> em diferentes fases de crescimento. | 27 |
| Tabela 6 Valores de conversão de acetofenona em S-1-feniletanol e excesso enanitomérico n os experimentos realizados com células em crescimento e células em repouso. | 29 |
| Tabela 7 Resultados da adição do íon Ferro (Fe ²⁺) no meio BD na conversão (%) de acetofenona em S-1-feniletanol e no excesso enatiomérico (%) da reação catalisada pelo fungo <i>Periconia hispidula</i> . | 30 |
| Tabela 8 Valores de conversão (%) e enantiosseletividade (%) da biorredução de acetofenona em 1-feniletanol catalisada pelo fungo <i>Periconia hispidula</i> em presença de quantidades variadas de acetofenona. | 32 |
| Tabela 9 Valores da biomassa seca (g), conversão (%) e excesso enantiomericico (%) e configuração da biorredução das acetofenonas substituídas em álcoois quirais pelo | 34 |

biocatalisador *Periconia hispidula*.

Tabela 10 Valores da biomassa seca (g), conversão (%) e excesso enantiomérico (%) das reações da 1-indanona, 2-indanona e octanofenona com o biocatalisador *Periconia hispidula*. **38**

ABREVIATURAS

C: Conversão

e.e: Excesso enantiomérico

Me: Grupo metila

MeO: Grupo metoxila

Et: Grupo etila

diME: dimetil

F: Flúor

Br: Bromo

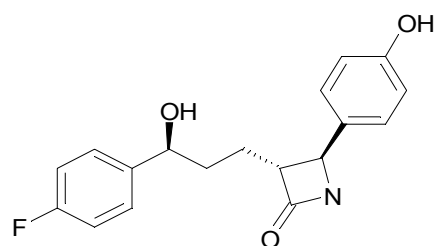
BD: Meio de cultura batata-dextrose

NO₂: Grupo nitro

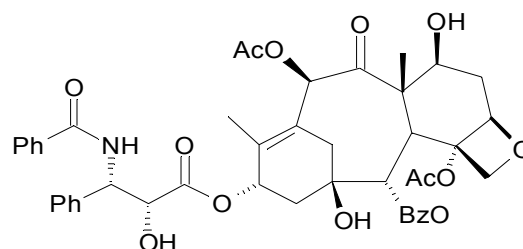
r.p.m: Rotações por minutos

1. - INTRODUÇÃO

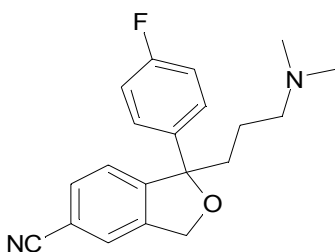
A biocatálise é atualmente uma metodologia de destaque para a síntese de uma série de produtos químicos, em especial as substâncias enantiomericamente puras (BORNSCHEUER et al., 2012). Dentre estes compostos estão os alcoóis quirais, que podem ser usados como precursores de uma variedade de fármacos e agroquímicos de estrutura mais complexa como ezetimiba (redução de colesterol), taxol (anti-câncer); citalopram (antidepressivo), (*S*)-Propranolol (anti-hipertensivo), entre outros, Figura 1 (SINGH *et al*, 2012, GOTOR-FERNANDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006).



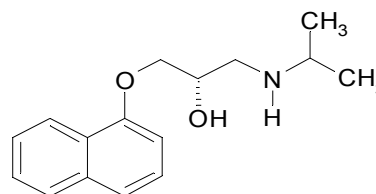
EZETIMIBA (Reduz o colesterol)



TAXOL (anti-câncer)



CITALOPRAM (antidepressivo)



(S) PROPANOLOL (anti-hipertensivo)

Figura 1. Exemplos de fármacos que apresentam função álcool ou derivados na estrutura.

Um dos métodos biocatalíticos possíveis para a obtenção de alcoóis quirais é a redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos, com o emprego de enzimas isoladas ou células íntegras como catalisadores (SOLANO et al., 2012, CARVALHO, 2011). As enzimas isoladas estão disponíveis comercialmente, e os equipamentos e procedimentos envolvidos são em geral simples, mas a necessidade do uso de cofatores e assim como seu custo

podem ser fatores restritivos. O uso de células íntegras apresenta algumas vantagens já que as enzimas estão em seu ambiente natural, evitando assim sua perda de atividade por modificações na estrutura protéica, bem como permitindo a regeneração de cofatores, quando necessários (CARVALHO, 2011). Por outro lado reações colaterais, provocadas pela presença de complexos enzimáticos, podem ocorrer levando a misturas de produtos, além da baixa tolerância a solventes orgânicos usados para solubilizar substratos pouco solúveis em água (LABES; WENDHAUSEN, 2008).

Embora estudos de engenharia genética (BORNSCHEUER et al., 2012) tenham propiciado a descoberta de novos biocatalisadores, nos últimos anos, uma das principais fontes ainda é a biodiversidade, com a busca de catalisadores em animais, algas, plantas e/ou micro-organismos (YANG et al, 2012, PIROLLA et al, 2011, MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009). Os micro-organismos estão distribuídos em todos os habitats, e relatos de bactérias e fungos, oriundos da biomassa terrestres e marinhos, como catalisadores em reações de biocatálise ou biotransformação podem ser encontrados (CARVALHO, 2001, TRINCONE, 2011; BORGES et al, 2009). Adicionalmente, das centenas de enzimas usadas na indústria, metade são de fungos, cerca de um terço de bactérias, sendo que o restante é de outras fontes, como animais e plantas, demonstrando o potencial de aplicação de micro-organismos nesta área (SANCHEZ; DEMAIN, 2011).

Os fungos são um dos grupos de organismos mais diversos e conseqüentemente um dos menos conhecidos, estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de fungos no mundo (HAWKSWORTH, 2001), dos quais apenas 5 a 7% de espécies foram descritas (GUSMÃO; MARQUES, 2006). A região do semiárido, que ocupa cerca de 60% do nordeste brasileiro, possui uma diversidade de fungos ainda desconhecida, tanto do ponto de vista taxonômico quanto biotecnológico (GUSMÃO e MAIA, 2006), entre os quais se encontram os fungos associados ao folheto, como o *Periconia hispidula*. Este fungo foi recentemente selecionado em nosso grupo de pesquisa (MACHADO, 2012) como produtor de cetoredutases, através de uma triagem envolvendo 55 fungos conidiais isolados no semiárido e usando acetofenona como substrato

carbonílico, justificando assim uma investigação mais detalhada de sua ação biocatalítica.

2. - OBJETIVO

Investigar a ação catalítica do fungo conidial *Periconia hispidula*, isolado de folheto na região do semiárido baiano, na bio-redução de compostos carbonílicos aromáticos.

2.1. Objetivos Específicos

- Determinar a influência dos fatores (catalisador, meio, tempo de incubação prévio a adição do substrato, tempo de reação e quantidade de substrato) na conversão e no excesso enantiomérico da redução de acetofenona por *Periconia hispidula*.
- Avaliar a atividade catalítica do fungo *Periconia hispidula*, com determinação da conversão e do excesso enantiomérico em reações de redução de compostos carbonílicos aromáticos funcionalizados.

3.- REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biocatálise – Aspectos gerais

O uso de micro-organismos na produção de produtos de interesse se confunde com a própria história da humanidade, pois há relatos da produção de vinho e vinagre no Livro de Gênesis, bem como a produção de cerveja a qual já era conhecida pelos Sumérios e Babilônios cerca de 6 000 anos A.C. Entretanto o estabelecimento industrial da produção de compostos orgânicos por fermentação é mais recente, datada de meados do século 19. Acredita-se ainda que o ácido láctico tenha sido o primeiro produto opticamente ativo industrialmente produzido por fermentação em 1880 (LIESE; SEELBACH; WANDREY, 2006).

O processo de fermentação, embora envolva micro-organismos e participação de enzimas, difere conceitualmente de um processo biocatalítico ou de biotransformação, pois o número de etapas catalíticas entre produto e substrato na fermentação, costuma ser mais elevado, e as estruturas químicas das substâncias envolvidas no processo não possuem grande semelhança (LIESE; SEELBACH; WANDREY, 2006). Assim, um dos primeiros relatos que demonstrou a importância da biocatálise como metodologia em síntese orgânica, foi a produção de (*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropanona, por condensação de benzaldeído com ácido 2-oxo-propiónico na presença de *Saccharomyces cerevisiae*, em 1921 (Figura 2). Este precursor foi depois quimicamente convertido em L-(-)-efedrina, conhecido como broncodilatador. (HILDERBRANDT; KLAVEHN, 1930).

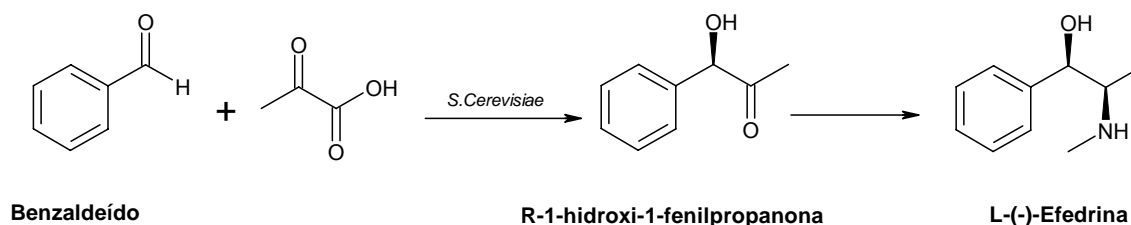


Figura 2. Produção de L-(-)-efedrina a partir de benzaldeído utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

As primeiras transformações enzimáticas eram restritas ao meio aquoso, pois se acreditava que enzimas seriam ativas apenas neste meio. Desta forma o crescimento do uso de transformações biocatalisadas em síntese orgânica se deu, principalmente, após estudos que demonstravam a eficiência catalítica de enzimas em solventes orgânicos, como na oxidação de colesterol, (Figura 3), por *Nocardia* sp. (BUCKLAND; DUNNILL; LILLY, 1975), aumentando assim a aplicabilidade destes catalisadores (KLIBANOV, 1986, LAANE; BOEREN; VOS; VEEGER, 1987, HALLING; KVINTTINGEN, 1999).

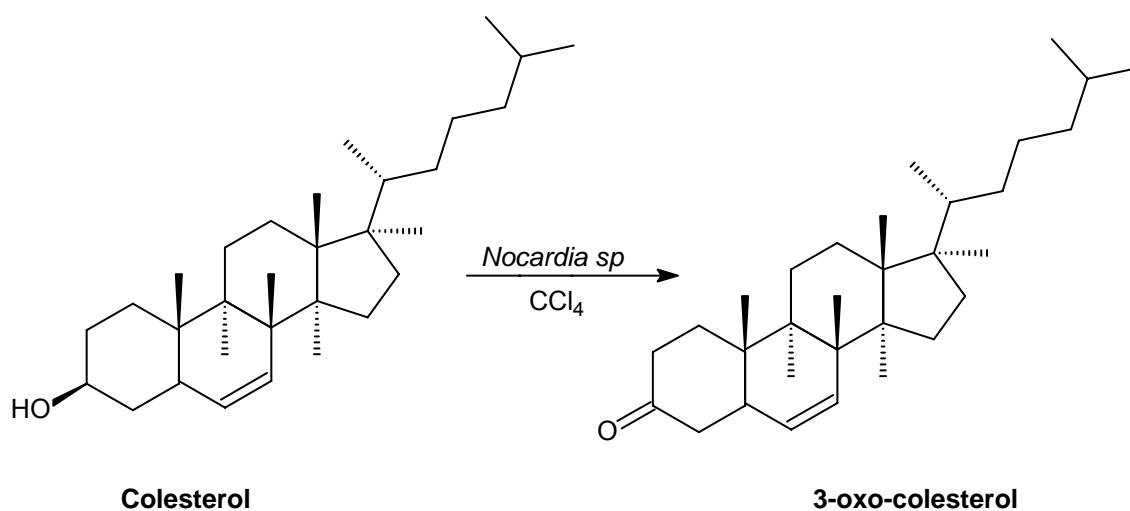
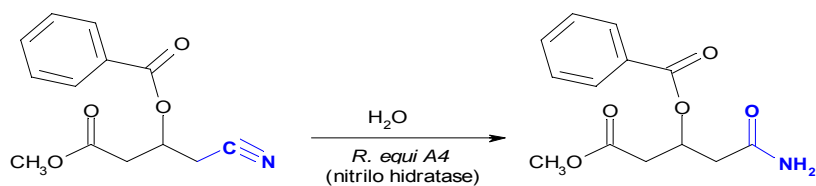


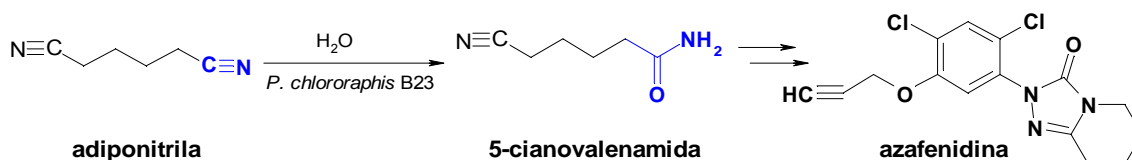
Figura 3. Esquema da reação de oxidação do colesterol catalisada por *Nocardia* sp.

As vantagens do uso de um biocatalisador em comparação com a dos catalisadores químicos já é um conhecimento bem estabelecido. As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores nos processos de biotransformação, como a versatilidade, seletividade, condições suaves de reação e baixa geração de resíduos tóxicos, entre outras. No que se refere a seletividade, as enzimas podem ser quimiosseletivas, regioseletivas e estereosseletivas (FABER, 2011), como demonstrado nas reações apresentadas na Figura 4.

A) Reação Quimiosseletiva



B) Reação Regiosseletiva



C) Reação Enantiosseletiva

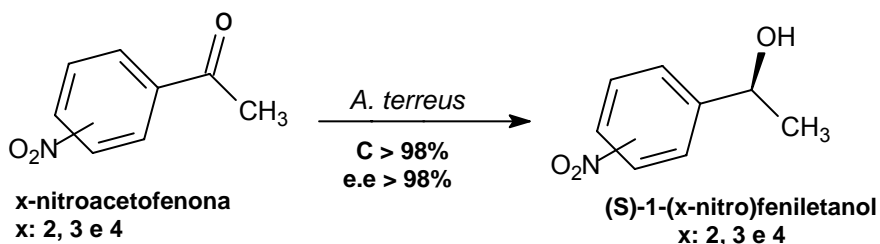


Figura 4. Exemplos de reações quimiosseletiva (A), regiosseletiva (B) e enantiosseletiva (C) biocatalisadas.

A quimiosseletividade, em um substrato multifuncionalizado, se trata da ação sobre um único tipo de grupamento funcional, permanecendo as demais funções químicas inalteradas, como na Figura 4 (A). Conhece-se que os agrupamentos éster são mais facilmente hidrolisáveis que amidas e nitrilas, entretanto a obtenção quimiosseletiva de um amidodiéster a partir do correspondente cianodiéster foi possível, utilizando-se células integras da bactéria *Rhodococcus equi* A4 (MARTÍNKOVÁ et al., 2001).

A regiosseletividade ocorre quando grupos funcionais idênticos situados em regiões quimicamente diferentes da mesma molécula do substrato reagem de forma distinta. Na Figura 4 B se apresenta um exemplo interessante de uma reação regiosseletiva catalisada pela bactéria *Pseudomonas chlororaphis* B23 na hidratação seletiva de um dos agrupamentos ciano do adiponitrila. Esta

reação conduz à 5-cianovaleramida, intermediário chave na síntese do herbicida azafenidina (SHAPIRO et al., 2001).

A estereosseletividade é a formação preferencial de um estereoisômero, podendo se tratar de um enantiômero ou diastereômero. Na Figura 4C se apresenta um processo enantiosseletivo (objeto de estudo deste trabalho) onde acetofenonas nitrossubstituídas são transformadas pela ação do fungo *Aspergillus terreus* os seus respectivos álcoois quirais com conversões e excessos enantioméricos superiores a 98% (COMASSETO e al., 2006)

As velocidades das reações mediadas por enzimas também são aceleradas, quando comparadas as não enzimáticas, com valores de 10^8 a 10^{10} vezes maiores, podendo exceder em alguns casos até 10^{12} vezes. Tais velocidades de reação são alcançadas por catalisadores químicos em concentrações de 0,1 a 1%, enquanto que os catalisadores enzimáticos operam em concentrações de 10^{-3} a $10^{-4}\%$. Em comparação com catalisadores químicos, que em sua maioria empregam metais pesados, as enzimas também possuem a vantagem de serem degradáveis pelo meio. Além disso, em geral agem em condições brandas, em valores de pH próximos a 7, e temperaturas em torno da ambiente; reduzindo também o risco de reações decomposição, isomerização, rearranjos e outros problemas ocorridos com o substrato ou o produto em metodologias convencionais (FABER, 2011).

Por outro lado, biocatalisadores podem não ser suficientemente estáveis nas condições reacionais desejadas, pois fatores como temperatura, pH, presença de sais e solventes podem levar a desativação da enzima por desnaturação. O custo do processo também pode ser elevado, principalmente se a adição de cofatores, como NADH ou NADPH, for necessária. Adicionalmente, embora já existam cerca de 4 000 enzimas conhecidas, as mesmas não estão totalmente caracterizadas ou não são comercialmente disponíveis, tendo apenas um número limitado de biocatalisadores descritos para algumas reações específicas (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004, FABER, 2011).

Dentre as várias enzimas conhecidas, as oxido-redutases, ou seja, as enzimas que catalisam reações de oxidação e redução são o segundo maior grupo estudado, depois das hidrolases (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA

et al, 2009). Estas enzimas, normalmente, requerem componentes químicos adicionais denominados cofatores, que podem ser íons inorgânicos (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) ou uma molécula orgânica complexa, denominada de coenzima, como NADH ou NADPH, para exercer sua atividade biocatalítica (PORTO, 2006). Na redução de compostos carbonílicos, catalisada por ceteredutases (CR) ou álcool desidrogenases (ADH), a coenzima é responsável pela transferência do hidreto para a face pseudo *si*- ou pseudo *re*- da carbonila (Figura 5).

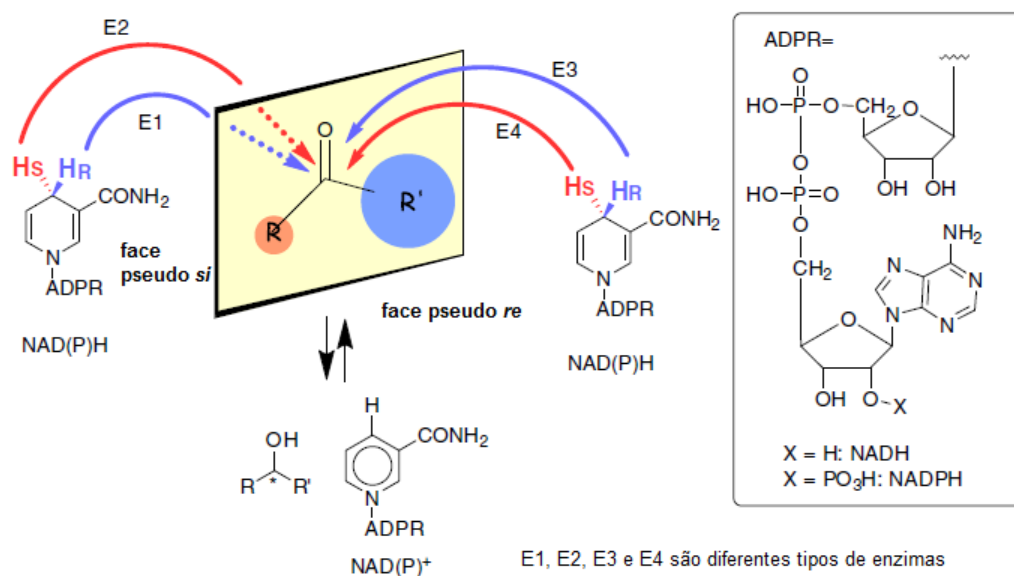


Figura 5. Transferência de hidreto as faces pseudo *si* e pseudo *re* da carbonila pela coenzima NAD(P)H. Fonte: MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009.

Em escala preparativa o uso de enzimas isoladas para a biorredução pode ser inviabilizado pelo alto custo do cofator, sendo assim a regeneração deste cofator um requisito necessário para a sua aplicação em processos industriais. Para que a forma oxidada da coenzima seja transformada em sua forma reduzida geralmente faz-se necessária a adição de um agente regenerador como fonte de hidrogênio, como alcoóis (etanol, 2-propanol), açúcares (glicose, glicose-6-fosfato, glicose-6-sulfato), aminoácidos (ácido glutâmico), hidrogênio molecular, uso da regeneração eletroquímica (HOLLMANN, SCHMID, 2004) e da fotoquímica (GOTOR; ALFONSO; GARCIA-URDIALES, 2008; MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA et al., 2009).

O emprego de células íntegras pode ser também uma alternativa, já que na célula estarão as enzimas e cofatores necessários para sua atividade catalítica, evitando também processos onerosos de purificação e isolamento das enzimas. Entretanto, a produtividade pode ser mais baixa, já que substratos não naturais são, geralmente, tóxicos para as células, sendo tolerados apenas em pequenas quantidades. Adicionalmente, devido a presença de complexos enzimáticos, podem ocorrer reações colaterais, bem como a presença de contaminantes na mistura reacional, dificultam o isolamento do produto de interesse (LABES; WENDHAUSEN, 2008, FABER, 2011).

