



**UNIVERSIDADE ESTADUAL  
DE  
FEIRA DE SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ALEXANDRE DE FREITAS ESPELETA**

***Aspergillus terreus***

**Isolamento, Identificação e Avaliação  
da Capacidade Catalítica na Redução  
de Cetonas Pró-Quirais**

Feira de Santana, BA

2014

**ALEXANDRE DE FREITAS ESPELETA**

***Aspergillus terreus***

**Isolamento, Identificação e Avaliação  
da Capacidade Catalítica na Redução  
de Cetonas Pró-Quirais**

Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Luchese

Feira de Santana, BA

**2014**



Ao meu pai, Augusto.

Feira de Santana, setembro de 2014.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à UEFS e especialmente à área de química, pela licença pra realização deste trabalho. À orientadora deste trabalho e aos membros das bancas do exame de qualificação e de defesa de tese, pelo trabalho de leitura, pelas críticas e pelas contribuições. Meus agradecimentos também aos professores Aristóteles Goes Neto e Luis Fernando Gusmão pela atenção e esclarecimento de dúvidas relativas à microbiologia e à professora Sandra Assis, por abrir as portas do seu laboratório de pesquisa nos momentos de necessidade. Aos professores Luciano e Teresa, pelo valoroso incentivo e pela contribuição no início e na conclusão deste trabalho. Finalmente, agradeço aos colegas do LAPRON, especialmente à Serly e à Edna.

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa é o isolamento, a seleção e a avaliação de um microorganismo com atividade biocatalisadora na biorredução estereoseletiva de cetonas pro-quirais. No procedimento de investigação, fungos foram isolados de amostras de solo contaminadas com chumbo. Apenas um dos fungos isolados, identificado geneticamente como *Aspergillus terreus*, apresentou boa atividade catalítica na redução de acetofenona. A biomassa foi cultivada submersa no caldo de cultura, inoculado com  $1,1 \times 10^3$  (esporos/mL de extrato de malte) e mantido a 30° sob agitação orbital. Diferenças morfológicas e de atividade catalítica foram avaliadas em função da órbita de agitação durante o crescimento. A atividade catalítica, em termos de conversão da acetofenona e do excesso enantiomérico (S), ee\_S, no 1-feniletanol, foi determinada em conjunto com a curva de crescimento do fungo. Os resultados foram usados para construir um gráfico mostrando a variação da qualidade do catalisador em função da idade da biomassa. Além de acetofenona, foram testadas *o*-Xacetofenona, *p*-Xacetofenona e *m*-Xacetofenona (X=metil, metoxi, nitro, flúor, bromo). Para 24 horas de reação com células em crescimento (30°C; 150rpm/r = 50mm), as conversões ficaram entre 94 e 100%, com ee\_S  $\geq$  98% para acetofenona e para acetofenonas *orta* ou *meta* substituídas. Com substituintes na posição *para*, a conversão ficou entre 27% e 97%, com ee\_S entre 41% e 83%. Para reações com células em suspensão em meio tamponado (pH = 4,5 – 6,5), houve queda na atividade/seletividade em pH acima de 5,5. A cinética de conversão foi avaliada para biomassas com idades distintas e para várias concentrações de acetofenona. Uma quantidade entre 100mg e 200mg de biomassa (massa seca) com 168 horas de cultura, pode converter 100mg de acetofenona a 1(S)-feniletanol (ee\_S 91%), com 98% de rendimento em 72 horas de reação (93% em 48 horas). O desenvolvimento desse processo, acima descrito, constitui o corpo desta Tese.

**Palavras-chave:** *Aspergillus terreus*. Órbita de agitação. Catálise enzimática. Células íntegras. Desidrogenase.

## ABSTRACT

The object of this inquiry is the isolation, the selection and the potential evaluation of a microorganism with biocatalytic activity in carrying out selective-stereo biorreduction of pro-chiral ketones. In the research procedure, Fungi was isolated from soil samples contaminated with lead. Only one of the isolates fungi, identified as *Aspergillus terreus*, presented good catalytic activity in the reduction of acetophenone. The biomass was grown submerged in broth culture, inoculated with  $1,1 \times 10^3$  (spores/mL of malt extract) and maintained at 30°C under orbital agitation. Morphological differences and catalytic activity were evaluated in function of the orbit of agitation during the growth process. The catalytic activity in terms of conversion of acetophenone and enantiomeric excess (S), ee\_S, in 1-phenylethanol, was determined in conjunction with the growth curve of the fungus. The results were used to construct a graphic showing the variation of quality of the catalyst, according to age of biomass. Apart from acetophenone were tested *o*-Xacetophenone, *p*-Xacetophenone and *m*-Xacetophenone (X = methyl, methoxy, nitro, fluorine, bromine). For reaction with 24 hours growing cells (30°C; 150rpm/r = 50mm), the conversions were between 27% and 97% with ee\_S between 41% and 83%. For reactions with cells in suspension in buffered medium (pH = 4.5 – 6,5) was decrease in activity/selectivity at pH above 5.5. The kinetics of conversion was evaluated for biomasses with different ages and for various concentrations of acetophenone. An amount between 100mg and 200mg of biomass (dry mass) with 168 hours of culture can convert 100mg of acetophenone to 1(S)-phenylethanol ee\_S (91%) with 98% yield in 72 hours of reaction (93% at 48 hours). The development of this process described above, constitutes the body of this thesis.