3.2. Fungos em reações de biorredução de compostos carbonílicos

Os principais organismos usados como biocatalisadores são os fungos leveduriformes e filamentosos, embora relatos de enzimas de vegetais e animais possam ser encontrados (BORGES et al., 2009). Os micro-organismos possuem uma maior facilidade para se adaptar ao ambiente reacional, mas alguns requisitos mínimos são necessários para sua utilização, tais como estabilidade genética, rápida multiplicação e baixa patogenicidade (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Para a maioria dos casos das biorreduções catalisadas por micro-organismos ou enzimas, o curso estereoquímico da reação é dependente dos requisitos estéricos do substrato, podendo ser previsto no modelo simples referido como “Regra de Prelog” (Figura 6). Segundo Prelog (1964), que realizou estudos de biorredução de decalonas por *Curvularia lunata*, na maioria das biorreduções a preferência do ataque do hidreto é pela face pseudo *re*, formando alcoóis de configuração *S*, estando a tendência de transferência do hidreto a esta face diretamente relacionada a diferença no tamanho dos átomos ligados a carbonila.

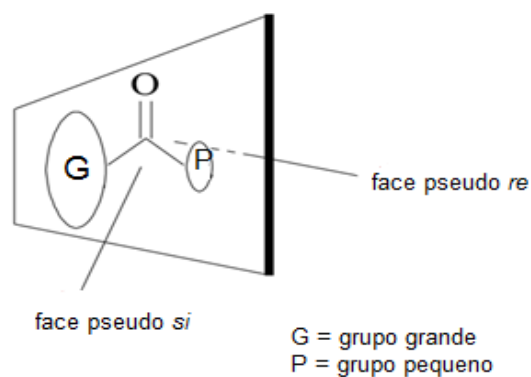


Figura 6. Representação esquemática do ataque a carbonila pelas faces pseudo *si* ou pseudo *re*.

Embora alcoóis de configuração consistentes com a Regra de Prelog sejam em geral os mais produzidos na biorredução microbiana de compostos carbonílicos, relatos de produtos anti-Prelog podem também ser encontrados na literatura. Homann et al. (2004) investigaram uma coleção de 300 microorganismos com relação a habilidade de reduzir cetonas aromáticas (Figura 7) a alcoóis secundários quirais, identificando 60 culturas capazes de atuarem como biocatalisadores. Nesta avaliação, alcoóis de configuração *R* e *S* foram obtidos com excesso enantiomérico (e.e) de 91 a 99% e rendimentos de até 95%, com destaque para preponderância de produtos seguindo a regra de Prelog. Estes autores também mencionam que os fungos (leveduras e fungos filamentosos) foram as cepas mais eficientes e seletivas na biorredução.

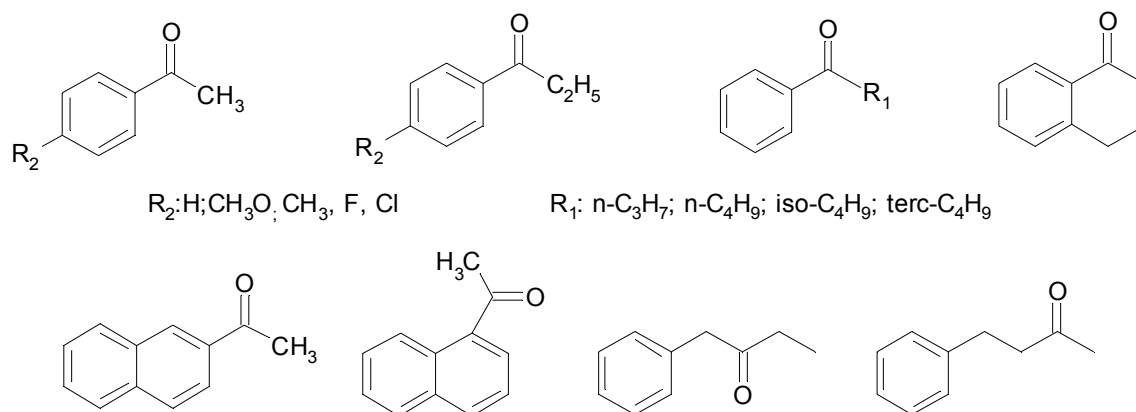
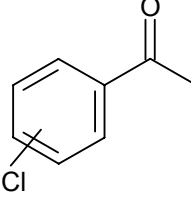
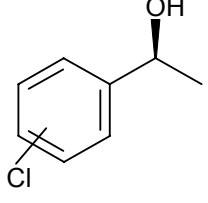
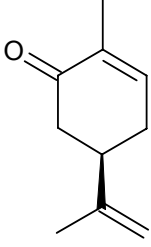
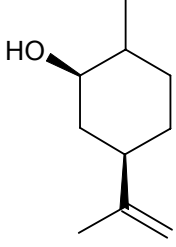
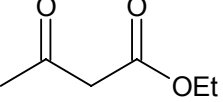
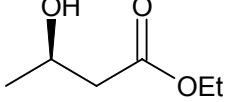
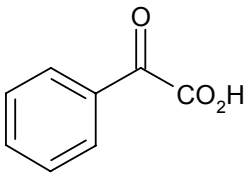
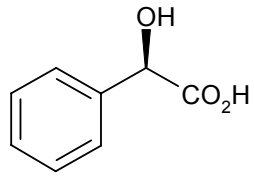


Figura 7. Cetonas aromáticas utilizadas na triagem de biocatalisadores (HOMANN *et al.*, 2004).

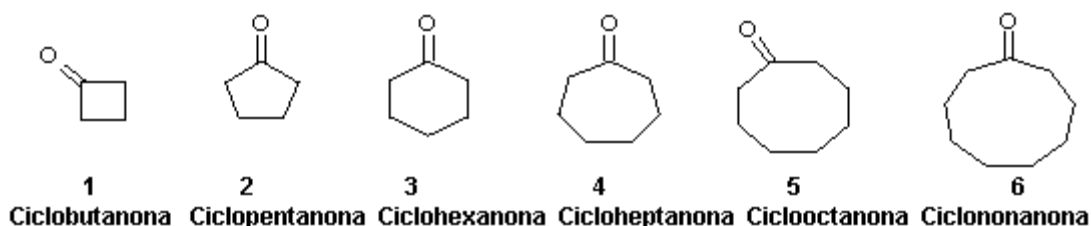
Devido a fatores como seletividade, rendimentos satisfatórios, facilidade de manuseio e disponibilidade, um dos micro-organismos mais investigados na biorredução de compostos carbonílicos é a *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como fermento de pão (KHOR; UZIR; 2001). Esta levedura é capaz de catalisar a transformação de diversos compostos carbonílicos levando a produtos enantiomericamente enriquecidos (Tabela 1), e em caso de compostos α , β -insaturados, como a carvona, a redução da carbonila e/ou da ligação dupla também pode ocorrer. Entretanto, devido a presença de várias redutases com atividades e estereosseletividades específicas, muitas vezes o uso desta levedura leva a um produto de pureza enantiomérica insatisfatória.

Tabela 1. Exemplos de redução de compostos carbonílicos por *Saccharomyces cerevisiae*.

| Reagente | Produto | | Referência |
|---|---|---------------------------------|----------------------|
|  |  | R = 0 a 99% e.e. = 64-100% | OU et al., 2008 |
| X-(cloro)-acetofenona | X-(cloro)-1-feniletanol | | |
|  |  | R = 73-80% e.e = 91% | YADAV et al., 2007 |
| R-Carvona | (1R)-(-)-Carvomentol | | |
|  |  | R = 59-76% e.e = 85% | ALBUQUERQUE, 2007 |
| Acetoacetato de etila | 3-hidroxidobutanoato de etila | | |
|  |  | R = 19 - 70%, e.e = 64 - 86% | XIAO et al., 2005 |
| Ácido Benzoilacético | Ácido 3-hidroxi-3-fenilacético | | |

R= Rendimento, e.e = excesso enantiomérico

A ação biocatalítica de uma variedade de outros fungos oriundos de biomassa terrestres e marinhos, bem como de fontes distintas como vegetais, solo, sedimentos ou animais, também tem sido investigada na tentativa de se conhecer o potencial biotecnológico da sua diversidade. Carballeira et al. (2004) avaliaram 416 cepas, sendo 71 bactérias, 45 actinomicetos, 59 leveduras, 148 fungos filamentosos, 33 fungos marinhos e 60 basidiomicetos, com o objetivo de selecionar biocatalisadores capazes de reduzir compostos carbonílicos cíclicos. Os fungos *Gongronella butleri*, *Diplogelasinospora grovesii* e a levedura *Schizosaccharomyces octosporus* foram selecionados como as cepas mais promissoras em função da produtividade, tolerância a altas concentrações de cetonas e ausência de produtos secundários na redução de cicloalcanonas. Cabe destacar que o tamanho do anel interferiu na ação catalítica, já que apenas *Absidia glauca*, *Gongronella butleri* e *Pyrenochaeta oryzae* foram capazes de reduzir todos os substratos avaliados (Figura 8).



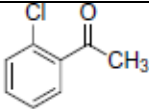
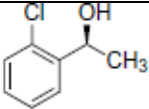
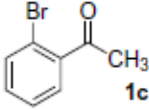
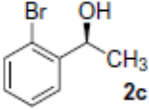
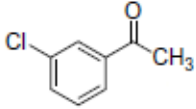
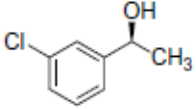
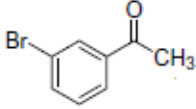
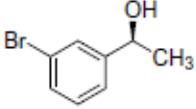
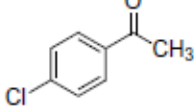
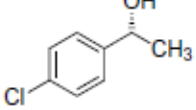
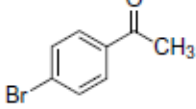
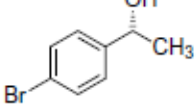
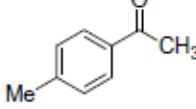
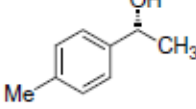
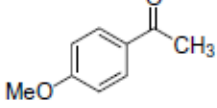
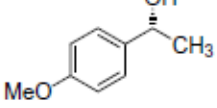
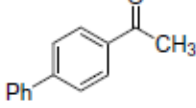
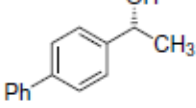
| Micro-organismos | (%) Conversão de cicloalcanonas | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|----|-----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| <i>Absidia glauca</i> | 20 | 9 | 81 | 80 | 8 | 87 |
| <i>Gongronella bluteri</i> | 67 | 33 | 100 | 26 | 18 | 25 |
| <i>Diplogelasinospora grovesii</i> | 77 | 14 | 85 | 9 | 0 | 0 |
| <i>Pyrenochaeta oryzae</i> | 14 | 1 | 67 | 17 | 26 | 41 |
| <i>Monascus kaoliang</i> | 29 | 6 | 89 | 15 | 11 | 0 |
| <i>Schizosaccharomyces octosporus</i> | 10 | 2 | 87 | 8 | 0 | 0 |
| <i>Neosartorya hiratsukae</i> | 0 | 4 | 71 | 7 | 14 | 0 |

Condições reacionais: 28 °C, agitação (250r.p.m), Crescimento celular: leveduras (tempo de cultura 48h), fungos filamentosos (72h de tempo de cultura). Tempo de reação, 72h. 10 MM de cetona.

Figura 8. Biotransformação de cicloalcanos na presença de diversos micro-organismos.

Cetonas aromáticas, como acetofenona e seus derivados, são freqüentemente empregadas como compostos modelo para avaliar de novos biocatalisadores. Kurbanoglu et al. (2007) relataram o estudo de dez cepas de *Alternaria alternata* isoladas de amostras de plantas tais como girassol, uva, e maçã na redução da acetofenona, para a produção do (S)-1-feniletanol obtendo rendimentos de até 100% e e.e superiores a 99%. Zilbeyaz e Kurbanoglu (2010) também avaliaram 90 micro-organismos (30 bactérias, 20 leveduras e 40 fungos) na redução de acetofenona, levando a seleção de *Rhodotorula glutinis* para a produção de (S)-1-feniletanol com conversões de até 100% e e.e superiores a 99%, após 24 hs de reação. De 14 cepas de *Aspergillus niger* isoladas de amostras de solo, uma foi selecionada (*Aspergillus niger* EBK-19) e após otimização de parâmetros como pH, tempo de reação e quantidade de catalisador, conversões moderadas (63%) e excesso enantiomérico de até 87% foram obtidos para o (S)-1-feniletanol, o produto Prelog (KURBANOGLU et al, 2007). Entretanto a posição dos substituintes no anel aromático interferiu no curso estereoquímico da reação, já que com os derivados de acetofenona substituídos na posição 4 os respectivos produtos anti-Prelog foram obtidos (Tabela 2).

Tabela 2. Conversão e excesso enantiomérico dos produtos da transformação de derivados da acetofenona utilizando o fungo *Aspergillus niger* EBK - 19 como biocatalisador.

| Substrato | Produto | e.e (%) | Conversão (%) |
|---|---|------------------|---------------|
|  |  | >99 (<i>S</i>) | 16 |
|  |  | 96 (<i>S</i>) | 11 |
|  |  | 57 (<i>S</i>) | 25 |
|  |  | 66 (<i>S</i>) | 21 |
|  |  | >99 (<i>R</i>) | 100 |
|  |  | >99 (<i>R</i>) | 100 |
|  |  | 95 (<i>R</i>) | 60 |
|  |  | 90 (<i>R</i>) | 33 |
|  |  | 65 (<i>R</i>) | 67 |

e.e = excesso enantiomérico

A busca de novos biocatalisadores para processos de redução assimétrica é uma das linhas de pesquisa em franca expansão devido à importância da obtenção de compostos enantioméricamente puros, em condições reacionais suaves e ambientalmente amigáveis (NI; XU, 2012). Considera-se que o número e diversidade de aplicações desta tecnologia ainda são reduzidos frente aos micro-organismos disponíveis e as reações que estes podem catalisar. Assim a busca por novos catalisadores presentes na biodiversidade local ainda é

uma ferramenta de importância, principalmente em habitats ainda pouco explorados ou com condições extremas, como as regiões áridas (Borges et al., 2009), pela possibilidade de isolamento de enzimas mais resistentes ou com propriedades catalíticas diferenciadas.

4. MATERIAIS E METODOS

4.1 Materiais

Acetato de Etila, Vetec P.A-A.C.S

Acetofenonas e derivados, Aldrich

Meio de cultura Batata Dextrose- BD (Extrato de batata e Dextrose; 24 g L⁻¹)
HIMEDIA

Meio de cultura Batata Dextrose Agar BDA para cultivo de microorganismos
(Extrato de batata, Dextrose; e Agar, 39 g L⁻¹) HIMEDIA

Agar, Vetec P.A-A.C.S

Glicose, Vetec P.A-A.C.S

Cloreto de Calcio, Vetec P.A-A.C.S

Sulfato de Ferro heptahidratado, Vetec P.A-A.C.S

Sulfato de Cinco, Vetec P.A-A.C.S

Sulfato de Manganeso heptahidratado, Vetec P.A-A.C.S

Câmara de incubação de Baixa Demanda de Oxigênio (BOD)

Cromatógrafo a gás (CG) Varian CP-3380 com detector de ionização de chama
DIC

Espectrometro de Massas SHIMADZU QP2010SE com coluna capilar
dimetilpolisiloxano RTX-MS (30 m x 0,25 mm x 0,30 µm)

Polarímetro Perkin-Elmer Modelo 2411 (Waltman, MA, USA), equipado com
lâmpada de Na ($\lambda = 589$ nm).

Incubadora Orbital Marconi MA-420

4.2. Métodos

4.2.1 Micro-organismo

O fungo conidial *Periconia hispidula* (Pers.) E. W. Mason & M. B. Ellis (1953), coletado por Cruz, A.C.R. nas Dunas do São Francisco, Bahia e pertence a Coleção de Cultura de Micro-organismos do Estado da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana-(UEFS) BA. Apresenta colônia com um crescimento moderado, com coloração castanha a castanha escura em alguns pontos. O micélio vegetativo é superficial, com presença de hifas hialinas, esporulando com aproximadamente 7 dias. (Figura 9).

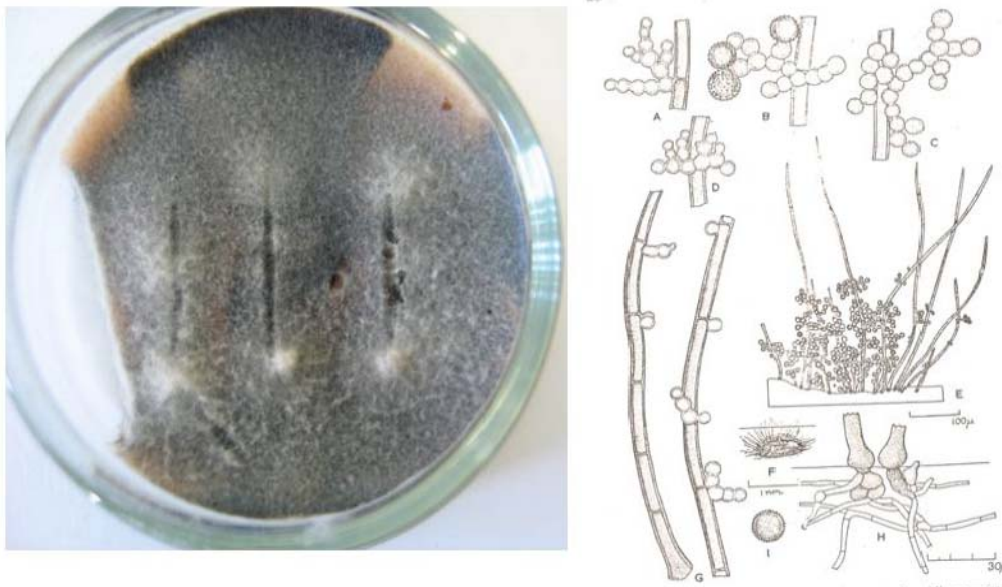


Figura 9. Cultura do fungo *Periconia hispidula* (à direita) e suas estruturas (à esquerda).
Fonte: GUSMÃO, 2012.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) da UEFS. Para a manutenção da viabilidade destes micro-organismos sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas, usou-se o método de preservação de *Castellani* (1967) a temperatura ambiente.

Para verificação da pureza e reativação do crescimento os fungos foram repicados em meio ágar BDA (*Broth Dextrose Agar* HEMEDIA), constituído de 39,0 g para 1 L de água destilada, e cultivados a 30°C em câmara de incubação de Baixa Demanda de Oxigênio (BOD), durante 7 dias.

5.2.2. Avaliação da fase de crescimento para acréscimo do substrato

A curva de crescimento foi inicialmente determinada por pesagem da biomassa seca em triplicata. No intuito de determinar o estágio de crescimento para acréscimo do substrato, utilizou-se 36 frascos reagentes de 250 mL, contendo 100 mL de caldo BD constituído de 24 g de batata dextrose para 1 L de água destilada, previamente esterilizado. Após esfriar acrescentou-se 5 discos com 5 mm de micélio, que foram cultivados sobre agitação em incubadora orbital MARCONI MA-420 a 30°C e 150 rpm para o crescimento do fungo. Coletas diárias (3 frascos) foram realizadas durante 12 dias para determinação da biomassa seca.

Para a comparação do tempo prévio de incubação, o mesmo meio reacional e a mesma quantidade de micro-organismo foram utilizados. Ao completar 96 h (*fase log*) e 198 h (*fase estacionária*) após inoculação, acrescentou-se 20 µL de acetofenona a cada tratamento e os mesmos foram mantidos em agitação durante o tempo de reação. Realizaram-se coletas de 2,0 mL do caldo fermentado com 24, 48, 72 e 96 horas de reação e o produto formado foi extraído com 2,0 mL de acetato de etila para determinação da conversão e o excesso enantiomérico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.3 Avaliação da forma de uso do biocatalisador

A avaliação da forma de acréscimo do substrato for realizada de duas formas: com células íntegras, onde o substrato foi adicionado diretamente ao meio de cultura após 96 h de crescimento do micro-organismo, e com células ressuspensas (em repouso), onde o micélio do fungo após 96 h (*fase log*) de

crescimento em caldo BD foi filtrado para separação do micélio. Nesta segunda etapa 3 g de micélio úmido foi ressuspenso em frascos reagentes de 250 mL contendo 100 mL de tampão fosfato, pH = 5,9, à 0,1 mol.L⁻¹ e 10% de glicose. Acrescentou-se 20 µL de acetofenona e a reação aconteceu na incubadora orbital MARCONI MA-420 a 30°C e 150 rpm.

4.2.4 Avaliação da influência da presença do íon Fe²⁺ no meio reacional

A avaliação ocorreu com o meio BD com e sem a complementação com 0,02 g L⁻¹ de FeSO₄. Frascos reagentes de 250 mL, contendo 100 mL meio BD constituído de 24 g de batata dextrose para 1 L de água destilada, previamente esterilizado, com e sem Fe₂SO₄ foram utilizados. Após esfriar acrescentou-se 5 discos com 5 mm de micélio, que foram cultivados sobre agitação em incubadora orbital MARCONI MA-420 a 30°C e 150 rpm para o crescimento do fungo. Ao completar 96 h após inoculação, acrescentou-se 20 µL de acetofenona a cada tratamento e os mesmos foram mantidos em agitação durante o tempo de reação. Realizaram-se coletas de 2,0 mL do caldo fermentado com 24, 48, 72 e 96 horas de reação e o produto formado foi extraído com 2,0 mL de acetato de etila para determinação da conversão e o excesso enantiomérico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.5 Tolerância do biocatalisador a acetofenona

A toxicidade da acetofenona foi avaliada com acréscimo de 5 diferentes quantidades de acetofenona (20, 50, 100, 150 e 200 mg) acrescentadas em meio BD complementado com 0,02g L⁻¹ de Fe₂SO₄. Foram coletadas alíquotas de 2 mL nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas para determinação da conversão e o excesso enantiomérico.

4.2.6. Reatividade e a seletividade do biocatalisador frente a distintas cetonas aromáticas

A reatividade e a seletividade do biocatalisador frente a distintas cetonas aromáticas (Figura 2) foram avaliadas em ensaios, com meio BD complementado com $0,02 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, após 96h de crescimento foi acrescentado 20 mg de substrato que reagiu por 48 h e a seguir realizou-se a extração total (2 x 25 mL de acetato de etila) do produto de reação. Os experimentos foram realizados em triplicata.

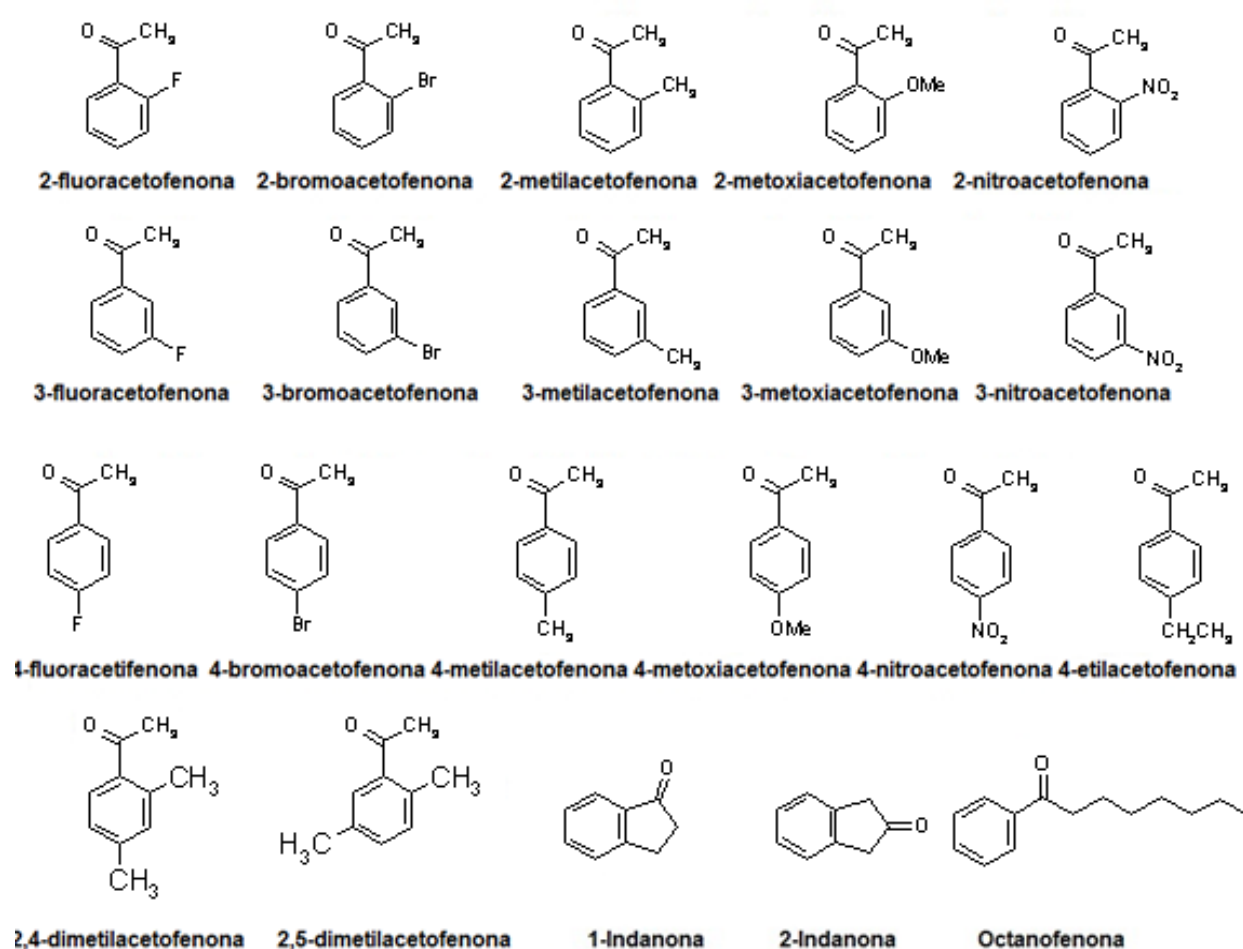


Figura 10. Estrutura dos substratos avaliados na biorredução pelo fungo *Periconia hispidula*.

4.2.7 Análises Cromatográficas

As amostras diluídas em acetato de etila foram analisadas por cromatografia a gás (CG) em equipamento da marca Varian CP-3380 com detector de ionização de chama DIC, com coluna quiral CYDEX-B (25m × 0,22m × 0,22 μm), mantendo-se um fluxo de 1mL.min⁻¹ de He (hélio) como gás de arraste e usando-se as condições de análises descritas na Tabela 3. A análise quantitativa foi obtida pela relação entre a área dos picos, obtida pelo método da normalização. Os produtos e reagentes foram identificados pela comparação com padrões autênticos das cetonas e alcoóis.

O excesso enantiomérico foi determinado nas mesmas condições e o cálculo do foi definido como a razão de $[(S)-(R)/(S)+(R)] \times 100\%$, em que (R) e (S) são as concentrações dos enantiômeros, respectivamente.

O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica ou cromatografia preparativa em camada delgada usando como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila (9:1) para confirmação das estruturas por cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massas e determinação da rotação ótica específica. Os produtos obtidos com as reações biocatalisadas foram analisados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em aparelho SHIMADZU QP 2010 SE com coluna capilar dimetilpolisiloxano RTX-MS (30,m x 0,25 mm x 0,30 μm). Nas análises foi utilizado hélio como gás de arraste, em modo split (1:10). O programa de aquecimento foi: de 3°C/min na fixa de 60° a 80°C e de 50°C/min na faixa de 80°C a 280°C, mantendo-se por 8 minutos nesta temperatura final, com a temperatura do injetor de 250°C e detector de 300°C. A determinação da rotação ótica específica foi realizada em polarímetro Perkin-Elmer Modelo 2411 (Waltman, MA, USA), equipado com lâmpada de Na ($\lambda = 589 \text{ nm}$).

Tabela 3. Condições cromatográficas das análises por cromatografia gasosa da acetofenona e seus derivados.

| Substituintes (*) | Temp. (°C) | Faixa de aquecimento (°C / min.) | Tempo de Permanência (min.) | Tempo Total (min.) |
|------------------------------|-----------------------|---|--|-------------------------------|
| | 100 | --- | 0 | 0 |
| | 150 | 5 | --- | 10 |
| 2, 3 e 4-Me | 100 | --- | 10 | 10 |
| | 200 | 10 | ----- | 20 |
| 2, 3 e 4-MeO | 140 | --- | 15 | 12 |
| | 200 | 10 | --- | 21 |
| 2, 3 e 4-Br | 140 | --- | 20 | 20 |
| | 200 | 5 | --- | 31 |
| 2, 3 e 4-F | 100 | --- | 10 | 10 |
| | 200 | 10 | --- | 20 |
| 2 e 4-NO₂ | 150 | --- | 12 | 12 |
| | 200 | 15 | --- | 30 |
| 3-NO₂ | 150 | --- | 30 | 30 |
| | 200 | 5 | 2 | 42 |
| 2, 4-diMe | 100 | --- | 10 | 10 |
| | 200 | 10 | 5 | 25 |
| 2, 5-diMe | 100 | --- | 10 | 10 |
| | 200 | 10 | 5 | 25 |
| 4-Et | 70 | --- | --- | --- |
| | 100 | 10 | 7 | 10 |
| | 200 | 5 | 5 | 35 |

(*) Condições: coluna quirial Cydex B, temperatura da coluna = 200°C e a temperatura do injetor = 220°C.

As amostras de 1-indanona, 2-indanona e octanofenona foram analisadas em cromatógrafo SHIMADZU com coluna quiral Agilent CP-Chirasil-DexCB (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) nas condições de análise apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições cromatográficas das análises por cromatografia gasosa da 1-indanona, 2-indanona e octanofenona.

| Substrato | Temp. (°C) | Faixa de aquecimento (°C / min.) | Tempo de Permanência (min.) | Tempo Total (min.) |
|--------------------------------|-------------------|---|------------------------------------|---------------------------|
| 1-indanona e 2-indanona | 110 | --- | 0 | 0 |
| | 130 | 0,5 | 15 | 25 |
| | 140 | 5 | 5 | 7 |
| octanofenona | 120 | --- | 7 | 7 |
| | 160 | 2 | 15 | 45 |

A **determinação da biomassa seca** (g) foi realizada após separação do massa micelial por filtração à vácuo, seguida por secagem até peso constante em estufa de secagem a temperatura de 60°C, por 24 h.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliações da fase de crescimento para acréscimo do substrato

A curva de crescimento do fungo *Periconia hispidula*, no meio reacional selecionado, foi obtida pela determinação da biomassa seca (MS) em gramas, durante 12 dias (288 h), no intuito de verificar o perfil de crescimento do isolado nas suas fases.

O perfil de crescimento do fungo *Periconia hispidula* em meio BD é apresentado na Figura 11. Pode se verificar um crescimento exponencial após as 50 horas, mantendo-se assim até cerca de 120 horas. Neste período, entre 50 e 120 horas, denominado de fase log, as reações enzimáticas possuem velocidade crescente, atingindo sua velocidade máxima no início da fase estacionária (BLACK, 2012).

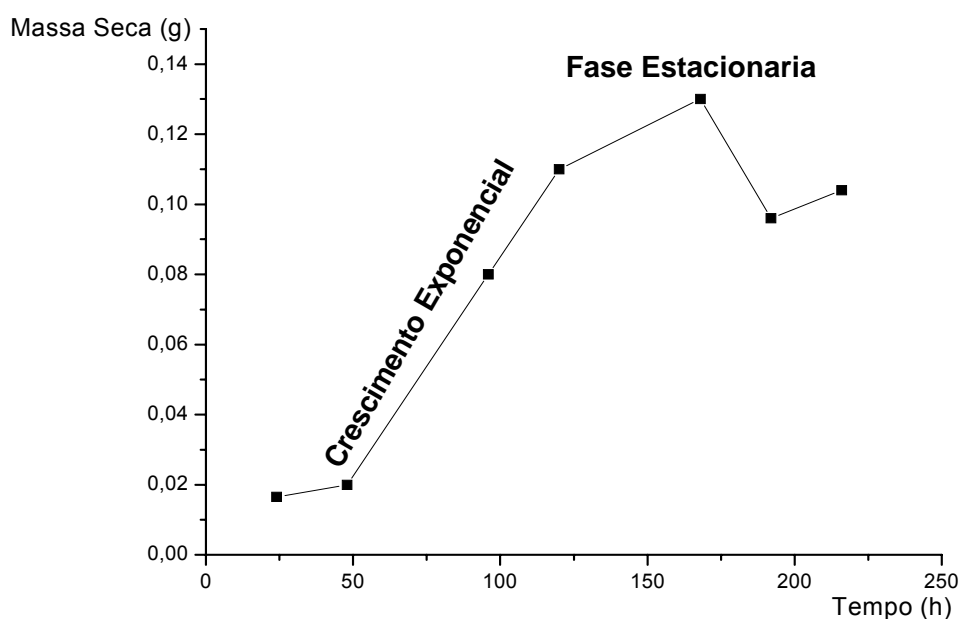


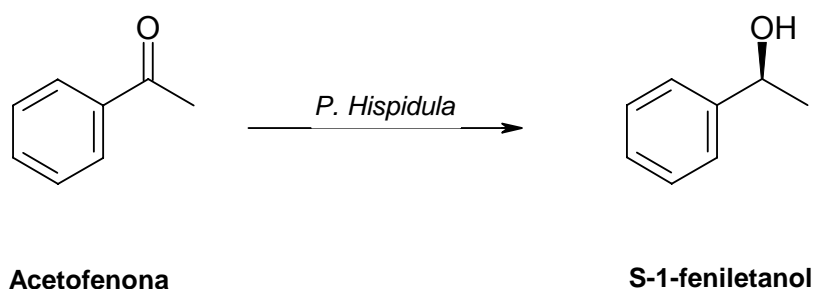
Figura 11. Curva de crescimento do fungo *Periconia hispidula* em meio BD.

Na fase estacionária que inicia após o ponto máximo da fase exponencial, (168 h) embora a produção enzimática seja elevada, a produção de metabólitos secundários também é aumentada, podendo dificultar a purificação de substâncias de interesse em uma reação de biocatálise. Assim optou-se por

avaliar a ação biocatalítica do fungo em dois momentos, após incubação prévia por 96 horas (que corresponde a aproximadamente metade da fase log) e após 168 horas (ponto máximo da fase exponencial).

Na Tabela 5 mostram-se os resultados obtidos na avaliação das duas diferentes fases de crescimento. A conversão máxima obtida com a reação iniciada após 96 h de crescimento foi de 92% (após 96 horas de reação), valor de conversão superior a obtida no experimento com incubação prévia por 168h, que atingiu apenas 50% após 96 horas de reação. É importante destacar que não houve variações nos valores de excesso enantiomérico (e.e = 98%) entre os dois experimentos e no decorrer da reação..

Tabela 5. Conversão (%) de acetofenona em S-1-feniletanol e excesso enantiomérico (%) da reação catalisada pelo fungo *Periconia hispidula* em diferentes fases de crescimento.



| Tempo de Reação (h) | Fases de Crescimento | | | |
|---------------------------|----------------------|---------|-----------------------------|---------|
| | <i>Log (96h)</i> | | <i>Estacionária (168 h)</i> | |
| | C (%) | e.e (%) | C (%) | e.e (%) |
| 24 | 62 | 98 | 43 | 98 |
| 48 | 87 | 98 | 48 | 98 |
| 72 | 91 | 98 | 49 | 98 |
| 96 | 92 | 98 | 50 | 98 |

Onde: C - Conversão (%); e.e - excesso enantiomérico (%).

A diminuição da conversão pode ter ocorrido em função da produção de metabólitos secundários pelo fungo com ação inibidora sobre as enzimas

presente no biocatalisador (BLACK, 2012). Como pode se observar quando o substrato foi acrescido na fase estacionária, com o uso do fungo com 168 h de crescimento, à reação ocorre quase que em sua totalidade (43%) nas primeiras 24 h (Figura 12).

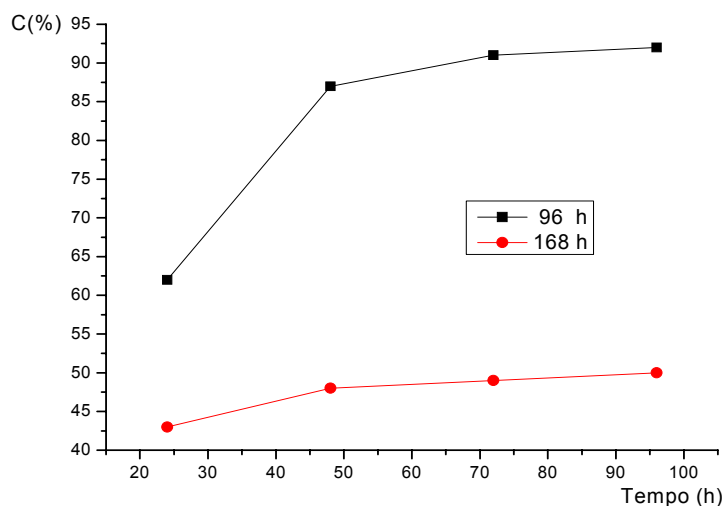


Figura 12. Gráfico da conversão (C) da biorredução da acetofenona em S-1-feniletanol para 96 e 168 h de crescimento do fungo *Periconia hispidula* em meio BD.

O álcool de configuração S foi obtido com 98% de excesso enantiomérico, obedecendo à regra de *Prelog*, mantendo-se inalterada a enantiosseletividade independente do estágio de crescimento que inicia a reação. Com base nos resultados estabeleceu-se 4 dias (96 h) de incubação prévia para adição do substrato na reação de biorredução catalisada pelo fungo *Periconia hispidula*.

5.2 Avaliações da forma de uso do biocatalisador

As reações de biorredução foram realizadas de duas formas: com células íntegras do micro-organismo em crescimento e resuspensas (em repouso).

Os resultados sumariados na Tabela 6 demonstram que a maior conversão foi obtida com o uso de células em crescimento foi utilizada, atingindo 92% de conversão após 96 horas de reação. Já a enantiosseletividade apresentou variações muito pequenas, mantendo-se na faixa de 95% a 98% independentemente da forma em que for usado o biocatalisador. Por outro lado o uso de células em repouso atingiu um 52% de conversão de acetofenona em

S-1-feniletanol. Assim foi escolhido para os experimentos posteriores o catalisador na forma de células em crescimento.

Tabela 6. Valores de conversão de acetofenona em S-1-feniletanol e excesso enantiomérico nos experimentos realizados com células em crescimento e células em repouso.

| Tempo de Reação (h) | Células em Crescimento | | Células em Repouso | |
|---------------------|------------------------|---------|--------------------|---------|
| | C (%) | e.e (%) | C (%) | e.e (%) |
| 24 | 50 | 97 | 15 | 95 |
| 48 | 86 | 97 | 36 | 97 |
| 72 | 90 | 98 | 47 | 97 |
| 96 | 92 | 98 | 54 | 97 |

C - Conversão (%); ee - excesso enantiomérico (%).

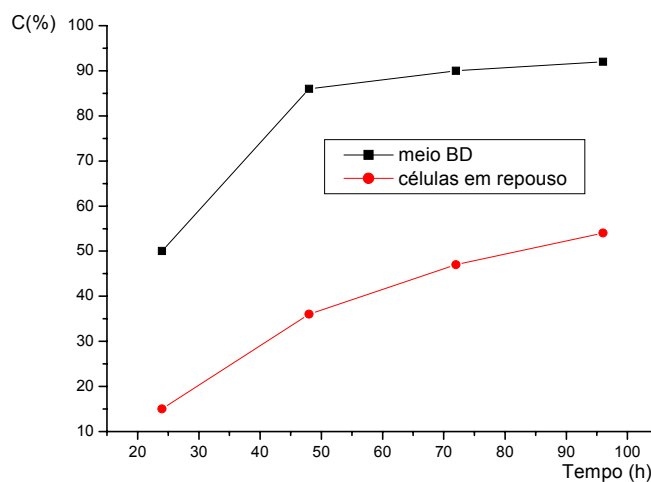
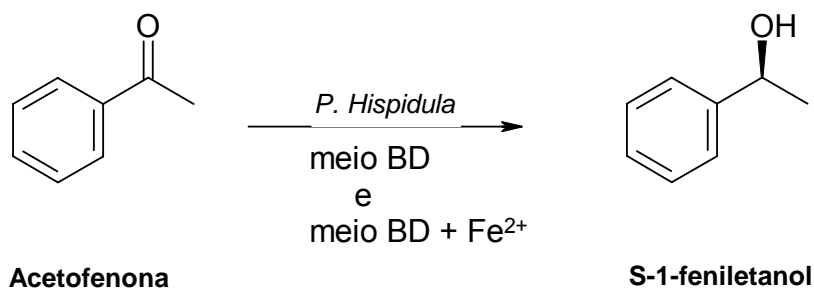


Figura 13. Gráfico da conversão para os experimentos realizados com células em crescimento em meio BD e células em repouso.

5.3 Avaliações da influência da presença do Fe^{2+} no meio reacional

Experimentos anteriores realizados por Machado (2012) indicaram que a presença de sulfato de ferro teve efeito significativo na conversão e na enantiosseletividade da reação de redução de acetofenona em S-1-feniletanol pelo fungo *Periconia hispidula*, em meio YM. Considerando este trabalho prévio em outro meio, a avaliação da influência da presença de sulfato de ferro em meio BD foi também realizada e os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados da adição do íon Ferro (Fe^{2+}) no meio BD na conversão (%) de acetofenona em S-1-feniletanol e no excesso enantiomérico (%) da reação catalisada pelo fungo *Periconia hispidula*.



| Tempo de Reação (h) | Concentração do FeSO_4 | | | |
|---------------------------|---------------------------------|---------|----------------------------------|---------|
| | $0 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ | | $0,02 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ | |
| | C (%) | e.e (%) | C (%) | e.e (%) |
| 24 | 50 | 97 | 70 | 97 |
| 48 | 86 | 97 | 90 | 98 |
| 72 | 90 | 98 | 91 | 98 |
| 96 | 92 | 98 | 92 | 98 |

C - Conversão (%); ee - excesso enantiomérico (%).

Verifica-se que não houve grandes diferenças nos valores de conversão entre os meio BD e BD com Fe^{2+} após 48 horas de reação. Embora o meio BD com Fe^{2+} alcance conversão superior (70%) após 24 h de reação, não houve

diferenças significativas na conversão (90-91%) após 72 h. Ou seja, a presença de ferro (Fe^{2+}) no meio BD foi importante para que a reação se processe mais rápido, tendo assim relação com a atividade enzimática. A enantiosseletividade se manteve elevada para ambos os experimentos, 97 a 98%, em todos os tempos reacionais indicando uma boa interação enzimática com o substrato, bloqueando uma das faces da carbonila (face pseudo *si*). (Figura 14B).

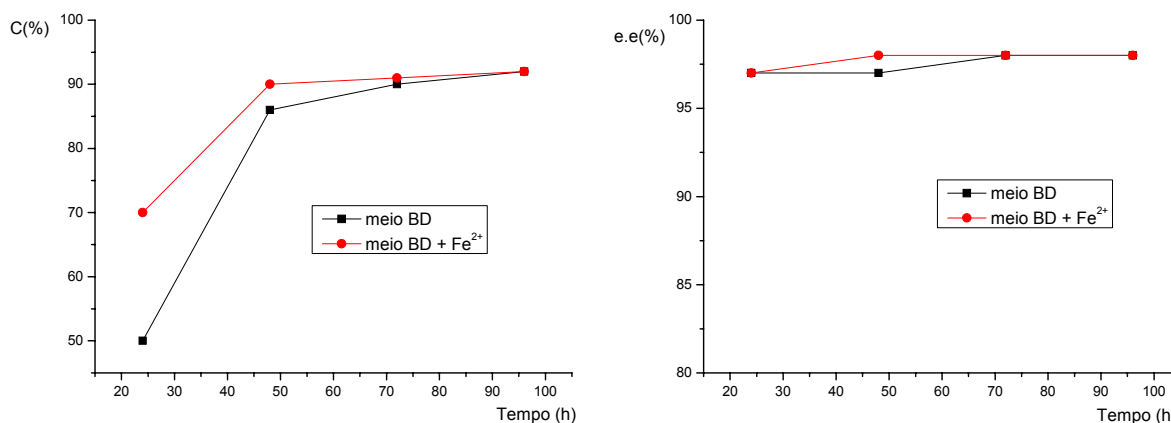


Figura 14. Conversão (C) e excesso enantiomérico (e.e) em meio BD com e sem a adição de íon Fe^{2+} .