**Keywords:** *Aspergillus terreus*. Shaker orbit. Enzymatic catalysis. Whole cells. Dehydrogenase.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

FIGURA 1	ÁRVORE FILOGENÉTICA DEMONSTRANDO AS RELAÇÕES EVOLUTIVAS ENTRE AS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DOS GENES RIBOSSOAIS DAS AMOSTRAS CPQBA 822-13 DRM 01, CPQBA 822-13 DRM 02, CPQBA 822-13 DRM 03, CPQBA 822-13 DRM 05 E DE SEQUÊNCIAS DE LINHAGENS DE MICRO-ORGANISMOS RELACIONADOS PRESENTES NAS BASES DE DADOS DO CBS E GENBANK. (FIGURA REPRODUZIDA DO RELATÓRIO DE PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS DO CPQBA).....	31
FIGURA 2	COLÔNIAS DE <i>Aspergillus terreus</i> CULTIVADAS EM ÁGAR-MALTE A 2%, BOD, 28°C. <b>A</b> E <b>B</b> : 15 DIAS, PROFUNDIDADE DA CAMADA DE MEIO $\geq$ 4 mm, FRENTE VERSO RESPECTIVAMENTE. <b>C</b> E <b>D</b> : 7 DIAS, AMBAS REPICADAS DA BORDA DA COLÔNIA <b>A</b> . AS DIFERENÇAS DE TAMANHO E APARÊNCIA FORAM DETERMINADAS PELA PROFUNDIDADE DA CAMADA DE ÁGAR-MALTE: 1 mm EM <b>C</b> ; 2 mm EM <b>D</b> .....	33
FIGURA 3	IMAGENS DE <i>Aspergillus terreus</i> TOMADAS EM MICROSCÓPIO ÓTICO. <b>A</b> : QUATRO CONIDIÓFOROS TÍPICOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO. <b>B</b> : CONIDIÓFORO COM CADEIAS DE CONÍDIOS MAIS LONGAS. <b>C</b> : CLAMIDÓSPOROS E, NO DETALHE, CONÍDIOS PROVENIENTES DE CONIDIÓFOROS. <b>D</b> : HIFA COM CLAMIDÓSPOROS, TRATADA INICIALMENTE COMO PERTENCENTE A UM CONTAMINANTE.....	33
FIGURA 4	VALORES DE CONVERSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO, DETERMINADOS APÓS A ADIÇÃO DE 80 mg DE ACETOFENONA SOBRE AS BIOMASSAS A, B E C, CRESCIDAS DURANTE 168 HORAS A 30°C E 150 RPM SOB ÓRBITA DE 12 mm.....	37
FIGURA 5	VALORES DE CONVERSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO, DETERMINADOS APÓS A ADIÇÃO DE 80 mg DE ACETOFENONA SOBRE AS BIOMASSAS A, B E C, CRESCIDAS DURANTE 168 HORAS A 30°C E 150 RPM SOB ÓRBITA DE 12 mm.....	38
FIGURA 6	VALORES DE CONVERSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO, DETERMINADOS APÓS A ADIÇÃO DE 80 mg DE ACETOFENONA SOBRE AS BIOMASSAS D, E, F, CRESCIDAS 168 HORAS A 30°C E 150 RPM (ÓRBITA 5 cm) E VALOR MÉDIO DAS CONVERSÕES ATINGIDAS PELAS BIOMASSAS A, B, C (ÓRBITA 1 cm).....	40
FIGURA 7	EXCESSO ENANTIOMÉRICO (S) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO PARA BIOMASSAS CULTIVADAS SOB AGITAÇÕES COM ÓRBITA DE 12 mm (A, B, C) E COM ÓRBITA DE 50 mm (D, E, F).....	41
FIGURA 8	BIOMASSA SECA, ENANTIOSELETIVIDADE ( $ee_S$ ) E CONVERSÃO PARA 60 MINUTOS DE REAÇÃO ( $C_{60}$ ) COM 20 mg DE ACETOFENONA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CRESCIMENTO DO <i>Aspergillus terreus</i> EM EXTRATO DE MALTE A 30°C, 150RPM/ÓRBITA 50 mm.....	43