Assim como fungo *Periconia hispidula* tem potencial para a redução da acetofenona em meio BD suplementado com Fe^{2+} , com valores da conversão e do excesso enantiomérico excelentes, este meio suplementado foi selecionado para os experimentos posteriores.

5.4. Tolerância do biocatalisador a acetofenona

Os valores de tolerância do fungo *Periconia hispidula* ao aumento da quantidade de substrato (acetofenona) no meio reacional foi testada nas seguintes quantidades 50 μL , 100 μL , 150 μL e 200 μL , são apresentados na Tabela 8 e na Figura 15.

Tabela 8. Valores de conversão (%) e enantiosseletividade (%) da biorredução de acetofenona em 1-feniletanol catalisada pelo fungo *Periconia hispidula* em presença de quantidades variadas de acetofenona.

| Concentração do Substrato (μL) | Conversão C (%) | | | | Excesso Enantiomérico (%) e.e | | | |
|---|--------------------|-----|-----|-----|-------------------------------------|-----|-----|-----|
| | 24h | 48h | 72h | 96h | 24h | 48h | 72h | 96h |
| 20 | 73 | 90 | 91 | 92 | 98 | 98 | 98 | 97 |
| 50 | 70 | 91 | 96 | 96 | 98 | 98 | 98 | 98 |
| 100 | 37 | 79 | 80 | 96 | 97 | 98 | 98 | 98 |
| 150 | 20 | 30 | 36 | 43 | 89 | 89 | 84 | 83 |
| 200 | 12 | 19 | 24 | 28 | 83 | 64 | 49 | 40 |

A redução nos valores das variáveis conversão e excesso enantiomérico até o acréscimo de 50 μL do substrato, demonstrando que as enzimas produzidas pelo fungo possuem uma alta seletividade, mantendo altos valores de conversão (96%) e de excesso enantiomérico do produto *S*-1-feniletanol (98%). Com o aumento da quantidade de acetofenona para 100 μL a conversão caiu (16%) em tempos menores de reação, mas a enantiosseletividade se manteve, assim como a conversão aumentou atingindo o patamar de 96%, após 96 h de reação. Estas variações podem estar relacionadas apenas a quantidade de enzima disponível no meio, que aumenta com a continuidade do crescimento micelial.

Para maiores quantidades de acetofenona (150 e 200 μL) a conversão foi inferior a 43% durante todos os períodos avaliados, mas com tendência ao aumento no decorrer do período reacional, sugerindo assim que maiores conversões poderiam ser obtidas em tempos mais prolongados. Entretanto o excesso enantiomérico foi reduzido drasticamente para valores entre 4-64% com o acréscimo de 200 μL indicando alterações na associação enzima-substrato ou baixa produção da enzima de interesse.

Assim pode-se sugerir que concentrações inferiores a 100 μL contribuem para que a reação seja mais rápida provavelmente devido a diminuição do efeito tóxico do substrato ao micro-organismo já que os experimentos ocorreram com células em crescimento.

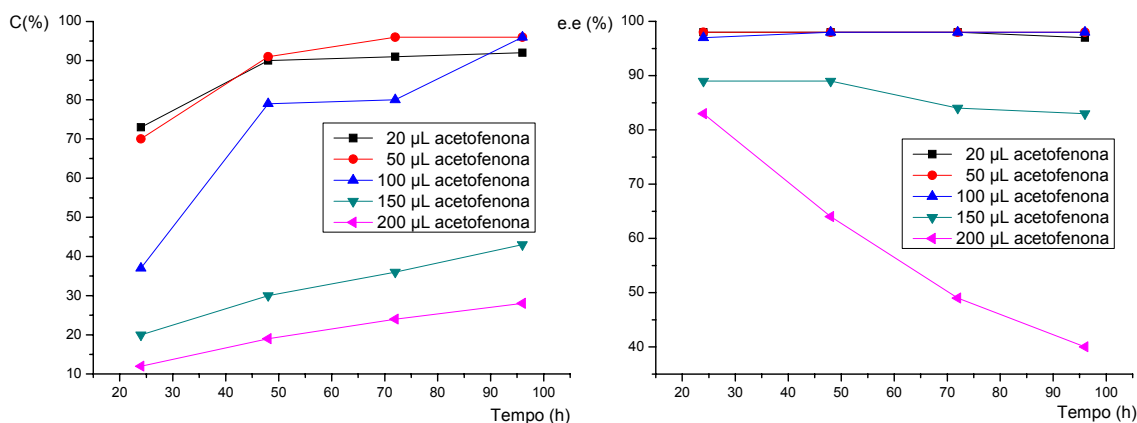


Figura 15. Conversão (C %) de acetofenona em 1-feniletanol e excesso enantiomérico (e.e) em meio BD em função da quantidade inicial de acetofenona.

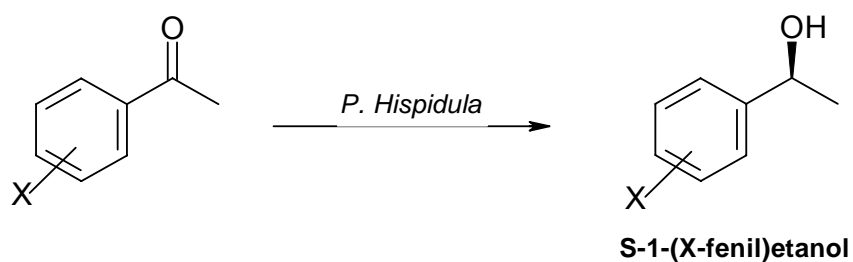
5.5. Reatividade e seletividade do biocatalisador frente a distintas cetonas aromáticas

A biorredução de cetonas aromáticas foi testada frente ao fungo *Periconia hispidula* para produção de alcoóis com objetivo de avaliar a influência dos substituintes do anel aromático na reatividade e seletividade enzimática. Estas propriedades do biocatalisador frente a distintas cetonas aromáticas foram investigadas em ensaios, com meio BD suplementado com ferro, usando células em crescimento e com acréscimo de 20 mg de substrato..

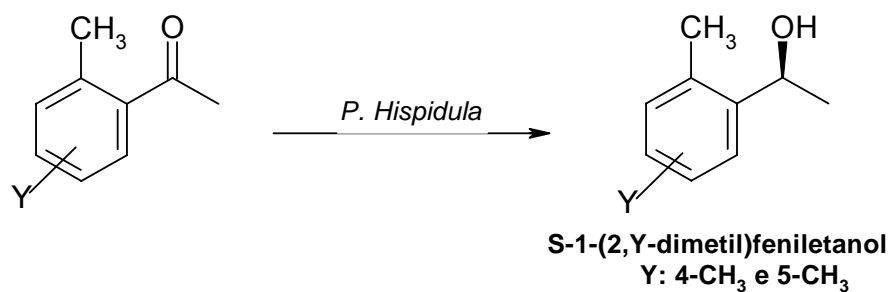
5.5.1 Com acetofenonas substituídas

Os resultados para a biorredução dos derivados de acetofenona mono e dissustituídas estão relacionados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores da biomassa seca (g), conversão (%) e excesso enantiomérico (%) e configuração da biorredução das acetofenonas substituídas em álcoois quirais pelo biocatalisador *Periconia hispidula*.



X: H, CH₃, OCH₃, Br, F, NO₂, C₂H₅



| Substituintes | BS (g) | C (%) | e.e (%) | Configuração |
|--------------------|--------|-------|---------|--------------|
| H | 0,417 | 87 | 96 | (S) |
| 2-CH ₃ | 0,342 | >99 | >99 | (S) |
| 3-CH ₃ | 0,397 | 83 | 96 | (S) |
| 4-CH ₃ | 0,349 | 73 | 90 | (S) |
| 2-OCH ₃ | 0,360 | > 99 | >99 | (S) |
| 3-OCH ₃ | 0,393 | 82 | >99 | (S) |
| 4-OCH ₃ | 0,335 | 56 | 79 | (S) |
| 2-Br | 0,217 | > 99 | >99 | (S) |
| 3-Br | 0,352 | > 99 | >99 | (S) |
| 4-Br | 0,280 | 97 | 54 | (S) |

| Substituintes | BS (g) | C (%) | e.e (%) | Configuração |
|---------------------------------------|---------------|--------------|----------------|---------------------|
| 2-F | 0,360 | > 99 | >99 | (S) |
| 3-F | 0,255 | 98 | 96 | (S) |
| 4-F | 0,298 | 72 | >99 | (S) |
| 2-NO₂ | 0,299 | > 99 | >99 | (S) |
| 3-NO₂ | 0,270 | > 99 | >99 | (S) |
| 4-NO₂ | 0,288 | 95 | 97 | (S) |
| 4-CH₂CH₃ | 0,325 | 56 | 54 | (S) |
| 2,4-CH₃ | 0,384 | > 99 | 96 | (S) |
| 2,5-CH₃ | 0,370 | 94 | 99 | (S) |

BS: biomassa seca; C: conversão; ee: excesso enantiomérico. Condições reacionais: agitação- 150 r.p.m., temperatura 30°C, quantidade de substrato - 20 mg ou 20 µL.

Pode-se constatar que para os derivados de acetofenona onde o substituinte encontra-se na posição *orto* (2-metilacetofenona, 2-metoxiacetofenona, 2-bromoacetofenona e 2-fluoracetofenona, 2-nitroacetofenona) os respectivos álcoois foram obtidos com 99% de conversão e de excesso enantiomérico em 48 h de reação, independente do efeito eletrônico do grupo substituinte (Tabela 9). Em todos os casos a configuração absoluta dos álcoois foi *S*, seguindo a regra de *Prelog*, com elevada enantiosseletividade. (ANEXO II e III)

Para os derivados substituídos na posição *meta* foram obtidos os melhores resultados de redução, com valor de conversão maior a 99%, para 3-bromoacetofenona, 3-fluoracetofenona e 3-nitroacetofenona (ANEXO IV). Entretanto para 3-metilacetofenona e 3-metoxiacetofenona (ANEXO V) ocorreu uma diminuição na conversão (cerca de 80%) estando isso coerente com a característica elétron-doadora destes grupos que poderiam diminuir a eletrofilicidade da carbonila. As seletividades obtidas mantiveram-se altas superiores a 96%, indicando assim uma associação efetiva entre o substrato e a enzima, bloqueando a face *si* da carbonila para o ataque do hidreto, já que a configuração dos álcoois produzidos foi *S*.

Embora o efeito eletrônico elétron-doador ou elétron-aceptor na reatividade da carbonila possa ser notado quando substituintes estão nas posições 2 e 3, outros tipos de efeitos também podem atuar nestas posições, tais como o volume do grupo substituinte, polarizabilidade e as interações polares com o sítio ativo da desidrogenase, que podem tornar-se predominantes; justificando assim os resultados obtidos para os derivados nas posições 2 e 3, (ANEXO IV e V).

Para os derivados com o substituinte na posição *para* os resultados são interessantes, conforme demonstrado na Figura 16.

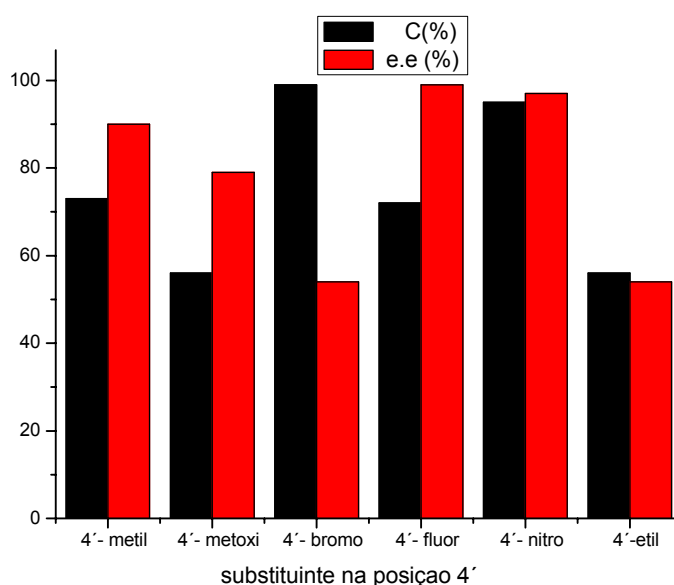


Figura 16. Comparação dos valores de conversão (C %) e de excesso enantiomérico (e.e %) dos derivados de acetofenona monossustituídas na posição *para*.

Segundo Rodrigues et al. (2004) a presença de grupos retiradores de elétrons na posição 4 propicia uma melhor transferência de hidreto do NADH ou NADPH ao carbono carbonílico pela enzima desidrogenase presente. Assim, explicariam-se os melhores resultados de conversão da 4-nitroacetofenona (ANEXO VI) e 4-bromoacetofenona (ANEXO VIII), um grupo retirador de elétrons, em relação com as cetonas 4-metilacetofenona (ANEXO VII), 4-metoxicetofenona (ANEXO VI) e 4-etilacetofenona (ANEXO VII) onde grupos

doadores de elétrons estão presentes. Entretanto, o mesmo não foi observado com o derivado 4-fluoracetofenona (ANEXO VIII), sendo obtida uma conversão similar (72%) a reação com a 4-metilacetofenona (73%).

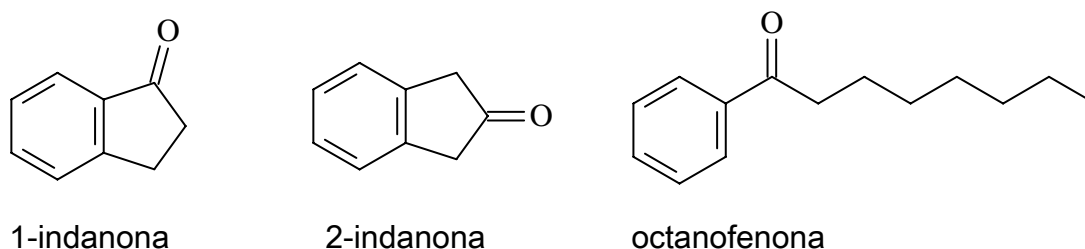
No caso da reação com 4-bromoacetofenona em comparação com a 4-fluoracetofenona, apesar de a conversão ser maior (97%), apenas 54% de excesso enantiomérico foi obtido (ANEXO). Este comportamento pode estar associado a uma das desvantagens da redução de cetonas que envolvam células inteiras, pois as enzimas pró-S e pró-R desidrogenase podem competir pelo substrato, o que leva a produção do álcool com baixos valores de excesso enantiomérico (RODRIGUES et al., 2004). Os resultados obtidos podem também ser devido ao volume do átomo ter dificultado a proteção de uma das faces da carbonila, já que o átomo de bromo é maior que o de flúor.

As acetofenonas dissustituídas (2,4-dimetilacetofenona e 2,5-dimetilacetofenona, ANEXO IX) tiveram altas conversões (99 e 94%) e excelentes excessos enantioméricos (superiores a 96%) com valores comparáveis a 2-dimetilacetofenona.

5.5.2 Outros Compostos Carbonílicos Aromáticos

Foram realizadas as reações, nas mesmas condições, com as cetonas 1-indanona, 2-indanona e octanofenona no intuito de comparar o potencial biocatalítico do fungo *Periconia hispidula* frente a outros substratos carbonílicos. Os resultados são apresentados Tabela 10.

Tabela 10: Valores da biomassa seca (g), conversão (%) e excesso enantiomérico (%) das reações da 1 - indanona, 2 - indanona e octanofenona com o biocatalisador *Periconia hispidula*.



| Cetonas | BS (g) | C (%) | ee (%) | Configuração |
|---------------------|--------|-------|--------|--------------|
| 1-Indanona* | 0,454 | 8 | 54 | S |
| 2-Indanona* | 0,456 | 100 | - | - |
| Octanofenona | 0,401 | 0 | - | - |

BS: biomassa seca; C: conversão; ee: excesso enantiomérico. Condições reacionais: agitação- 150 rpm, temperatura – 30°C, quantidade de substrato - 20 mg.

Os resultados indicam a seletividade da enzima já que mudanças no tamanho da cadeia lateral ou na posição da carbonila levaram a quedas drásticas dos valores de conversão. Como os resultados de biomassa seca após o tempo reacional de 48 horas não apresentaram variação, nem mesmo em comparação com a biomassa obtida na reação com acetofenona, a toxicidade dos substratos não foi fator determinante na reatividade nesta concentração utilizada corroborando assim com a hipótese da seletividade enzimática.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram realizadas reações de redução de cetonas utilizando o fungo *Periconia hispidula*, isolado do semiárido Baiano, na biorredução de compostos carbonílicos aromáticos. Apesar da biodiversidade de micro-organismos desta região, o potencial biocatalítico dos mesmos é pouco explorado assim este trabalho contribuiu com o aumento do conhecimento do potencial biotecnológico desta diversidade microbiana.

Neste sentido, o estudo realizado tem importância no que se refere ao emprego do fungo *Periconia hispidula* como biocatalisador. Assim obteve-se que:

- O estágio para acréscimo do substrato foi após incubação prévia do micro-organismo por 96 h, e a melhor forma de uso do catalisador foi com células em crescimento
- O meio otimizado para a biorredução do biocatalisador foi o meio BD suplementado com Fe^{2+} .
- O biocatalisador apresentou resistência a toxicidade da acetofenona até 1 mg. mL^{-1} de concentração (100 mg em 100 mL de meio reacional).
- O fungo *Periconia hispidula* catalisou vários compostos carbonílicos aromáticos com bons valores de conversão e excesso enantiomérico, em meio BD suplementado com Fe^{2+} .
- Os melhores resultados foram para os derivados da acetofenona monossustituídas na posição *orto*. Nos casos estudados a conversão e o excesso enantiomérico foram maiores de 99%.
- Nos testes com outras cetonas aromáticas demonstrou ser altamente eficiente na bioconversão de 2-indanona.

Com nestes estudos sugere-se para futuro experimentos avaliar o isolamento e caracterização das enzimas responsáveis pelo processo de biorredução presentes no fungo *Periconia hispidula*; realizar os mesmos experimentos com as enzimas isoladas para comparar os resultados; estudar biorredução de outros compostos carbonílicos aromáticos e não aromáticos,

tanto para o uso de células inteiras como para as enzimas isoladas do fungo *Periconia hispidula*.

7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALBUQUERQUE, P. M. **Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na redução de substratos carbonílicos**; Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis; 2007.

ANDREAS, L.; KARSTEN, S.; CHRISTIAN, W.; **Industrial Biotransformations** Second Edition Edited by Wiley-VCH: Weinheim, 2006.

BLACK, J. G., **Microbiology: principles and explorations**, 8th ed. John Wiley & Sons: New Jersey, USA, 2012.

BORGES, K. B., SOUZA BORGES, W., DURÁN-PATRÓN, R., TALLARICO PUPO, M., SUELI BONATO, P., GONZÁLEZ COLLADO, I.; Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts; **Tetrahedron: Asymmetry**, 20, 107, 385–397, 2009.

BORNSCHEUER, U T ; HUISMAN, G W ; KAZLAUSKAS, R J ; LUTZ, S ; MOORE, J C ; ROBINS, K, Engineering the third wave of biocatalysis; **Nature**, 485, 7397, 185-94, 2012.

BUCKLAND, B. C., DUNNILL, P., LILL, M. D., The enzymatic transformation of water-insoluble reactants in non-aqueous solvents. Conversion of cholesterol to cholest-4-ene-3-one by a *Nocardia* sp., **Biotechnology and Bioengineering**, 17, 6, 815–826, 1975.

CARBALLEIRA, J. D. et al.; *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018, a new whole cell biocatalyst for the stereoselective reduction of ketones; **Tetrahedron: asymmetry**, 15, 6, 951-962, 2004.

COMASSETO, J. V.; ASSIS, L. F.; ANDRADE, L. H.; SCHOENLEINCRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M. Biotransformations of ortho-, meta- and paraaromatic

nitrocompounds by strains of *Aspergillus terreus*: Reduction of ketones and deracemization of alcohols. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 39, 24-30, 2006.

CRUZ, A. C. R. da; GUSMÃO L. F. P. Fungos conidiais na Caatinga: espécies lignícolas, **Acta Botanica Brasilica**, 23, 4, 1133-1144, . 2009.

DE CARVALHO, C., Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes, **Biotechnology Advances**, , .29, 1, .75-83, 2011.

FABER, K., **Biotransformations in Organic Chemistry**, 6^a ed. Berlin: Editora Springer-Verlag, 2011.

GOTOR-FERNANDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals., **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 40, 111-120, 2006.

GUSMÃO, L. F. P.; MAIA, L. C. Diversidade e caracterização dos fungos do Semi-Árido brasileiro. Recife: MCT/**Associação Plantas do Nordeste**. 2006.

GUSMÃO, L. F. P.; MARQUES, M. F. O.; Diversidade de fungos no Semi - árido Brasileiro. In: QUEIROZ, L. P. Q., RAPINI A., GIULIETTI A. M. (Eds)**Towards Greater Knowledge of the Brazilian Semi-arid Biodiversity**. Brasília: MCT., 79-82, 2006.

HALLING, P.J., Thermodynamic predictions for biocatalysis in non-conventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design analysis, **Enzyme Microb. Technol.**, 16, 178–206, 1994.

HAWKSWORTH, D. L., The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revised, ***Mycological Research***, 105, 12, 1422-1432, 2001.

HILDERBRANDT, G., KLAVEHN W.; 1 - 1 - phenyl-2-methylaminopropan-1-ol; Patent D, editor. Verfahren zur Herstellung von; 1930. Germany

HOLLMANN, F.; SCHMID, A. Electrochemical Regeneration of oxidoreductases for cell-free biocatalytic redox reactions., **Biocatal. Biotransform.** . 22, 2, 63-88, 2004.

HOMANN, M. J. et al. Rapid identification of enantioselective ketone reductions using targeted microbial libraries. **Tetrahedron**, 60, 3, 789-797, 2004.

KHOR, G. K., UZIR, M. H., *Saccharomyces cerevisiae*: a potential stereospecific reduction tool for biotransformation of mono and sesquiterpenoids, **YEAST**, 28, 93-107, 2011.

KLIBANOV, A.M., Enzymes that work in organic solvents, **CHEMTECH**, 16, 354-359, 1986.

KURBANOGLU, E. B.; ZILBEYAZ, K.; KURBANOGLUC, N. I.; KILIC H. Enantioselective reduction of substituted acetophenones by *Aspergillus niger*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 18, 10, 1159–1162, 2007.

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

MACHADO, S. S. **Biorredução de cetonas por fungos conidiais do semiárido brasileiro**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

MASON, E.W.; ELLIS, M.B.; *Periconia Curta*; Mycological Papers, 56, 72, 1953.

MARTÍNKOVÁ, N. KLEMPIER, J. BARDAKJI, A. KANDELBAUER, M., OVESNÁ, T.; PODAŘILOVÁ, M. I.; PŘEPECHALOVÁ, H. ; GRIENGL, V.; KŘEN, K., **J. Mol. Cat. B: Enzym.**, 14, 95-99. 2001.

MUÑOZ SOLANO, D. ; HOYOS, P. ; HERNÁIZ, M.J. ; ALCÁNTARA, A.R. ; SÁNCHEZ-MONTERO, J.M; Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs; **Bioresource Technology**, V115, 196-207, 2012.

PORTO, A. L. M. **Isolamento e Seleção de Microrganismos Brasileiros para Reações de Biocatálise e Produção de Metabólitos**. 2002. 413 f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química, Campinas, 2006.

RICARDO, J. L.; RENATO, W., Seleção de microorganismos com ação sobre compostos carbonilados gerando alcoóis quirais, **Dynamics**, 1, 14, 73-79, 2008.

RODRIGUES, J. A. R.; MORANI, P. J. S.; CONCEIÇÃO, G. J. A. et al. Recent Advances in the biocatalytic asymmetric reduction of acetophenones and α , β -unsaturated carbonyl compounds, **Food Technology Biotechnology**, 42, .4, 295–303, 2004.

SANCHEZ, S., DEMAIN, A.L.; Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical and biotechnological significance; **Org. Process Res. Dev.** 15; 224–230; 2011.

SHAPIRO, R., DICOSIMO, R., HENNESSEY, S. M., STIEGLITZ, B., CAMPOPIANO, O., CHIANG, G. C., **Org. Process Res. Dev.**, 5, 593-598, 2001.

SINGH, A.; GOEL, Y.; RAI, A. K.; BANERJEE, U. C. Lipase catalyzed kinetic resolution for the production of (S)-3-[5-(4-fluoro-phenyl)-5-hydroxy-pentanoyl]-4-phenyl-oxazolidin-2-one: An intermediate for the synthesis of ezetimibe, **J. Mol. Cat. B: Enzym.** 85-86, 99-104, 2013.

TABER, G.P.; PFISTERE D. M.; COLBERG, J. C.; **Org. Proc. Res. Developm.**; 8, 385-388, 2004.

TOMOKO, M., YAMANAKA, R., B, NAKAMURA, K., Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction, **Tetrahedron: Asymmetry**, 20, 513–57, 2009.

TRINCONE, A., Marine Biocatalysts: Enzymatic Features and Applications, **Marine Drugs**, .9, 4, 478-499, 2011.

WEINREB, O.; AMIT, T.; BAR-AM, O.; YODIM, M. B. H.; Rasagiline: A novel anti-Parkinsonian monoamine oxidase-B inhibitor with neuroprotective activity, . **Progress in Neurob.**; 92, 330-344, 2010.

YADAV J.S., REDDY G.S.K.K., SABITHA G., *Daucus carota* and baker's yeast mediated bioreduction of prochiral ketones, **Tetrahedr Asymm** 18: 717–723, 2007.

YAN NI, JIAN-HE XU; Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols, **Biotechnology Advances** 30 1279–1288, 2012.

YANG, Z.. H, LUO, L. CHANG, X., ZHOU, W., CHEN, G.H., ZHAO, Y., WANG, Y.J., Production of chiral alcohols from prochiral ketones by microalgal photo-biocatalytic asymmetric reduction reaction, **J Ind Microbiol Biotechnol**, 39, 6, 835-841, 2012.

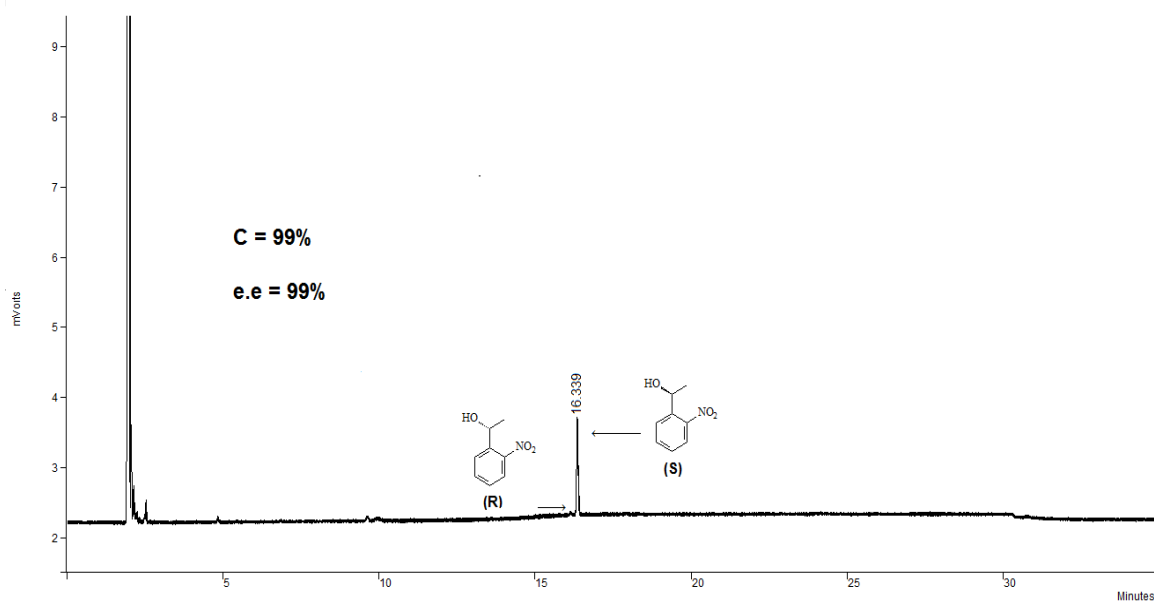
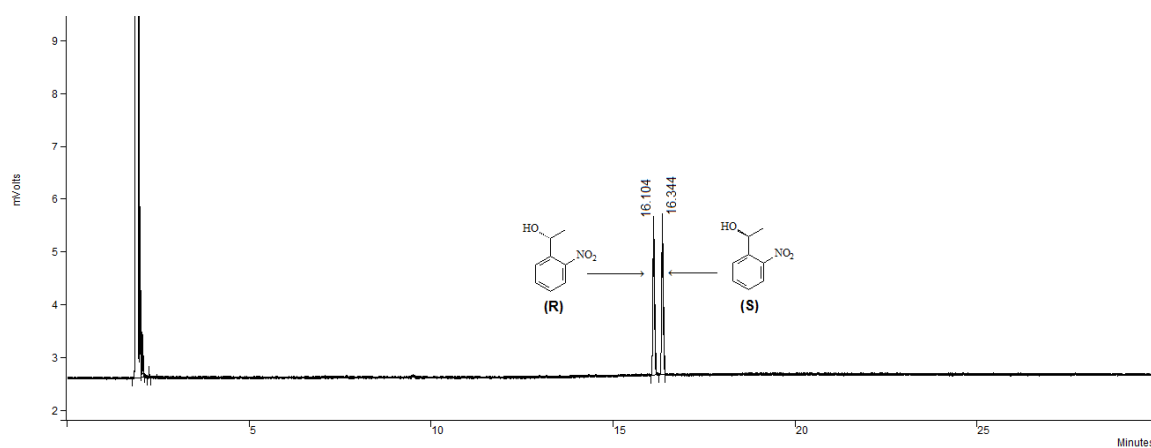
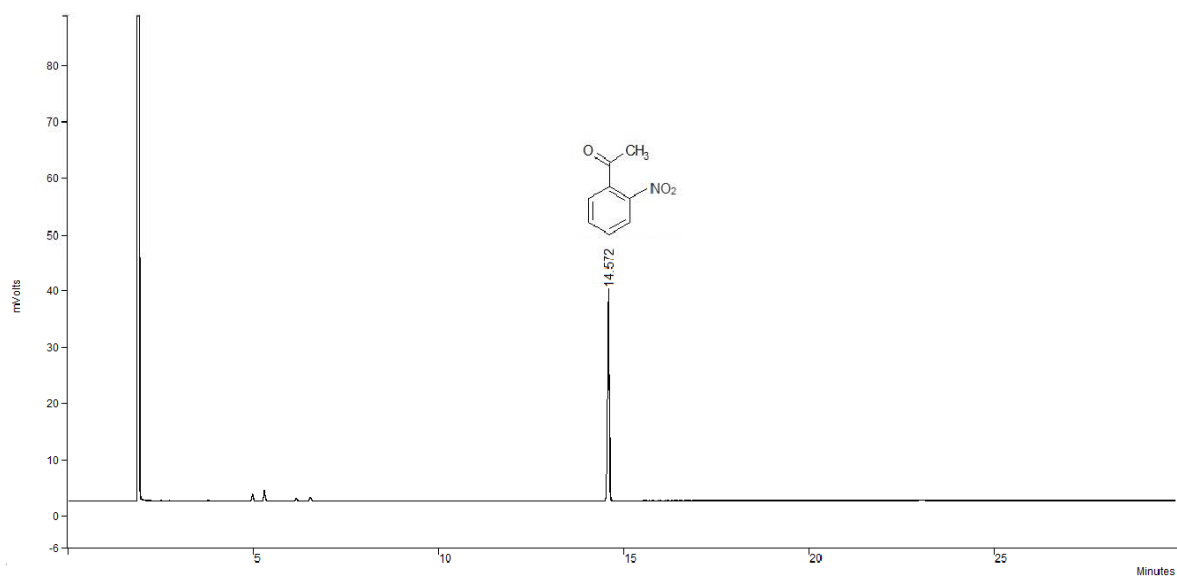
ANEXOS

ANEXOS

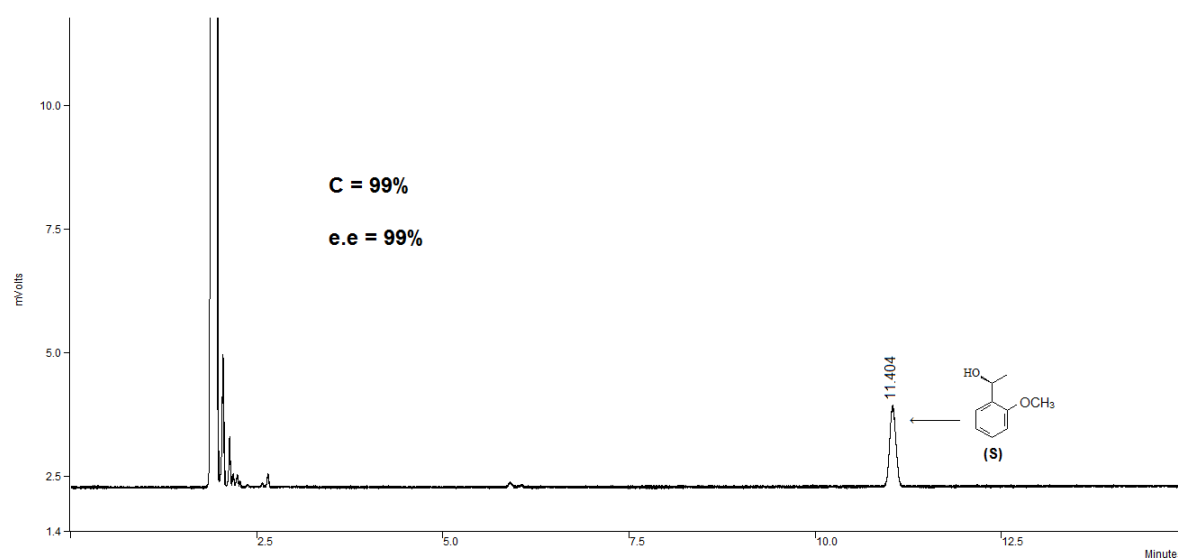
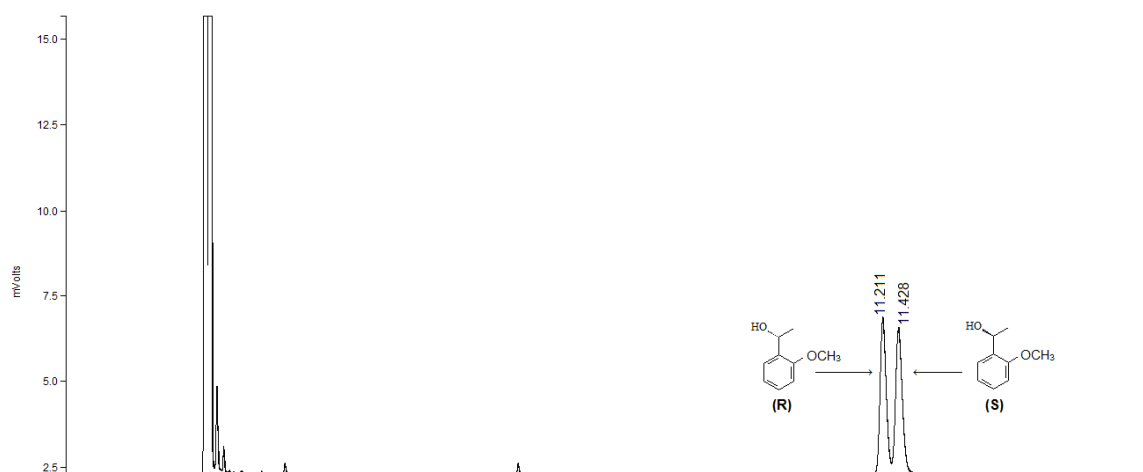
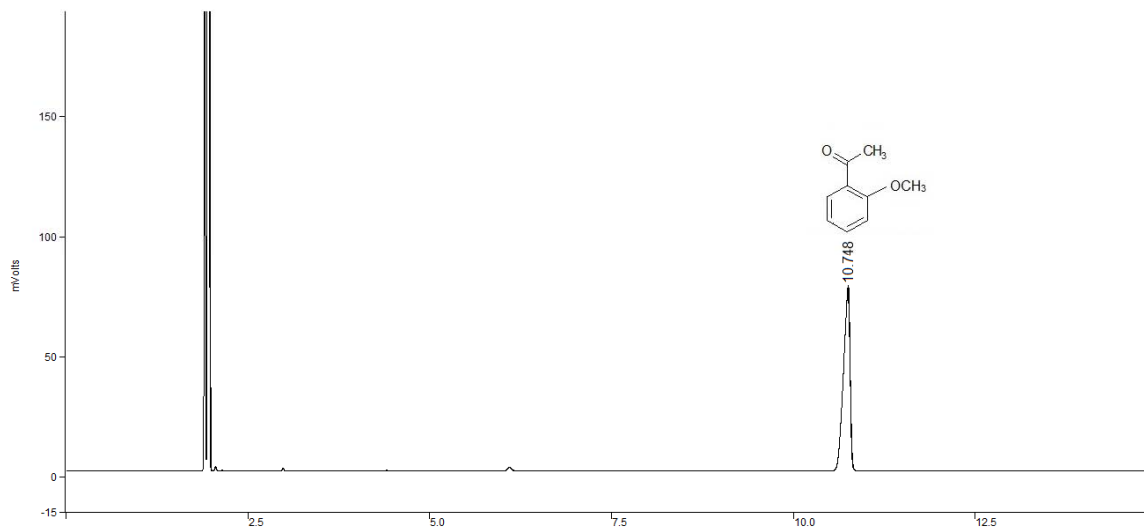
Anexo I. Tempo de retenção da acetofenona e seus derivados com seus respectivos álcoois obtidos por via química.

| Substituintes | Tr(min.) Acetona | TR₁(min.) Álcool I | TR₂ (min.) Álcool II |
|---------------------------------------|-----------------------------|--|--|
| Acetofenona | 10,214 | 15,267 (R) | 16,974(S) |
| 2 - CH₃ | 13,242 | 16,32 | 16,650 |
| 3 - CH₃ | 14,635 | 15,637 | 15,789 |
| 4 - CH₃ | 15,098 | 15,588 | 15,788 |
| 2 - OCH₃ | 10,748 | 11,211 | 11,428 |
| 3 - OCH₃ | 11,143 | 13,664 | 13,888 |
| 4 - OCH₃ | 15,171 | 13,832 | 14,025 |
| 2 - Br | 10,214 | 15,267 | 16,974 |
| 3 - Br | 12,033 | 18,504 | 18,933 |
| 4' - Br | 12,605 | 18,865 | 19,442 |
| 2 - F | 8,477 | 13,660 | 13,945 |
| 3 - F | 10,775 | 14,571 | 14,803 |
| 4 - F | 11,240 | 14,409 | 14,665 |
| 2 - NO₂ | 14,572 | 16,104 | 16,344 |
| 3 - NO₂ | 16,853 | 36,364 | 36,604 |
| 4 - NO₂ | 15,909 | 20,218 | 20,395 |
| 2'4 - CH₃ | 16,173 | 17,845 | 18,147 |
| 2'5 - CH₃ | 16,066 | 17,840 | 18,100 |
| 4-CH₂CH₃ | 20,489 | 20,730 | 20,922 |
| 2-indanona | 18.662 | 25.267 | - |

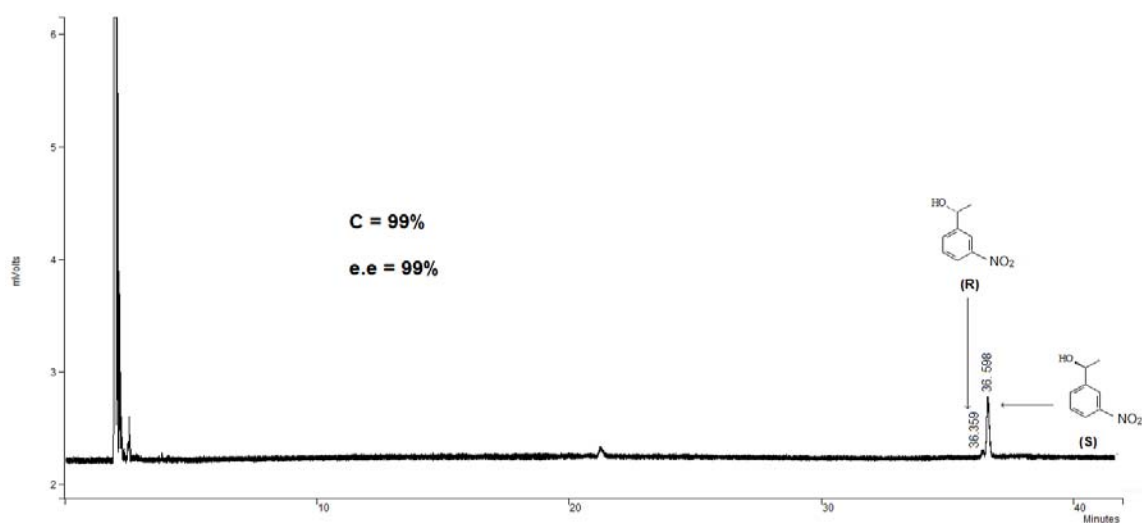
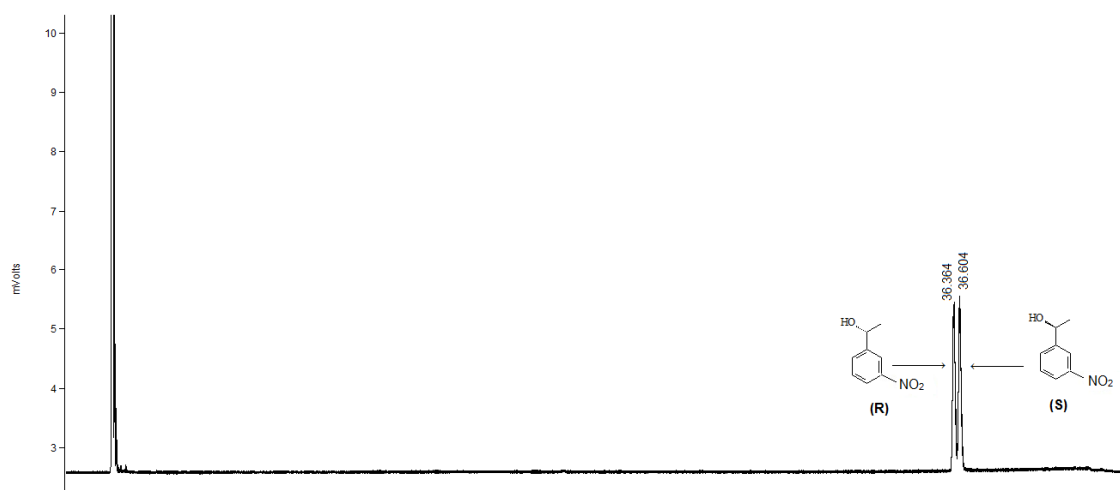
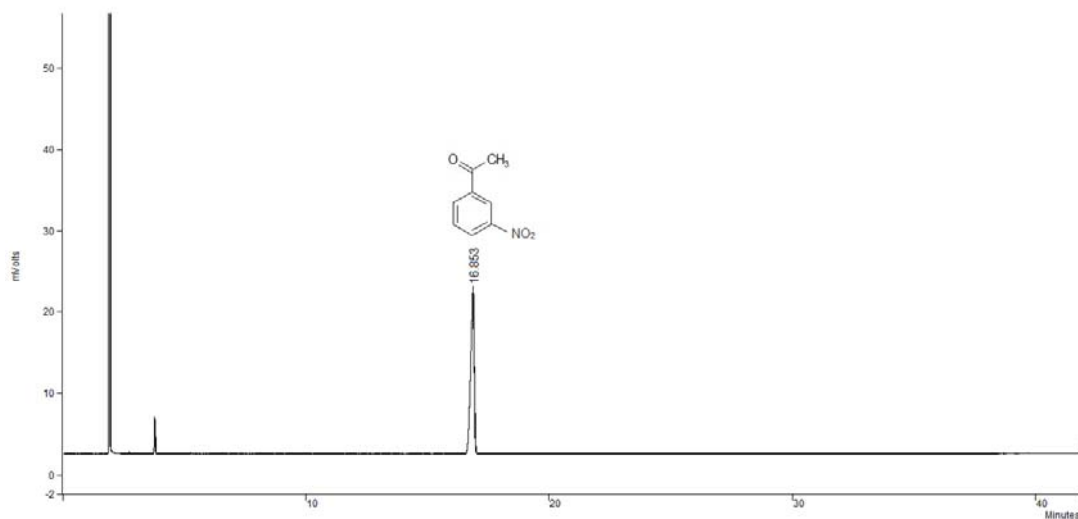
(*) Condições: coluna quiral Cydex B, temperatura da coluna = 200°C e a temperatura do injetor = 220°C.