## CAPÍTULO II

FIGURA 1	CONVERSÃO MÉDIA DE ACETOFENONA EM 1-FENILETANOL, MEDIADA POR 3 QUANTIDADES DIFERENTES DE BIOMASSA, REGISTRADAS ENTRE PARÊNTESES, NA FORMA DE BS.....	61
FIGURA 2	COMPARAÇÃO DAS BS MÉDIAS OBTIDAS APÓS 24 h DE REAÇÃO PARA DOIS TIPOS DE MEIO (ÁGUA DESTILADA E TAMPÃO pH 4,5 A 0,1 MOL/L) UTILIZANDO BIOMASSAS COM DIVERSOS TEMPOS DE CULTIVO.....	61
FIGURA 3	COMPARAÇÃO DAS BS MÉDIAS OBTIDAS APÓS 24 h DE REAÇÃO PARA DOIS TIPOS DE MEIO (ÁGUA DESTILADA E TAMPÃO pH 4,5 A 0,1 MOL/L) UTILIZANDO BIOMASSAS COM DIVERSOS TEMPOS DE CULTIVO.....	62
FIGURA 4	CONVERSÃO DE ACETOFENONA A 1-FENILETANOL, MEDIADA POR BIOMASSA COM 72 h DE CULTIVO, PARA CINCO VALORES DISTINTOS DE pH. AS MASSAS ENTRE PARÊNTESES CORRESPONDEM AOS VALORES DE BS.....	63
FIGURA 5	EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE (S)1-FENILETANOL EM FUNÇÃO DO pH , PARA TEMPO DE REAÇÃO IGUAL A 24 h, PARA BIOMASSAS COM 72 h E 96h DE CULTIVO.....	64
FIGURA 6	CONVERSÃO MÉDIA DE ACETOFENONA EM 1-FENILETANOL, MEDIADA POR BIOMASSA COM 144 h DE CULTIVO, PARA TRÊS MEIOS REACIONAIS DIFERENTES. BS REGISTRADA ENTRE PARÊNTESES.....	66
FIGURA 7	EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE (S)1-FENILETANOL PARA VÁRIOS TEMPOS DE REAÇÃO MEDIADA POR BIOMASSA COM SEIS DIAS (144 H) DE CRESCIMENTO.....	67
FIGURA 8	CONVERSÕES MÉDIAS ATINGIDAS EM 24 h DE REAÇÃO PARA DOIS TIPOS DE MEIO (ÁGUA DESTILADA E TAMPÃO pH 4,5 A 0,1 MOL/L) UTILIZANDO-SE BIOMASSAS DE <i>A. terreus</i> COM DIVERSOS TEMPOS DE CULTIVO. ENSAIOS EM TRIPLICATA, ONDE O RESULTADO MÉDIO CORRESPONDE AO CENTRO DA BARRA VERMELHA.....	67
FIGURA 9	VALORES MÉDIOS DE EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE (S)1-FENILETANOL ATINGIDOS EM 24 h DE REAÇÃO PARA DOIS TIPOS DE MEIO (ÁGUA DESTILADA E TAMPÃO pH 4,5 A 0,1 MOL/L) UTILIZANDO-SE BIOMASSAS DE <i>A. terreus</i> COM DIVERSOS TEMPOS DE CULTIVO.....	68
FIGURA 10	QUANTIDADE DE ACETOFENONA CONSUMIDA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE ADICIONADA (SISTEMA IDEAL) (a). EXCESSO ENANTIOMÉRICO EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE ADICIONADA DE ACETOFENONA (SISTEMA IDEAL) (b).....	69
FIGURA 11	MASSA DE SUBSTRATO CONSUMIDA EM FUNÇÃO DA MASSA DE ACETOFENONA ADICIONADA, PARA QUATRO TEMPOS DE REAÇÃO DE REDUÇÃO, COMPARADOS COM A SITUAÇÃO IDEAL.....	71
FIGURA 12	VARIAÇÃO DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ACETOFENONA ADICIONADA À BIOMASSA COM CINCO DIAS DE CULTIVO, PARA VÁRIOS TEMPOS DE REAÇÃO.....	73
FIGURA 13	MASSA DE ACETOFENONA CONSUMIDA EM FUNÇÃO DA MASSA ADICIONADA, PARA TRÊS TEMPOS DE REAÇÃO E PARA UMA SITUAÇÃO IDEAL(A). EXCESSO ENANTIOMÉRICO NO PRODUTO DA REDUÇÃO DE ACETOFENONA CATALISADA POR BIOMASSA CRESCIDA DURANTE 144 H(B).....	75

FIGURA 14	ACETOFENONA CONSUMIDA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE INICIALMENTE ADICIONADA, PARA CINCO TEMPOS DE REAÇÃO. A LINHA RETA CORRESPONDE À SITUAÇÃO DE CONVERSÃO IDEAL, ONDE TODO SUBSTRATO ADICIONADO É CONSUMIDO.....	76
FIGURA 15	CONVERSÃO DE ACETOFENONA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO, PARA DIVERSAS QUANTIDADES INICIAIS DE ACETOFENONA COMO SUBSTRATO.....	77
FIGURA 16.	EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE (S)1-FENIL ETANOL EM FUNÇÃO DA MASSA INICIAL DE ACETOFENONA ADICIONADA EM DIFERENTES TEMPOS DE REAÇÃO...	78
FIGURA 17.	ESQUEMA PROPOSTO POR (COMASSETO, J. V. ET AL., 2003) PARA MUDANÇA NA ESTEREOSELETIVIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO.....	82
FIGURA 18.	ESQUEMA PROPOSTO POR (ANDRADE ET AL., 2004) REPRESENTANDO A COMPETIÇÃO ENTRE MONOOXIGENASES E REDUTASES.....	84

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

TABELA 1	PLANTAS COLETADAS NO ENTORNO DAS INSTALAÇÕES DA EMPRESA PLUMBUM MINERADORA SANTO AMARO DA PURIFICAÇÃO – BA*.....	23
TABELA 2	PESOS SECOS DE BIOMASSAS FORMADAS SOB AGITAÇÃO EM ÓRBITA DE 12mm (LINHAS A, B, C) OU EM ÓRBITA DE 50mm (LINHAS D, E, F).....	39
TABELA 3	MASSA E DIÂMETRO MÉDIOS DOS PELLETS DAS BIOMASSAS D, E, F.....	39
TABELA 4	COMPARATIVO DAS BIOMASSAS DE <i>A. TERREUS</i> CRESCIDAS SOB AGITAÇÃO ORBITAL COM RAIOS DE 12 mm E DE 50 mm.....	40
TABELA 5	NÚMERO DE <i>PELLETS</i> E BIOMASSA SECA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ESPOROS NO INÓCULO.....	45
TABELA 6	VALORES DA BIOMASSA SECA (BS), CONVERSÃO DE SUBSTRATO (C) E EXCESSO ENANTIOMÉRICO (S) ( <i>ee_S</i> ) NOS ÁLCOOIS QUIRAIS RESULTANTES DA BIORREDUÇÃO PROMOVIDA POR <i>A. terreus</i> EM CRESCIMENTO EM ACETOFENONAS SUBSTITUÍDAS .....	46
TABELA 7	ATIVIDADE CATALÍTICA DA BIOMASSA DO <i>ASPERGILLUS TERREUS</i> QUANDO A ACETOFENONA É ADICIONADA ANTES DA INOCULAÇÃO.....	47