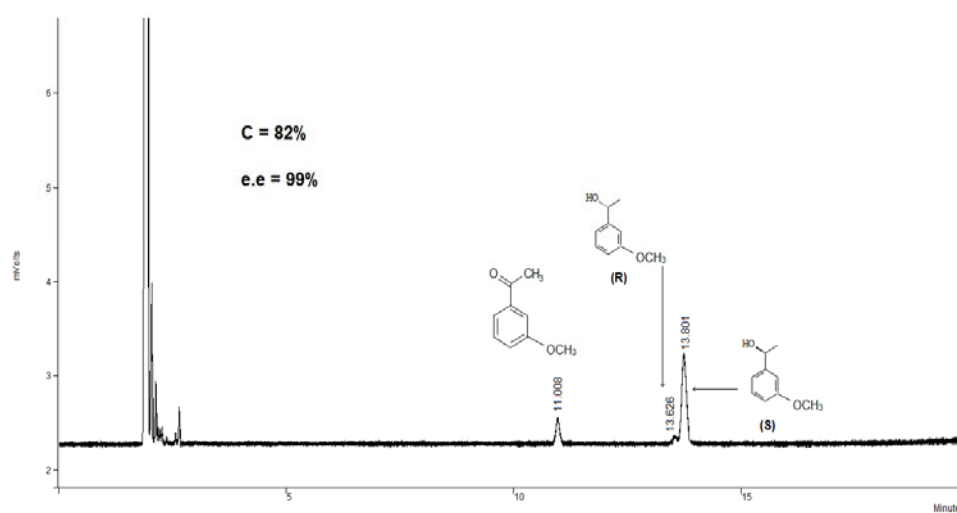
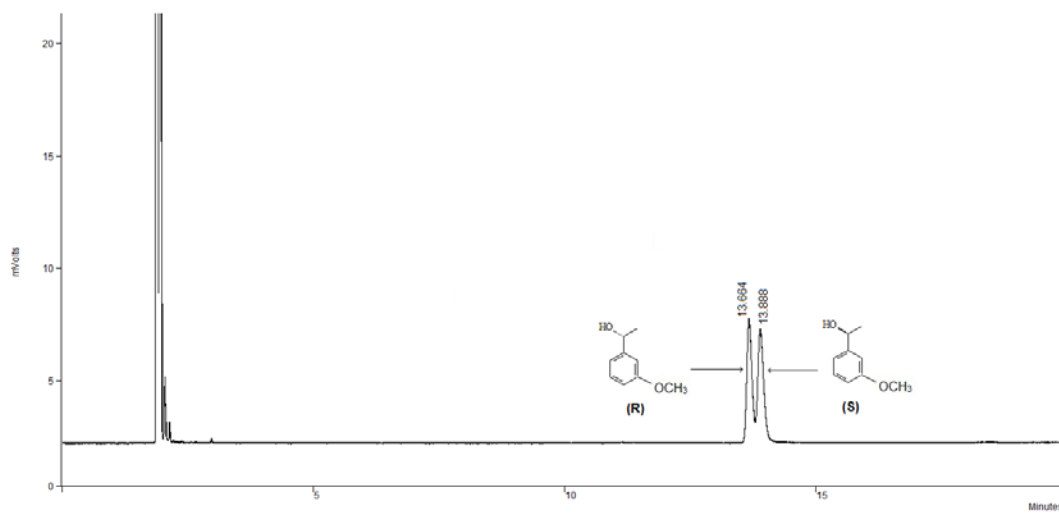
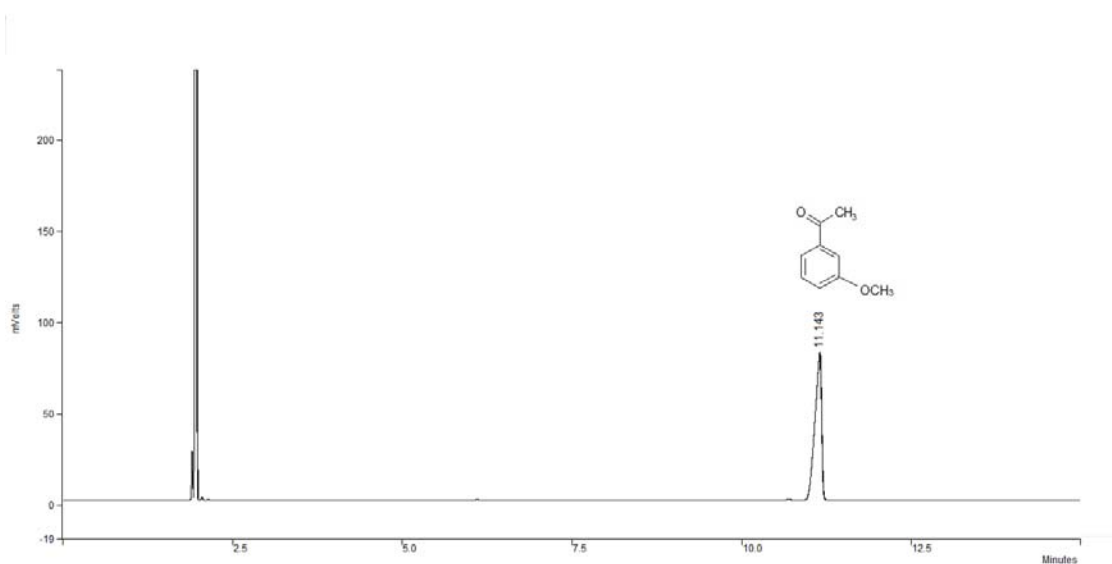
Anexo II. Cromatogramas da 2-nitroacetofenona, *rac*-1-(2-nitrofenil)etanol e do *S*-1-(2-nitrofenil)etanol.



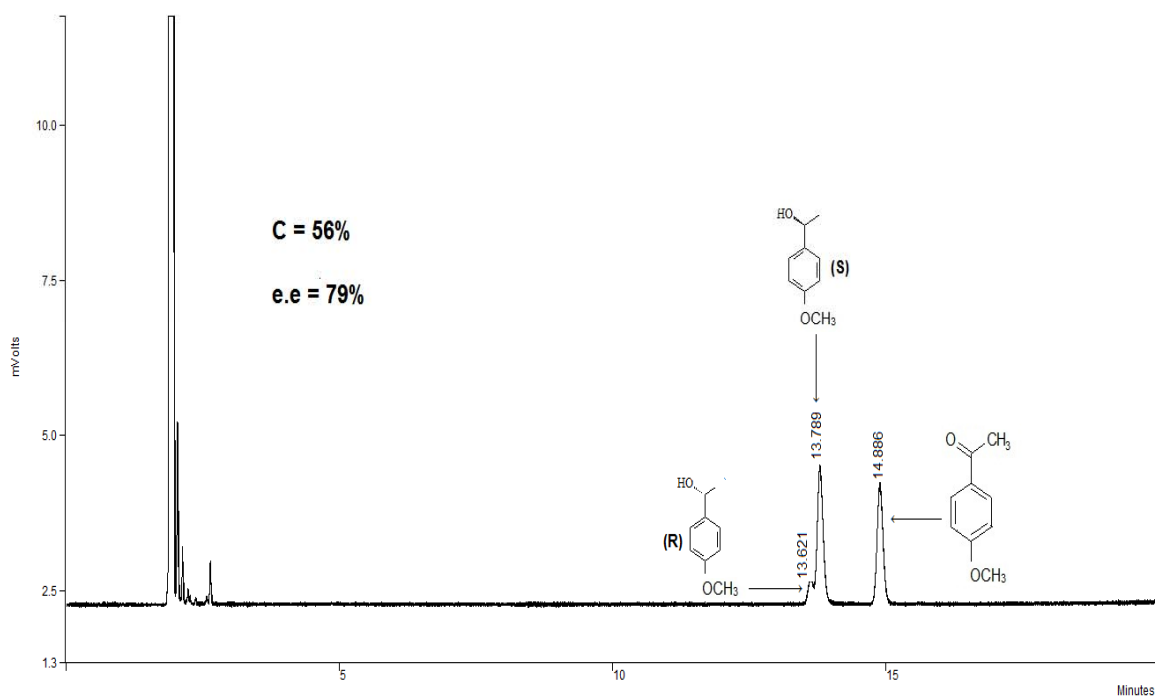
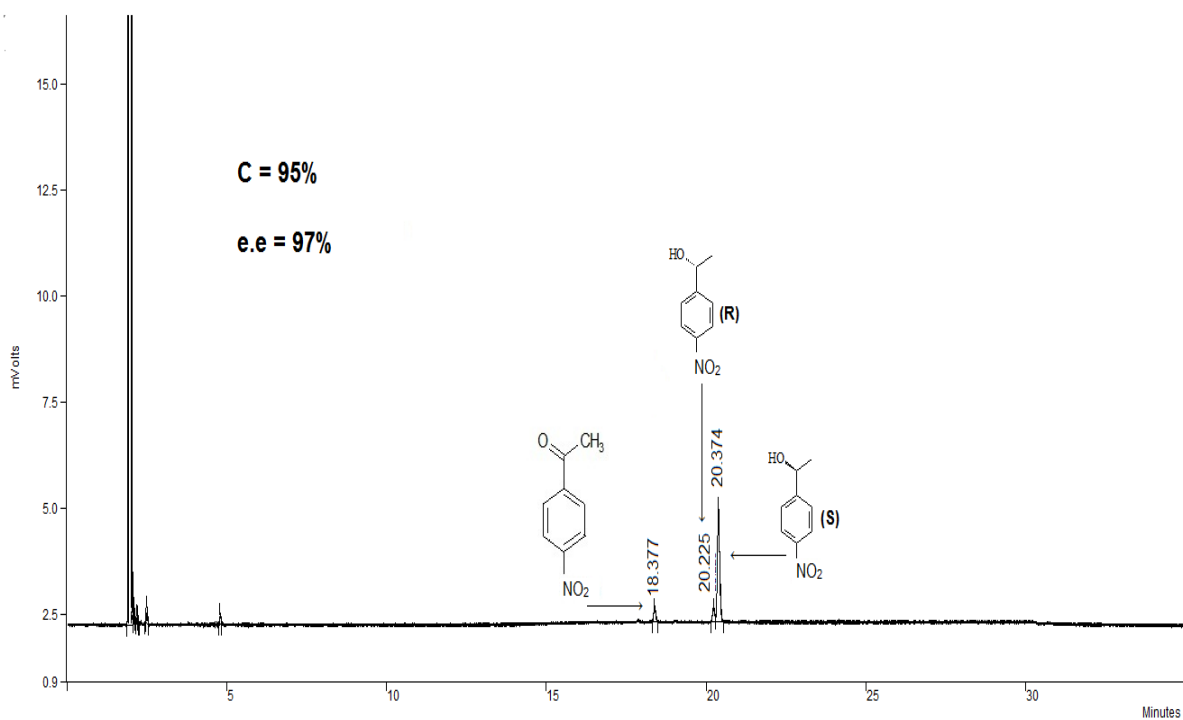
Anexo III. Cromatogramas da 2-metoxicetofenona, *rac*-1-(2-metoxifenil)etanol e do *S*-1-(2-metoxifenil)etanol.



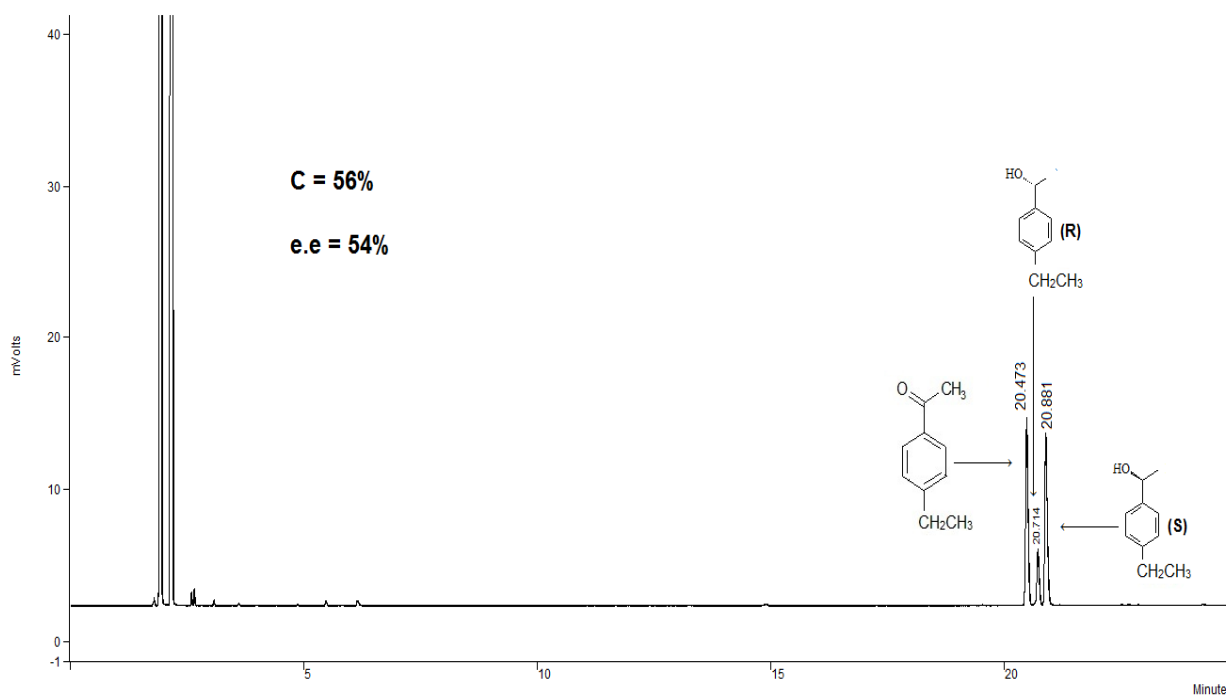
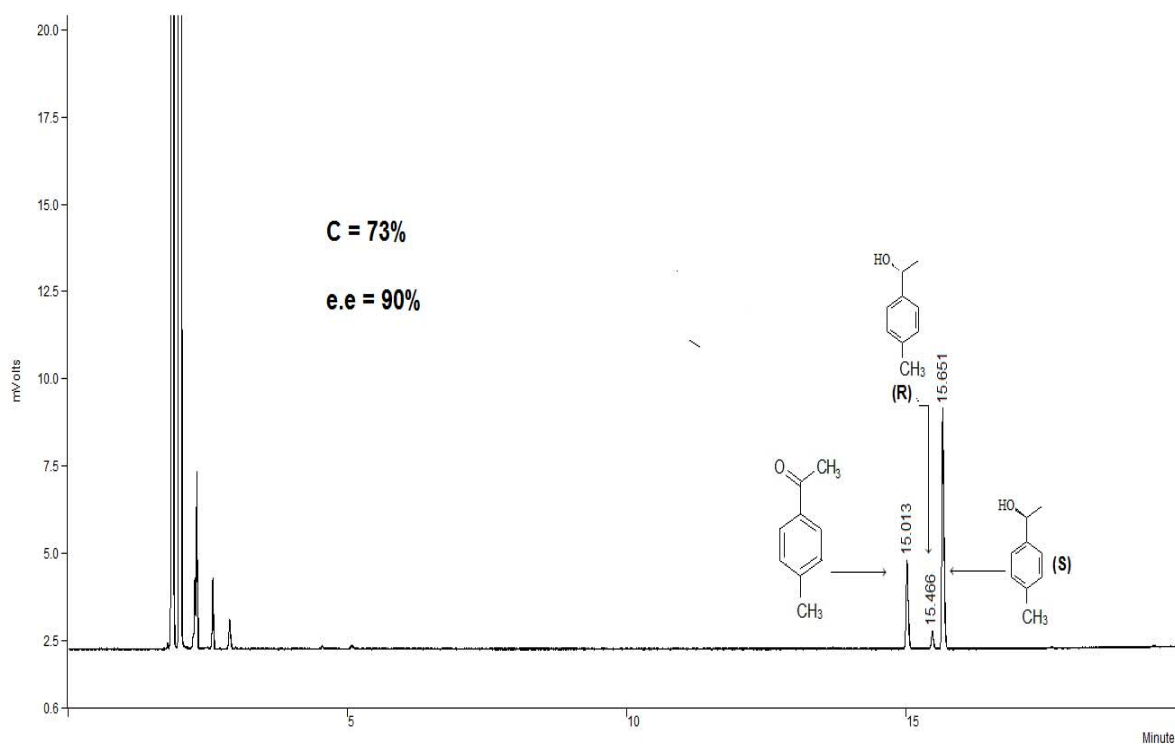
Anexo IV. Cromatogramas da 3-nitroacetofenona, *rac*-1-(3-nitrofenil)etanol e do *S*-1-(3-nitrofenil)etanol.



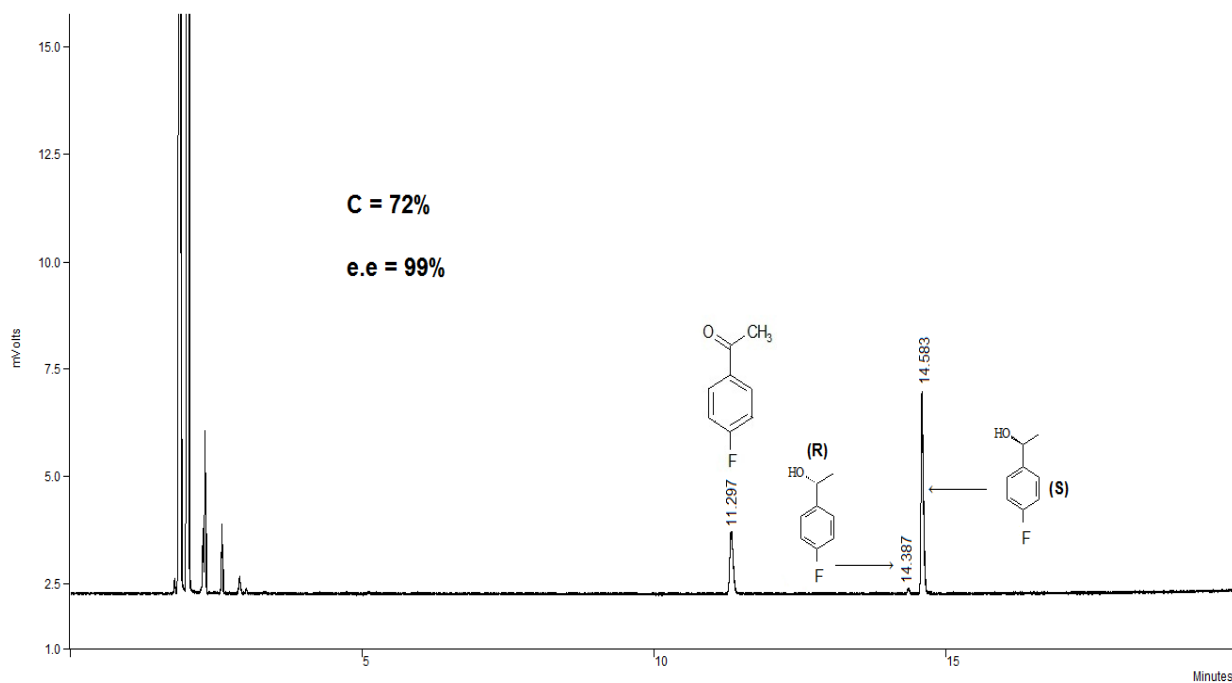
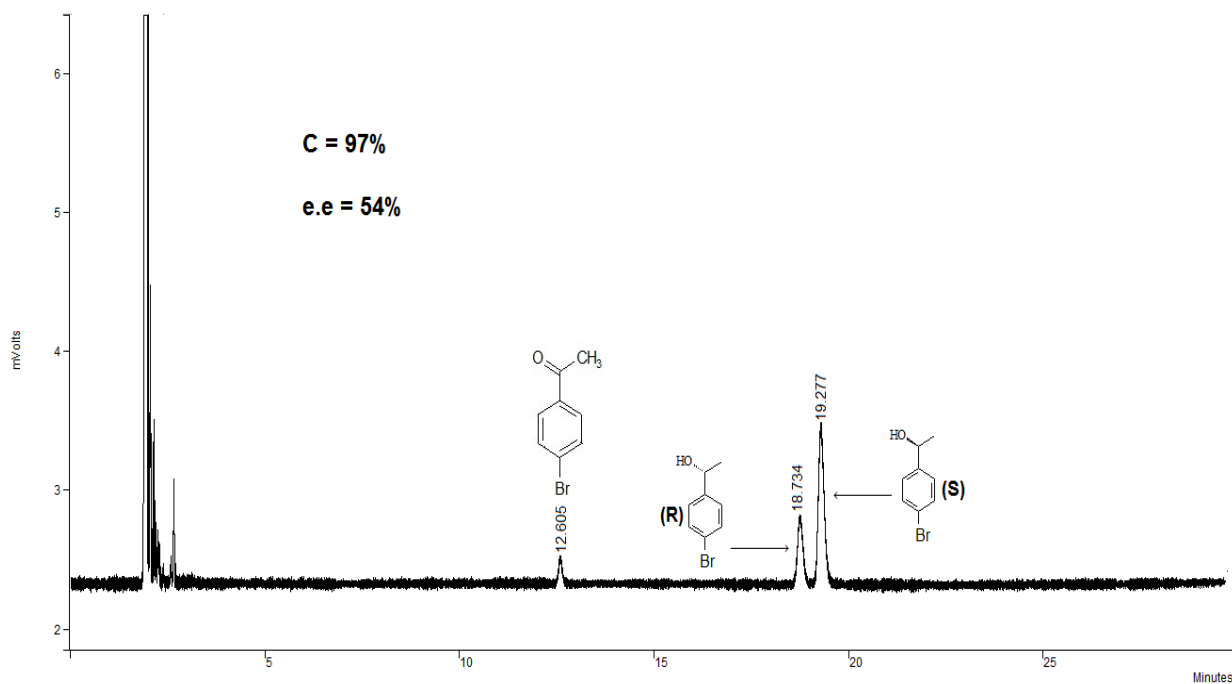
Anexo V. Cromatogramas da 3-metoxicetofenona, *rac*-1-(3-metoxifenil)etanol e do *S*-1-(3-metoxifenil)etanol.