### CAPÍTULO II

TABELA 1	MASSAS DE $\text{NAH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ E $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ PARA 100 mL DE ÁGUA EM FUNÇÃO DO pH DESEJADO ( $[\text{PO}_4^{3-}] = 0,1 \text{ MOL/L}$ ).....	56
TABELA 2	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DAS ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA DA ACETOFENONA E SEUS DERIVADOS.....	59
TABELA 3	DESEMPENHO DA BIOMASSA EM FUNÇÃO DA REGIÃO ONDE SE DESENVOLVEU: EM SUSPENSÃO NO MEIO DE CULTURA (PELLETS) OU ADERIDA AO VIDRO (FITA) APÓS 24 h E 48 h DE REAÇÃO.....	70
TABELA 4	COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DO SISTEMA PARA QUATRO TEMPOS DE REAÇÃO, PARA UMA QUANTIDADE INICIAL DE 20 MG DE ACETOFENONA...	78
TABELA 5	COMPOSIÇÕES PERCENTUAIS DOS SISTEMAS EM QUE SE ADICIONOU INICIALMENTE 120 mg E 140 mg DE ACETOFENONA, DETERMINADAS COM 72 h, 96 h E 192 h DE REAÇÃO.....	79
TABELA 6	BIOMASSA SECA APÓS 192 H DE REAÇÃO.....	80
TABELA 7	RESULTADOS REFERENTES ÀS REAÇÕES DE REDUÇÃO DE ORTO, META E <i>p</i> -FLUORACETOFENONA, CATALISADAS PELA BIOMASSA DE <i>A. terreus</i> ....	81
TABELA 8.	RESULTADOS REFERENTES ÀS REAÇÕES DE REDUÇÃO DE ACETOFENONA E DE <i>p</i> -METOXIACETOFENONA, (I), <i>p</i> -METILACETOFENONA, (II), <i>p</i> -NITROACETOFENONA,(III) ACETOFENONA SUBSTITUÍDAS NA POSIÇÃO PARA, CATALISADAS PELA BIOMASSA DE <i>A. terreus</i> .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

BS: Biomassa seca ou massa seca.

*C*: Conversão

ee: Excesso enantiomérico.

ee\_R: Excesso enantiomérico da conformação *R*.

ee\_S: Excesso enantiomérico da conformação *S*.

*d* : Diâmetro da placa de Petri.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>CAPÍTULO I</b> <i>Aspergillus terreus</i> : Isolamento, Identificação e Avaliação da Capacidade Catalítica na Redução de Cetonas Pró-Quirais.....	20
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA.....	23
2.2 ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	23
2.3 CONTROLE DA ESPESSURA DA CAMADA DE ÁGAR-MALTE.....	24
2.4 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE.....	24
2.5 SUSPENSÃO DE ESPOROS E INOCULAÇÃO DE MEIO LÍQUIDO.....	25
2.6 CURVA DE CRESCIMENTO DO <i>ASPERGILLUS TERREUS</i> .....	26
2.7 REAÇÕES DE REDUÇÃO EMPREGANDO 80µL DE SUBSTRATO.....	27
2.8 REAÇÕES DE REDUÇÃO EMPREGANDO 20 µL OU 20 mg DE SUBSTRATO.....	27
2.9 REAÇÕES COM ADIÇÃO DE SUBSTRATO ANTES DA INOCULAÇÃO.....	28
2.10 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	29
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
3.1 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	30
3.2 CRESCIMENTO E PROPRIEDADES DA BIOMASSA.....	35
3.3 REDUÇÃO DE DERIVADOS DA ACETOFENONA.....	46
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	49
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	50
<b>CAPÍTULO II</b> Influência da Acidez e da Concentração de Acetofenona na Atividade Catalítica da Biomassa <i>A. terreus</i> .....	53
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	54
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
2.1 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS (TAMPÕES E ÁGUA ESTÉREIS) PARA AS REAÇÕES QUÍMICAS.....	56
2.2 PRODUÇÃO DA BIOMASSA UTILIZADA COMO BIOCATALISADOR.....	56
2.3 REAÇÕES DE REDUÇÃO DA ACETOFENONA.....	57
2.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	58
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	60

3.1 INFLUÊNCIAS DE PH E TEMPO DE CRESCIMENTO.....	60
3.2 PRODUTIVIDADE NA CONVERSÃO E TOLERÂNCIA À ACETOFENONA.....	68
3.3 REAÇÕES COM DERIVADOS DE ACETOFENONA.....	81
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS</b>	

## INTRODUÇÃO

A biotecnologia possui um papel significativo ao longo da história, tendo sua expressão definida em vários campos de aplicação industrial, desde a utilização de enzimas ou de complexos enzimáticos na produção de alimentos, como queijos e vinhos (via fermentação), chegando aos dias de hoje com seu uso na biorremediação, produção de nanopartículas e fármacos por biocatálise, entre outros (Desantis e Davis, 2006) (Reetz, 2013).

A biocatálise, em específico, está se tornando uma das ferramentas mais poderosas em biotecnologia, por ter um profundo impacto social na saúde, no abastecimento, na proteção ambiental e na produção de combustível sustentável. Esta técnica está conquistando um espaço de destaque na atualidade, nos novos cenários da Biotecnologia Branca e nos trabalhos voltados à Química Verde, sendo alimentada por avanços em vários campos, como genética, biologia molecular, tecnologia de fermentação, bioinformática, nanotecnologia, ciências dos materiais, espectroscopia avançada dentre outros (Illanes *et al.*, 2012).

Como catalisadores na técnica de biocatálise são empregadas as enzimas, isoladas ou na forma de células íntegras. No setor industrial centenas de enzimas são utilizadas, sendo a metade destas produzida por fungos, e mais de um terço por bactérias. As restantes são de origem animal (8%) ou vegetal (4%) (Sanchez e Demain, 2010). A seleção microbiana vem sendo um método simples e frequentemente usado para encontrar novos biocatalisadores com propriedades necessárias ao ramo biotecnológico (Steele *et al.*, 2009). Mais de 500 produtos comerciais são feitos utilizando-se enzimas, sendo que o mercado de enzimas industriais atingiu U\$ 1,6 bilhões em 1998, e em 2009, U\$ 5,1 bilhões, demonstrando o crescimento na área (Sanchez e Demain, 2010).

Os fungos são organismos eucarióticos quimiorganotróficos, com interações com o meio biótico e abiótico. As células fúngicas estão relacionadas a impactos significantes ambientalmente, no setor industrial e na saúde humana e animal. São responsáveis pela ciclagem de nutrientes no ambiente, podem ser simbiote, patógenos e saprófitas, sendo responsável pela mobilização de nutrientes e por modificar aspectos físico-químicos do ambiente. Os fungos também são utilizados

como micro-organismos desintoxicantes de poluentes orgânicos e como agente biorremediador de metais pesados (Walker e White, 2005). Quanto aos aspectos enzimáticos os fungos têm sido amplamente explorados como fonte importante industrialmente por muitos anos. E os principais fungos usados nesta matéria são membros dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Dentre as enzimas mais importantes produzidas (Kavanagh, 2005) temos:

**Catalase (CE 1.11.1.6)** é utilizada na esterilização a frio e tem sido isolada de *Aspergillus niger*;

**Lipase (CE 31.1.3, glicerol éster hidrolase)** é usada como um realçadora do sabor;

**Amilase (CE 3.2.1.1, a-1,4-glicano 4-gluconohidrolase)**, usada para o malte de cevada ou melhoria da qualidade do pão, foi obtida de um número de espécies de *Aspergillus*;

**Glicose oxidase (CE 1.1.3.4, b-D-glicose: O<sub>2</sub> oxidação-redutase)** é empregada em ensaios de glicose e pode ser isolada de *Penicillium notatum*.

**Celulase (EC 3.2.1.4, b-1,4-glucon gluconohidrolase)**, que degrada celulose;

**Invertase (CE 3.2.1.26, b-D-fructofuranoside fructohidrolase)**, que converte a sacarose em glicose e frutose e é usado em doces e confeitos;

**Pectinase (CE 3.2.2.15, polygalacturonide)**, que é utilizado na clarificação do mosto dos vinhos e sucos de frutas.

Inicialmente, o objetivo deste estudo era a seleção de microrganismos capazes de reduzir íons metálicos em solução, formando nanopartículas metálicas, que possuem valor comercial e tecnológico (Quester, Avalos-Borja e Castro-Longoria, 2013; Hulkoti e Taranath, 2014). Alguns fungos presentes no solo, tais como

*Aspergillus* (Jain *et al.*, 2011), possuem esse potencial. Assim, foi planejado o isolamento de micro-organismos do solo e a seleção daqueles capazes de transformar íons  $\text{Ag}^+$  em nanopartículas. Como as enzimas são proteínas naturalmente adaptadas para sintetizar ou processar metabólitos em condições fisiológicas específicas, o estudo de enzimas de micro-organismos extremófilos, como os isolados em locais com altos teores de metais, podem levar a novos biocatalisadores com características distintas, como maior tolerância a substratos orgânicos, variações de pH, entre outras (Elleuche *et al.*, 2014). Para coleta do solo, foi escolhida uma região ambientalmente impactada, onde a coleta e identificação de micro-organismos ainda não havia sido realizada. A região de Santo Amaro da Purificação na Bahia é conhecida pelo problema de contaminação por metais pesados, tais como arsênio, cádmio, bismuto e, principalmente, chumbo (Souza, 2013).

Após o isolamento dos micro-organismos, a seleção daqueles com potencial para biorredução de prata passou por uma série de dificuldades, principalmente com relação à reprodutibilidade e caracterização das partículas sintetizadas e, como precaução, os micro-organismos passaram a ser testados também quanto à atividade na redução enantiosseletiva de acetofenona, que apresentou resultados mais confiáveis, fazendo com que o projeto original fosse interrompido.