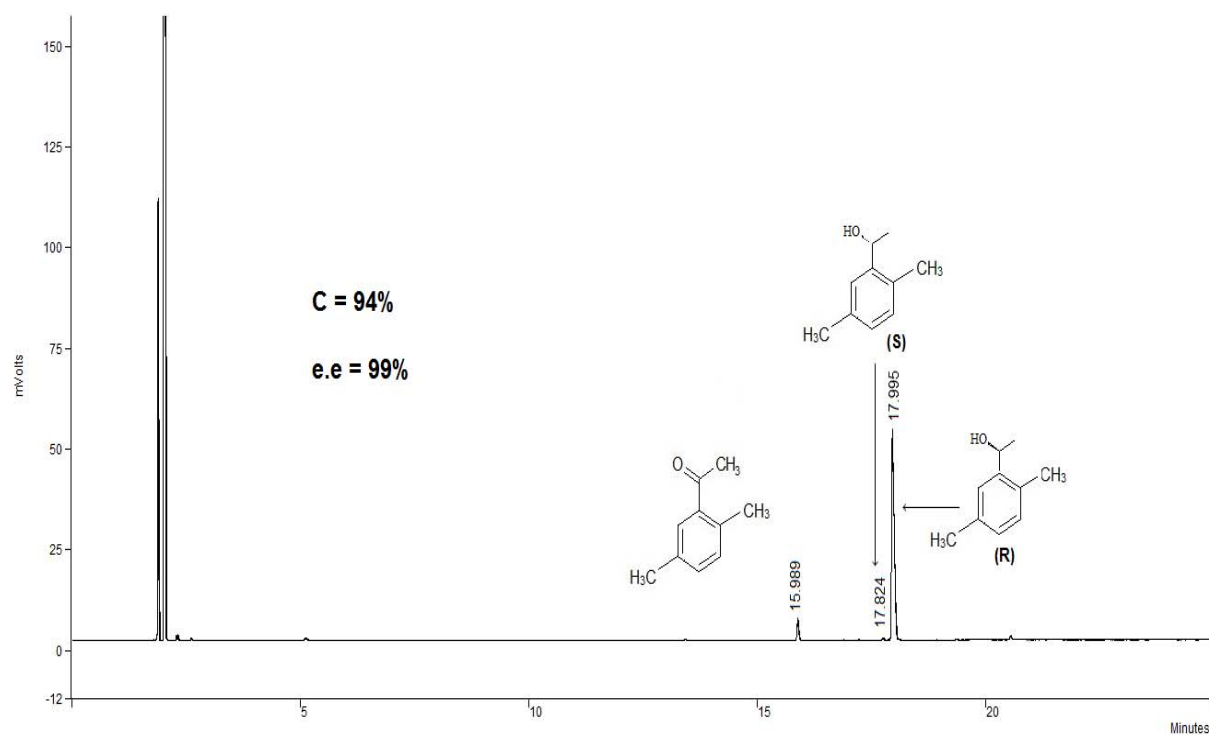
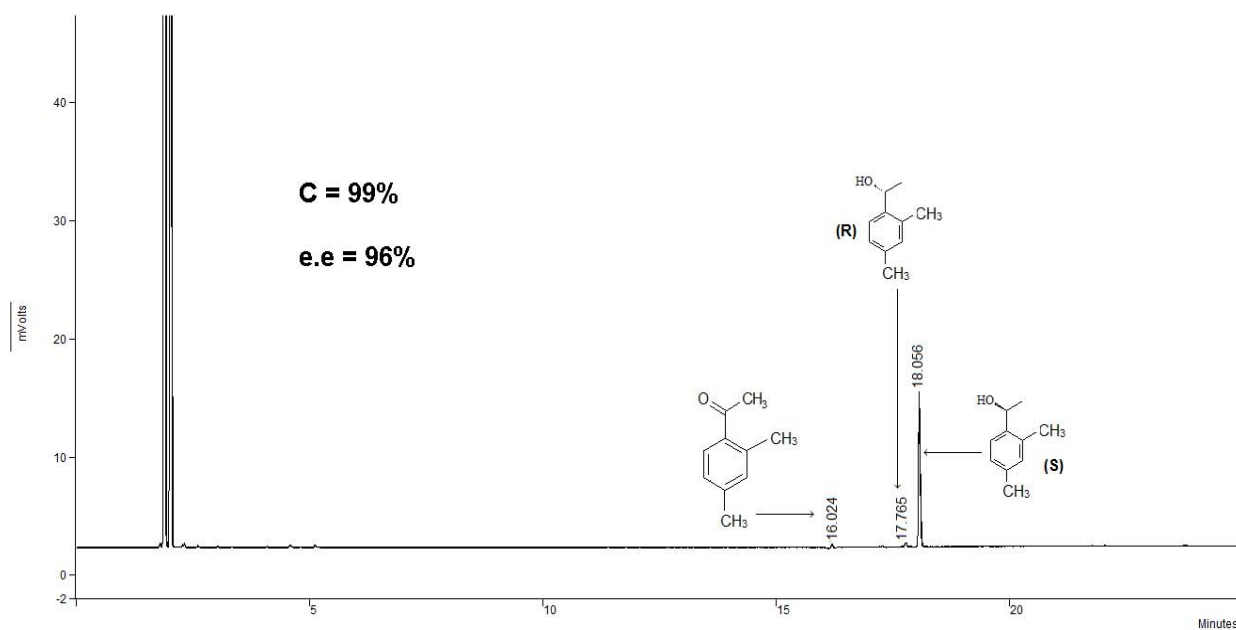
Anexo VI. Cromatogramas dos produtos da biorredução da 4-nitroacetofenona e 4-metoxiacetofenona pelo fungo *Periconia hispidula*.



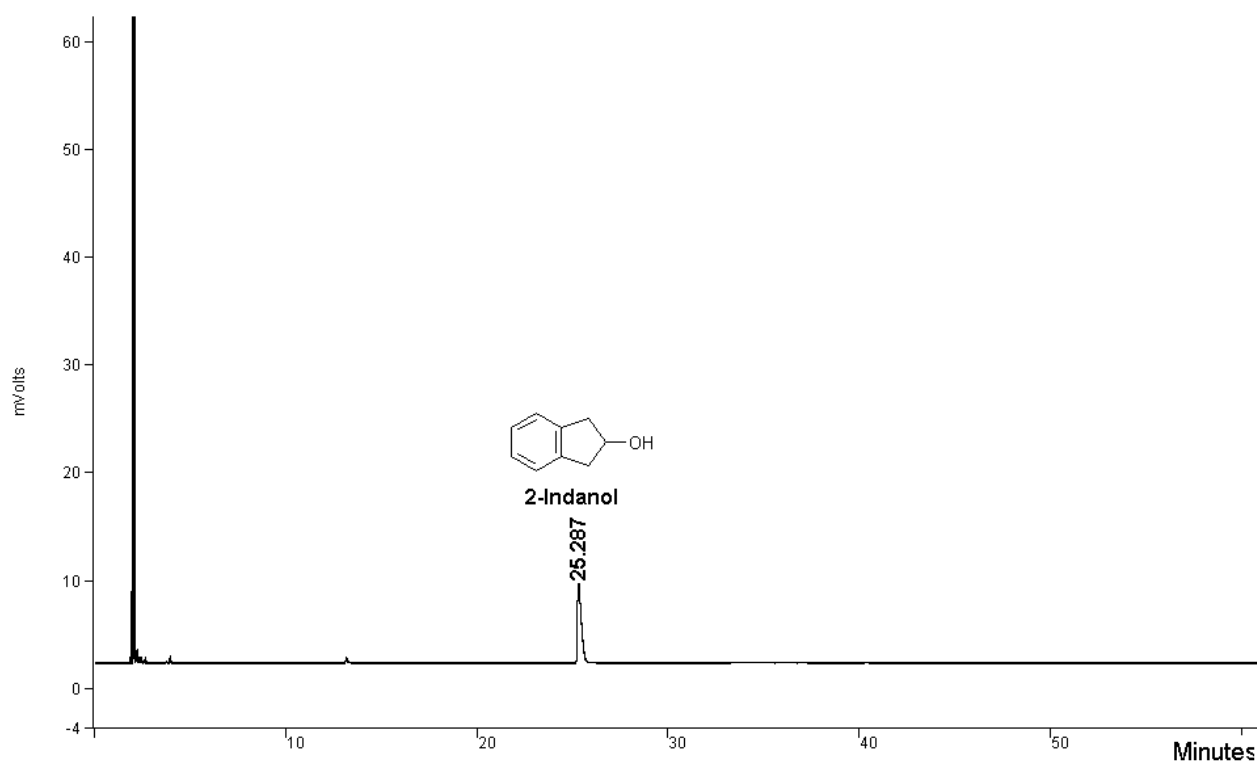
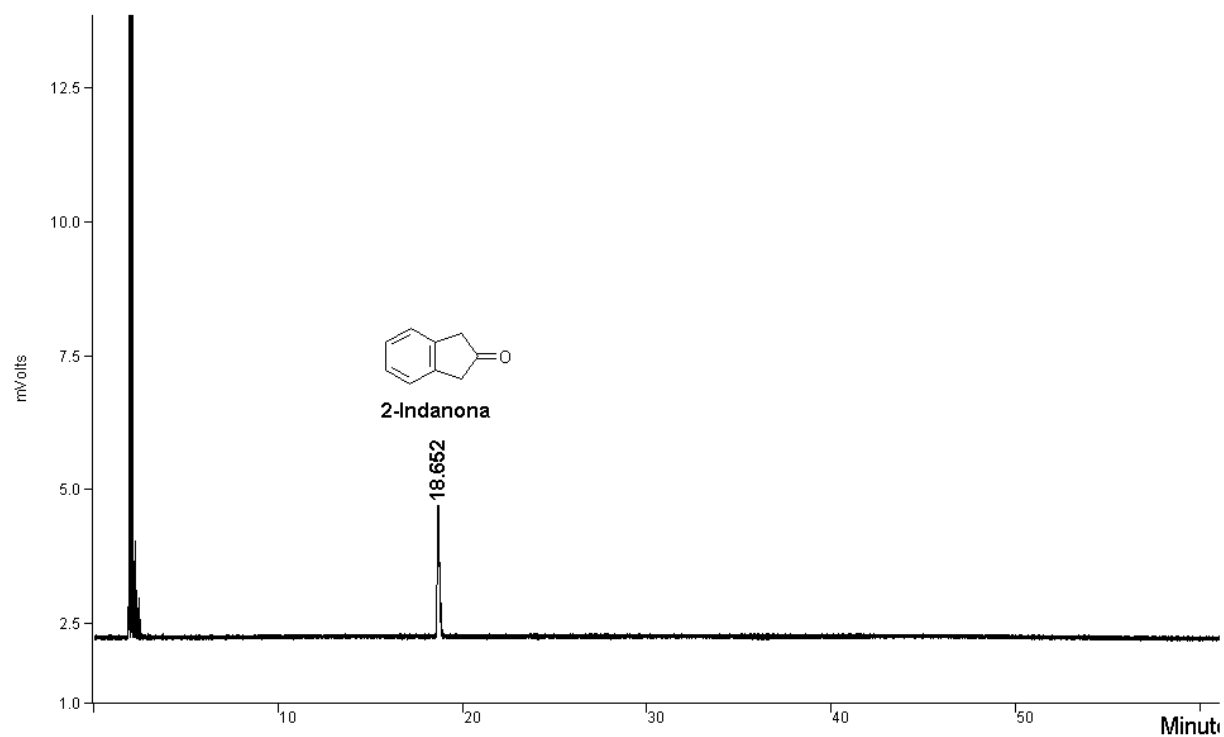
Anexo VII. Cromatogramas dos produtos da biorredução da 4-metilacetofenona e 4-etilacetofenona pelo fungo *Periconia hispidula*.



Anexo VIII. Cromatogramas dos produtos da biorredução da 4-bromoacetofenona e 4-flúoracetofenona pelo fungo *Periconia hispidula*.

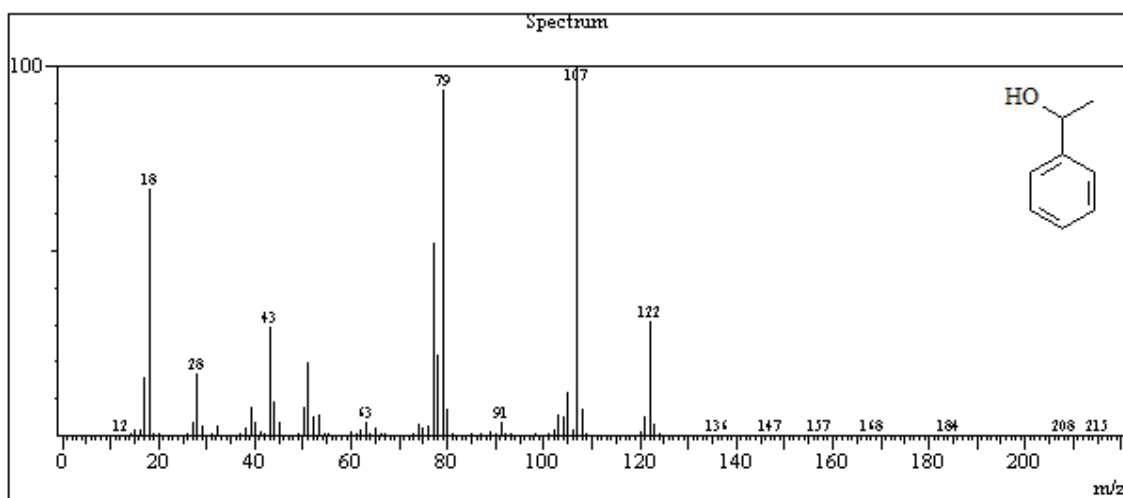


Anexo IX. Cromatogramas dos produtos da biorredução da 2,4-dimetilacetofenona e 2,5-dimetilacetofenona.

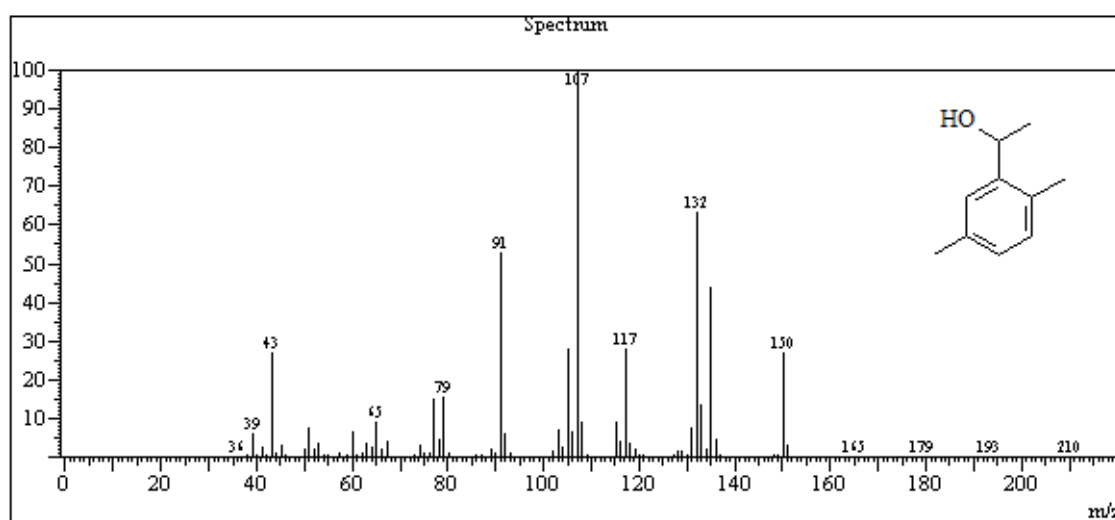


Anexo X. Cromatogramas da 2-Indanona e o 2-Indanol obtido da biorredução.

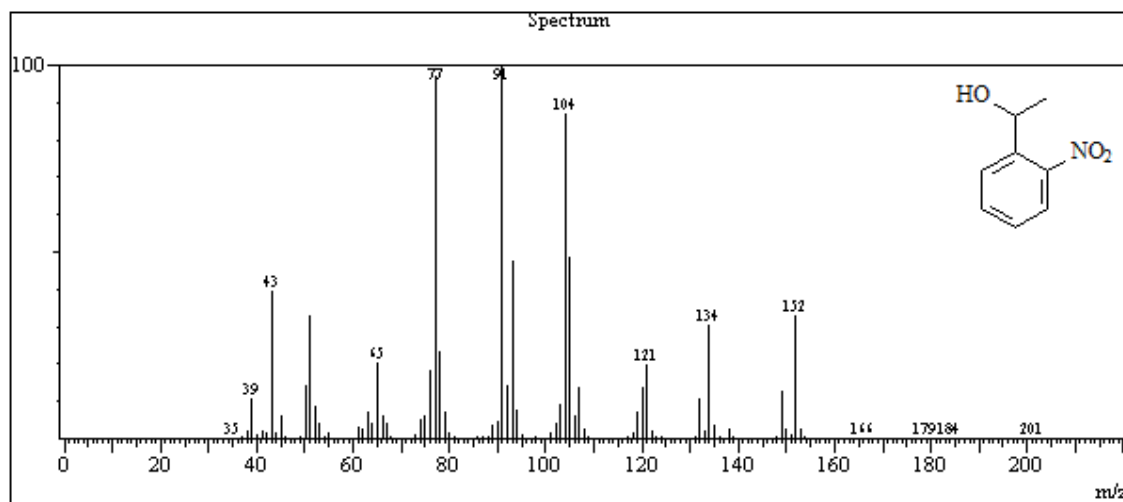
Anexo XI. Espectros de Massas dos produtos da biorredução das diferentes cetonas aromáticas pelo fungo *Periconia hispidula*.



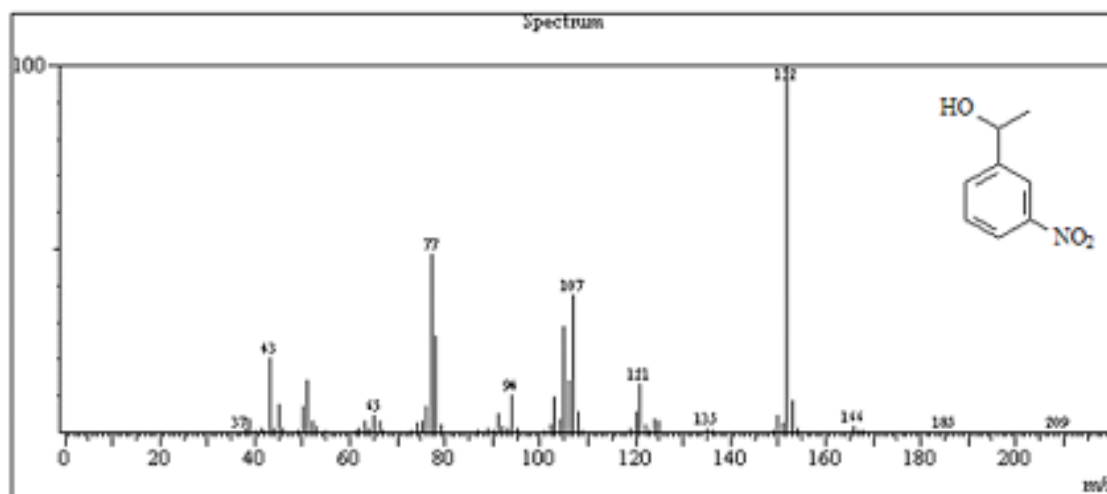
Espectro de massas do 1-feniletanol.