Considerando o potencial de novos biocatalisadores oriundos de regiões ambientalmente impactadas por metais, este trabalho passou a ter como objetivo isolar fungos de solo contaminado com metais para a utilização como catalisadores na biorredução de compostos carbonílicos aromáticos, visando a obtenção de álcoois enantiomericamente puros. Como objetivos específicos, espera-se:

- isolar e identificar fungos produtores de enzimas capazes de reduzir compostos carbonílicos pró-quirais a álcoois enantiomericamente puros;
- investigar a forma de utilização (células em repouso ou em crescimento) do biocatalisador selecionado na conversão e enantioseletividade de cetonas a álcoois;
- avaliar a influência de parâmetros reacionais, como estágio de crescimento do fungo, quantidade de biocatalisador e pH na conversão e enantioseletividade.

## REFERÊNCIAS

- DESANTIS, G.; DAVIS, B. G. The expanding roles of biocatalysis and biotransformation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 139-140, 2006. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136759310600038X> >.
- ELLEUCHE, S. et al. Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 29, n. 0, p. 116-123, 2014. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166914000755> >.
- HULKOTI, N. I.; TARANATH, T. C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes—A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, n. 0, p. 474-483, 2014. ISSN 0927-7765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776514002628> >.
- ILLANES, A. et al. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, n. 0, p. 48-57, 2012. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411017962> >.
- JAIN, N. et al. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: A mechanism perspective. **Nanoscale**, v. 3, n. 2, p. 635-641, 2011. ISSN 2040-3364. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C0NR00656D> >.
- KAVANAGH, K. Fungal Fermentation Systems and Products. In: (Ed.). **Fungi**: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. p.89-112. ISBN 9780470015339.
- QUESTER, K.; AVALOS-BORJA, M.; CASTRO-LONGORIA, E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. **Micron**, v. 54–55, n. 0, p. 1-27, 2013. ISSN 0968-4328. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432813001054> >. Acesso em: 2013/12//.
- REETZ, M. T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 34, p. 12480-12496, 2013.
- SANCHEZ, S.; DEMAİN, A. L. Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 224-230, 2010. ISSN 1083-6160. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/op100302x> >. Acesso em: 2014/09/09.
- SOUZA, A. F. C. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A CHUMBO E CÁDMIO EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE RIZOSFERAS DE PLANTAS COLETADAS EM SANTO AMARO (BA)**. 2013 213 (Mestrado). Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

STEELE, H. L. et al. Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 25-37, 2009. ISSN 1464-1801. Disponível em: <  
<http://www.karger.com/DOI/10.1159/000142892> >.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to Fungal Physiology. In: (Ed.). **Fungi**: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. p.1-34. ISBN 9780470015339.

# CAPÍTULO I

*Aspergillus terreus* como Biocatalisador na Redução de  
Cetonas pró-Quirais.

## 1. INTRODUÇÃO

Grande parte das substâncias presentes nos seres vivos é constituída por moléculas assimétricas. Esta assimetria limita as interações intermoleculares àquelas permitidas pelas conformações e configurações espaciais, favorecendo ou impedindo reações químicas. Sendo assim, uma atividade biológica específica e eficiente, na maior parte das vezes, é proporcionada por moléculas com configurações específicas, ou seja, dentre vários isômeros possíveis para uma substância, somente um dos enantiômeros terá as configurações necessárias para determinada resposta metabólica. Os demais isômeros podem, além de não apresentar uma resposta desejável, causar prejuízos.

Dentro deste contexto, fica clara a demanda das indústrias farmacêutica, agrícola, alimentícia, de cosméticos e de polímeros por processos que permitam a obtenção de substâncias enantiomericamente puras ou, pelo menos, enantiomericamente enriquecidas. A produção industrial destes enantiômeros, normalmente, emprega técnicas clássicas de síntese orgânica, que envolvem o uso de reagentes em quantidades estequiométricas, resultando na formação dos produtos de interesse misturados a produtos laterais (resíduos), cuja separação pode ser difícil e dispendiosa (Braga *et al.*, 2013). Rotas alternativas para tais sínteses podem ser encontradas, utilizando-se o metabolismo dos próprios seres vivos, através de suas enzimas ou complexos enzimáticos.

Enzimas são proteínas produzidas por qualquer organismo vivo, e tem a capacidade de catalisar reações químicas com altas quimiosseletividade, regioseletividade e estereosseletividade. Visto que as enzimas podem manter as seletividades no processamento de outros substratos que não os habituais, seu emprego em síntese orgânica oferece uma alternativa na obtenção de substâncias enantiomericamente puras pelo uso da catálise enzimática. A substituição das reações clássicas, quando possível, geralmente vem acompanhada de vantagens ambientais, posto que enzimas são biodegradáveis e geram menor quantidade de subprodutos em reações laterais (Faber, 2004).

Embora alguns processos biocatalíticos já tenham se estabelecido (Ishige, Honda e Shimizu, 2005), a demanda por novas enzimas, e pelo aperfeiçoamento

daquelas já descritas é crescente. A estratégia pioneira para descoberta de novas enzimas é a de isolar, cultivar e selecionar micro-organismos que apresentem atividade como biocatalisador, seja na forma de células inteiras, seja como extrato bruto (Yang e Ding, 2014). Este mesmo tipo de estratégia pode ser utilizado na exploração de enzimas produzidas em tecidos animais e vegetais. Outras estratégias surgiram com o desenvolvimento e barateamento das técnicas de sequenciamento genético, que permitiram a criação de bancos de dados sobre a sequência de bases nucleicas do DNA ou m-RNA de várias espécies. Consequentemente, informações estruturais sobre várias enzimas também ficaram armazenadas. Com o avanço da informática, a comparação destas informações e a identificação do sequenciamento de enzimas nas bases de dados tornaram-se muito mais fáceis e rápidas. Técnicas de recombinação de DNA, permitiram que enzimas endógenas e os seus respectivos cofatores fossem expressas em células bacterianas, como as da *Escherichia coli*, acelerando a expressão dos metabólitos de interesse. A evolução dos programas computacionais empregados em cálculos de energias de interações intermoleculares, aliada às técnicas de recombinação de DNA, criou uma nova estratégia para descoberta/síntese de novas enzimas, conhecida como engenharia de proteínas (Behrens *et al.*, 2011).

O processo de seleção de biocatalisadores a partir de micro-organismos e plantas foi a primeira abordagem a ser utilizada na busca de novas enzimas (BORNSCHEUER *et al.*, 2013), sendo considerada a primeira onda da biocatálise. Entretanto, esta forma de triagem ainda representa uma fonte interessante de novas enzimas, principalmente quando os organismos são oriundos de ambientes extremos, com condições como alta ou baixa temperatura, alto ou baixo pH, alta salinidade, baixo conteúdo de nutrientes, baixa atividade de água, alta radiação, alta pressão ou alto conteúdo de metais (ANGELACCIO, 2013).

Este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar fungos de uma área impactada por metais pesados e determinar seu potencial como biocatalisadores na redução de cetonas pró-quirais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA

A coleta foi realizada no município de Santo Amaro da Purificação, localizado ao sul do Recôncavo Baiano, a 73 km de Salvador (Via BA-026 e BR-324), em uma área de 518 km<sup>2</sup>, situada a 42m acima do nível do mar. No entorno das instalações da empresa Plumbum Mineradora (antiga COBRAC), cinco plantas, discriminadas na Tabela 1, tiveram o solo ao redor do seu caule escavado, com ajuda de pá e enxada e, em seguida foram arrancadas, com a maior quantidade de terra possível, colocadas em sacos plásticos de 100 L e transportadas em caixa térmica contendo água e gelo.

TABELA 1. PLANTAS COLETADAS NO ENTORNO DAS INSTALAÇÕES DA EMPRESA PLUMBUM MINERADORA SANTO AMARO DA PURIFICAÇÃO – BA\*

Nome popular	Número associado	Família	Gênero	Espécie
Embaúba	1	Moraceae	<i>Cecropia</i>	<i>pachystachya</i>
Goiabeira	2	Myrtaceae	<i>Psidium</i>	<i>guajava</i>
Gramínea	3	Gramineae		
Mamona	4	Euphorbiaceae	<i>Ricinus</i>	<i>communis</i>
Aroeira	5	Anacardiaceae	<i>Schinus</i>	<i>terebinthifolius</i>

FONTE: AUTOR

\*GPS: S12°32'16,0"; W38°43'47,2"; elevação = 24 m. Data da Coleta: 13/03/2010

### 2.2 ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS

No dia seguinte ao da coleta, as amostras foram retiradas da geladeira. Em temperatura ambiente, 10,0 g de solo foram adicionados a um sistema, previamente esterilizado em autoclave, formado por um frasco reagente (300 mL) contendo uma solução aquosa de cloreto de sódio a 0,45% (100 mL) e uma baqueta magnética. Sobre uma placa de agitação magnética, foi promovida a suspensão do solo na solução salina (Potência máxima de agitação durante 10 min.). De maneira asséptica (capela de fluxo laminar, chama e utilizando somente materiais esterilizados), transferiu-se 1 mL da suspensão (tomados em micropipeta graduada 100-1000 µL) para um tubo de ensaio (15 mL) com tampa roscada, contendo 9,00 mL de água destilada esterilizada, produzindo uma suspensão diluída a 10<sup>-1</sup>. Suspensões a 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> foram obtidas por diluições sucessivas. Cada uma das suspensões foi utilizada na inoculação (100 µL espalhados com alça de Drigalsky) de placas de Petri (Ø=13 mm), previamente preparadas com meio de cultura estéril. Foram empregados

dois tipos de meio de cultura: Extrato de malte/ágar (36 g de extrato de malte + 36 g de ágar + 900 mL de água destilada) e extrato de malte/prata/ágar (idem ao anterior, substituindo-se a água por uma solução de  $\text{AgNO}_3$  a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L). As placas foram incubadas em BOD a 28 °C. As diversas colônias que cresceram nessas placas, em até 72 h, foram inoculadas separadamente em novas placas contendo ágar/extrato de malte (não se adicionou nitrato de prata no isolamento), até que as espécies se tornassem isoladas. As colônias isoladas, após crescimento em BOD, foram recortadas com um furador de couro ( $\varnothing = 3$  mm). A preservação foi feita transferindo-se cilindros recortados para frascos de vidro (3 mL) contendo água esterilizada. Normalmente, armazenaram-se 5 cilindros em cada frasco.

### 2.3 CONTROLE DA ESPESSURA DA CAMADA DE ÁGAR-MALTE

De acordo com o diâmetro da placa de Petri, expressa em centímetros, e com a espessura desejada para a camada, também em centímetros, calculou-se o volume de meio que deveria ser vertido (Equação 01).

$$V_{meio}(mL) = h_{camada}(cm) \times \pi \times d^2(cm) \div 4 \quad (1)$$

O meio sólido foi dissolvido em água destilada quente (3,6 g de extrato de malte + 3,6 g de ágar + 90 mL de água destilada) e os volumes programados para cada placa foram, individualmente, colocados em seringas (20 mL) descartáveis de polietileno e esterilizados em autoclave (120 °C/15 minutos). Durante a esterilização, os êmbolos ficaram deslocados na posição de máximo volume e as seringas, contendo o volume programado de meio, ficaram acomodadas em um béquer grande com a agulha voltada para cima. Após o desligamento da autoclave, foi esperado o tempo necessário para que o resfriamento tornasse a pressão menor que a atmosférica. De maneira asséptica, foi feita a transferência do meio para placas de Petri esterilizadas.