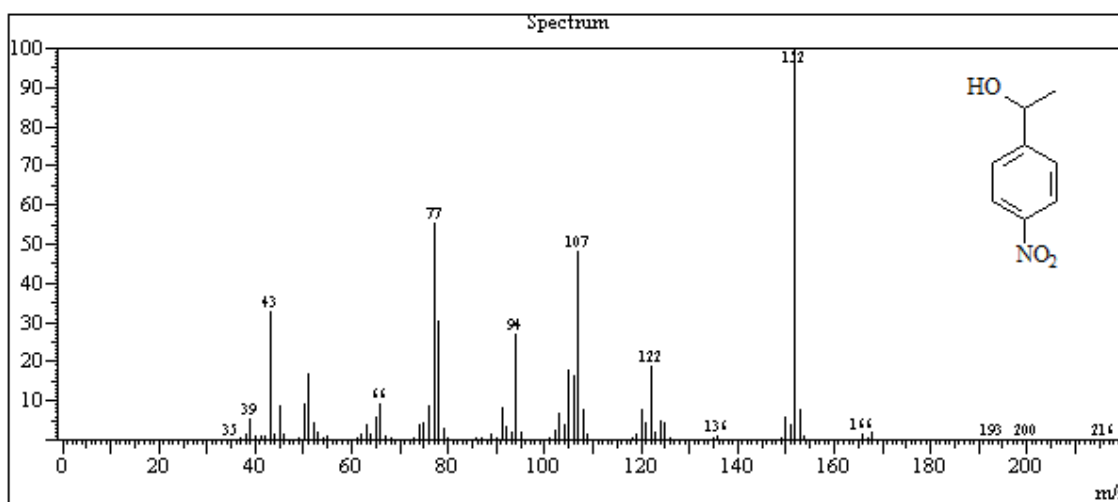
Espectro de massas do 1-(2,4-dimetilfenil)etanol.



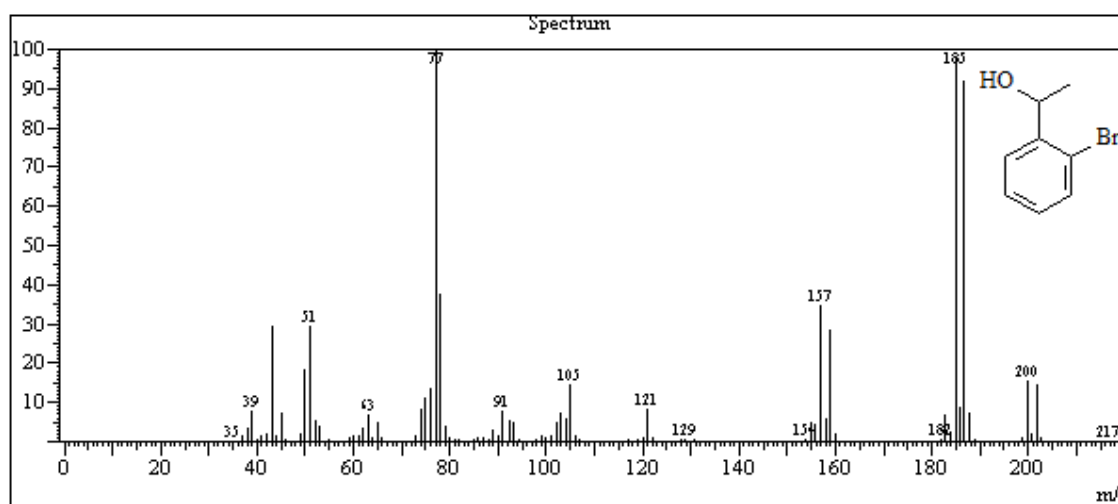
Espectro de massas do 1-(2-nitrofenil)etanol.



Espectro de massas do 1-(3-nitrofenil)etanol.

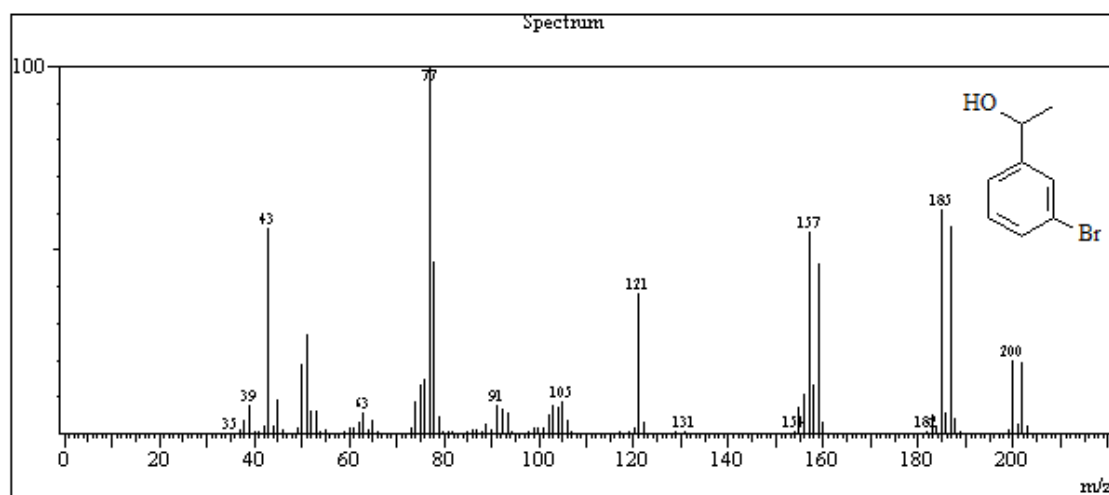


Espectro de massas do 1-(4-nitrofenil)etanol.

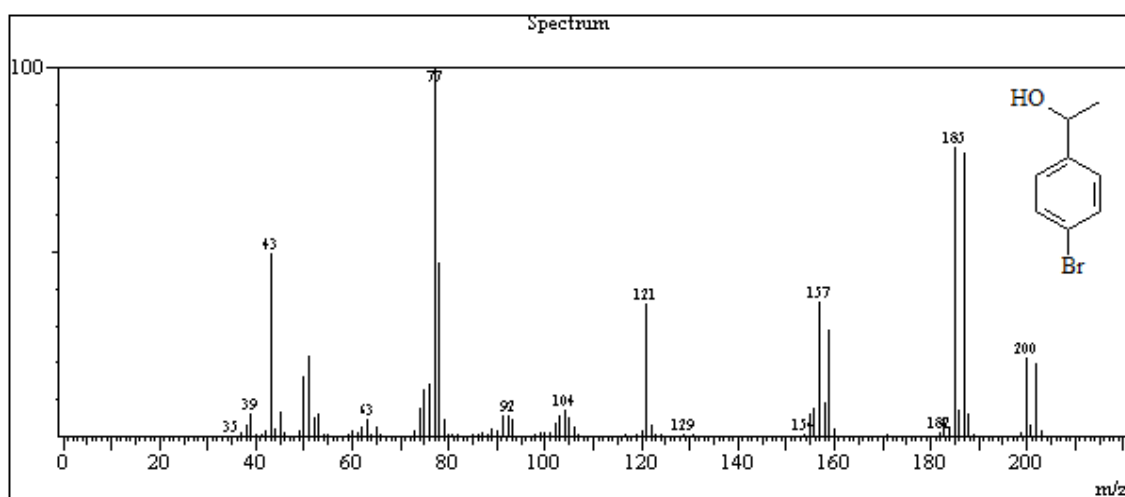


Espectro de massas do 1-(2-bromofenil)etanol.

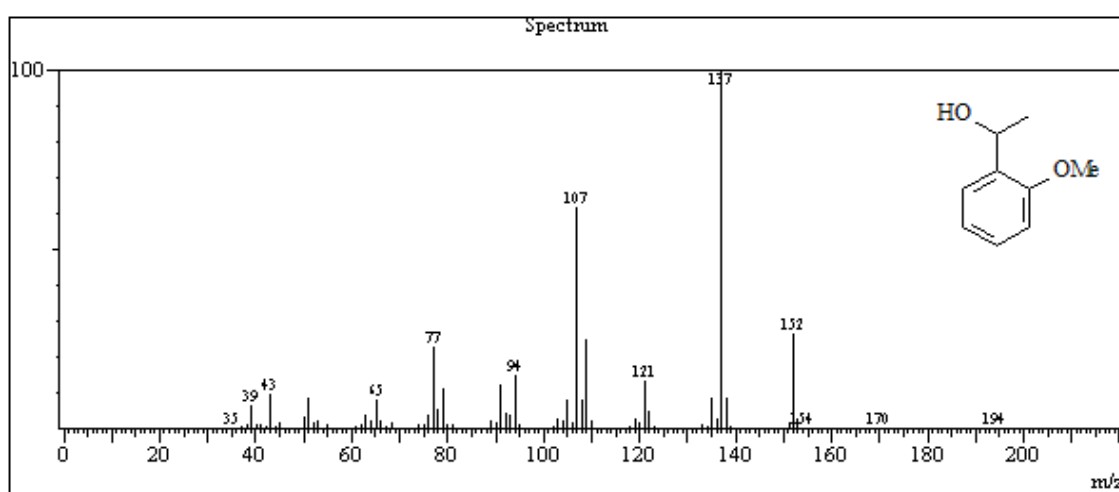




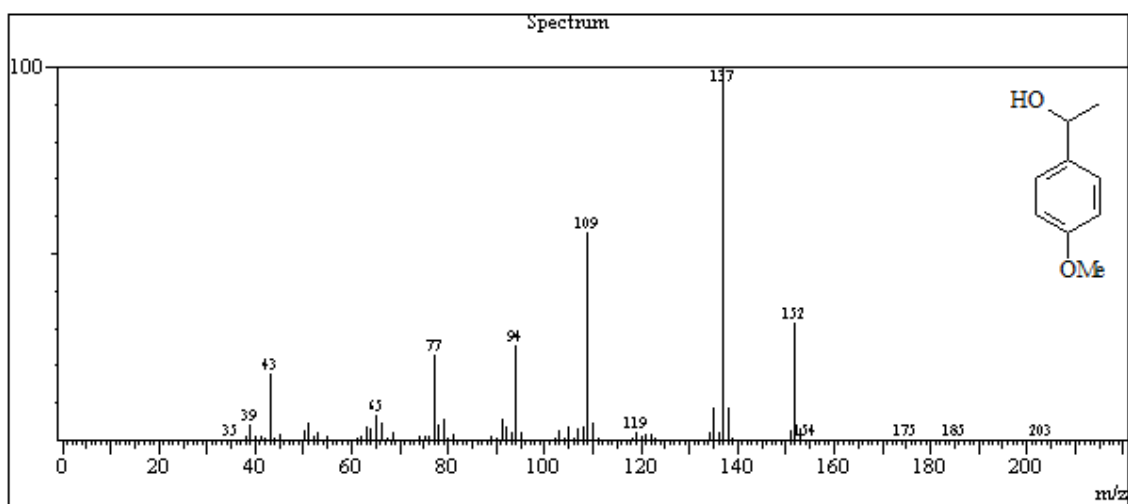
Espectro de massas do 1-(3-bromofenil)etanol.



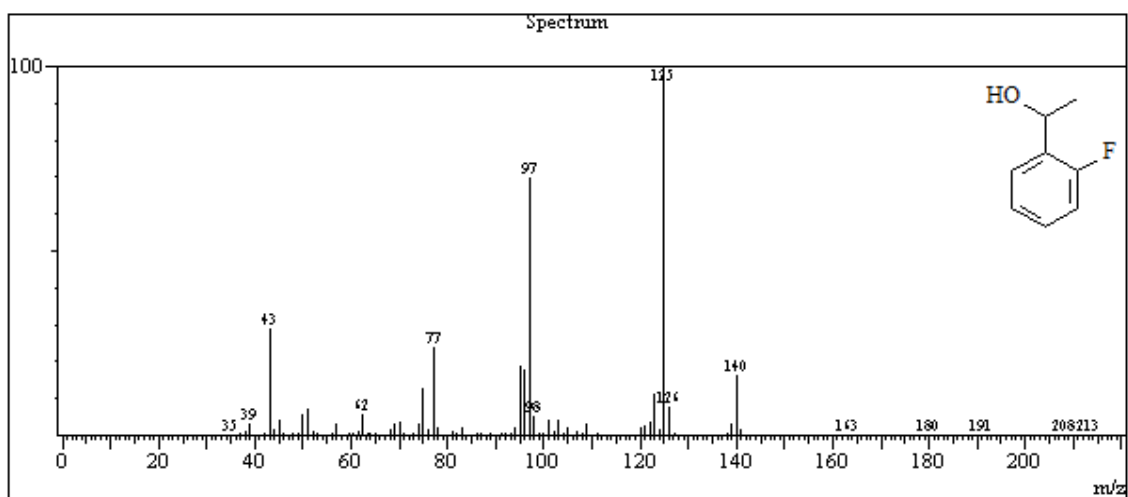
Espectro de massas do 1-(4-bromofenil)etanol.



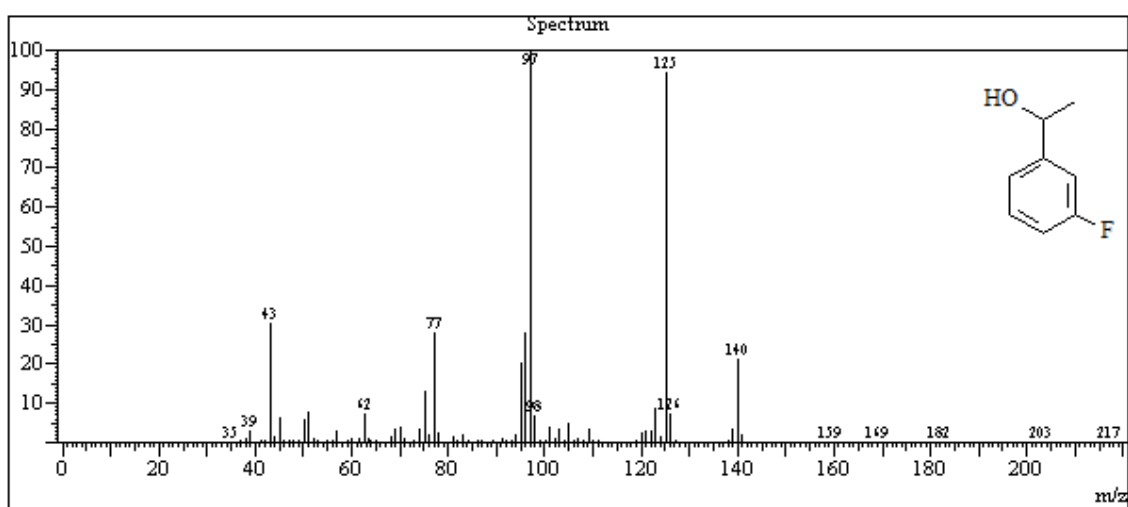
Espectro de massas do 1-(2-metoxifenil)etanol.



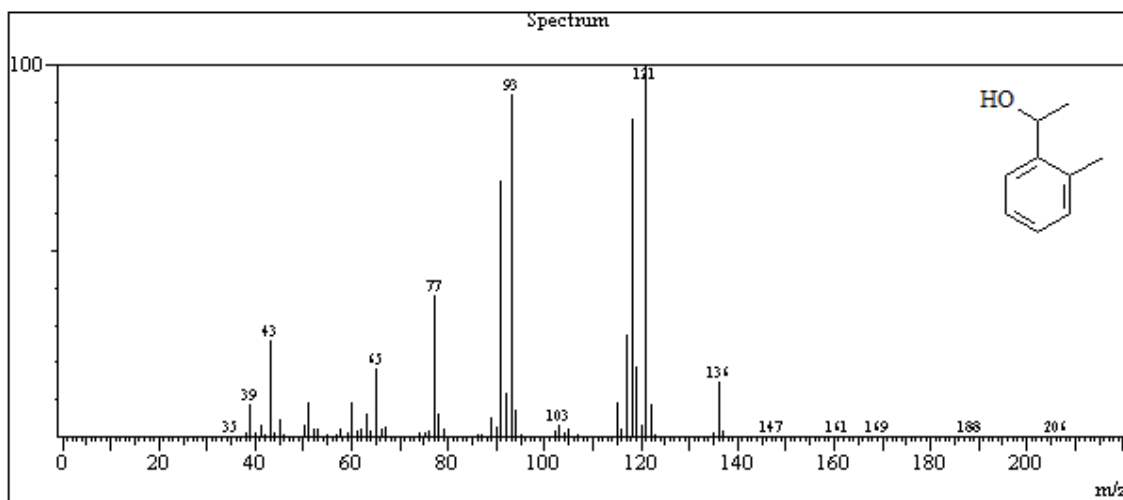
Espectro de massas do 1-(4-metoxifenil)etanol.



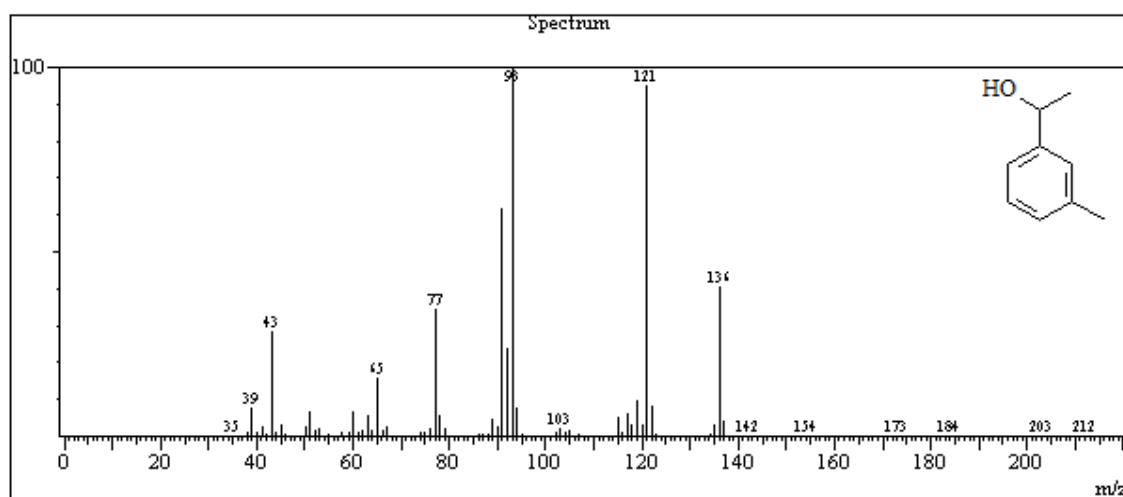
Espectro de massas do 1-(2-fluorofenil)etanol.



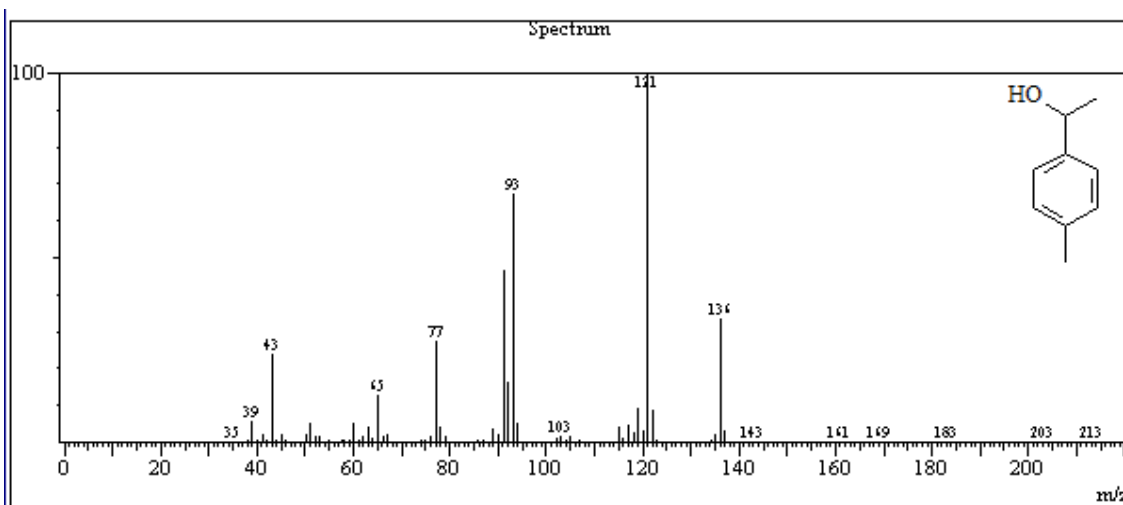
Espectro de massas do 1-(3-fluorofenil)etanol.



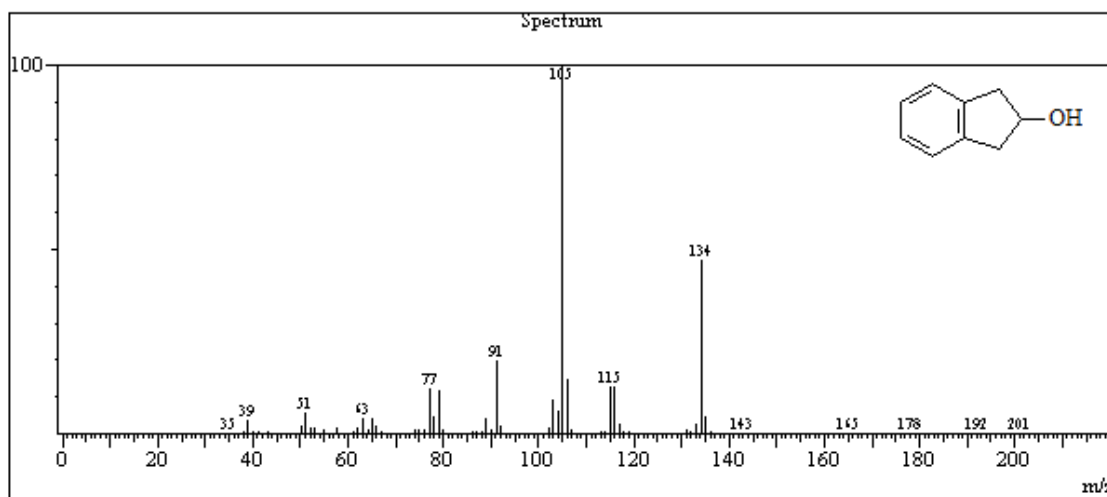
Espectro de massas do 1-(2-metilfenil)etanol.



Espectro de massas do 1-(3-metilfenil)etanol.



Espectro de massas do 1-(4-metilfenil)etanol.



Espectro de massas do 2-indanol.