### 2.4 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE

A identificação molecular (sequenciamento e filogenia) foi feita no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) em

Campinas-SP. O DNA das amostras foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985). A amplificação, pela metodologia Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizou como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) foram ITS-1 e ITS-4. Os fragmentos amplificados foram purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem). As sequências parciais da região ITS obtidas foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparada com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://www.cbs.knaw.nl>).

As sequências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL X (Thompson, Higgins e Gibson, 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o programa MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas utilizando o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas, foi feita pelo método de *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 reamostragens, utilizando-se o software de rotina incluído no MEGA 4.0.

## 2.5 SUSPENSÃO DE ESPOROS E INOCULAÇÃO DE MEIO LÍQUIDO

Uma colônia com 7 dias de crescimento teve um cilindro 3 mm de diâmetro recortado na região mediana entre o centro e a borda. O cilindro foi transferido para um frasco de vidro com tampa (18 mL) contendo 14,5 mL de glicerol a 20%(v/v). O sistema foi agitado vigorosamente (manualmente), formando uma suspensão de esporos. Imediatamente após a agitação, sugou-se a suspensão de esporos com seringa (20 mL) e agulha descartáveis. O conteúdo da seringa foi distribuído entre dois frascos (10 mL) conta-gotas feitos de polietileno e previamente esterilizados (a agulha foi introduzida no orifício do gotejador para realizar a transferência). A contagem de esporos foi feita em câmara de Neubauer. Foram utilizados na contagem os quadrantes maiores, ou seja, aqueles subdivididos em 16 quadrados com aresta de 0,25 mm cada um.

Cada inoculação foi feita dispensando-se  $1,08 \pm 0,40 \times 10^5$  esporos (640  $\mu$ L da suspensão) dentro de um frasco reagente (300 mL) contendo 100 mL de solução de

extrato de malte a 2 %. Imediatamente antes de cada inoculação, o frasco contendo a suspensão foi agitado manualmente. A inoculação foi realizada de modo asséptico (capela de fluxo laminar e chama). Os frascos reagentes contendo malte inoculado foram incubados em agitador mecânico termostatizado a 30 °C e 150 rpm. Foram utilizados neste trabalho dois tipos de agitador, um com órbita de 12 mm (Câmara Incubadora com Agitação Orbital MA420 – MARCONI) e outro com órbita de 50 mm (agitação orbital, aquecimento e refrigeração – CIENTEC).

## 2.6 CURVA DE CRESCIMENTO DO *Aspergillus terreus*

A partir de uma suspensão de esporos recém-preparada, foram inoculados 18 frascos reagentes de 300 mL, contendo 100 mL de extrato de malte a 2%. Cada frasco reagente recebeu  $1,08 \pm 0,40 \times 10^5$  esporos e foi depositado na incubadora com agitação orbital (30 °C; 150 rpm, 50 mm de órbita). Após 48 horas de crescimento, 3 frascos reagentes foram retirados da incubadora. Os conteúdos foram individualmente passados em peneira de polietileno, separando-se a biomassa. Os *pellets* foram transferidos para um béquer de 2 L, lavados com 100 mL de água e fotografados<sup>1</sup>. Em seguida, foram transferidos para a peneira, prensados contra a tela com uma espátula e colocados sobre papel toalha em estufa a 80 °C. A biomassa que cresceu aderida ao vidro recebeu o mesmo tratamento dos *pellets*, mas não foi fotografada. Após 24 h na estufa, as massas secas (*pellets* e aderida) foram pesadas em balança analítica. O procedimento foi repetido para 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 h de crescimento.

A cada uma das culturas, 60 minutos antes da biomassa ser removida para determinação do peso seco, foram adicionados 20 µL de acetofenona. Ao final dos 60 minutos, imediatamente antes da separação da biomassa em peneira, uma alíquota de caldo (4,0 mL) foi coletada em pipeta graduada e transferida para um tubo de ensaio contendo 4 mL de acetato de etila. O tubo de ensaio foi agitado para extração

---

<sup>1</sup> \* Os registros fotográficos foram feitos quando as biomassas estavam dentro do béquer. Os *pellets*, espontaneamente, formaram monocamadas no fundo, facilitando a contagem dos mesmos. As fotos foram abertas no programa Paint, do Windows, e os *pellets* contados (cada *pellet* contado foi marcado com a ferramenta lápis). Havendo interesse na medida dos diâmetros durante a contagem, deve-se colocar um pedaço de régua no fundo do béquer antes da foto. A imagem pode ser recortada e deslocada para realizar as medidas.

do produto. Após separação das fases, a fase aquosa foi removida com pipeta Pasteur e a fase orgânica foi armazenada para análise cromatográfica.

## 2.7 REAÇÕES DE REDUÇÃO EMPREGANDO 80 $\mu$ L DE SUBSTRATO

Para cada reação, empregou-se a biomassa formada em um frasco reagente (300 mL) contendo 100 mL de extrato de malte inoculado com uma gota de suspensão de esporos. Ao serem completadas 168 horas de cultura (30 °C/150 rpm, órbita de 50 mm), utilizando-se uma micropipeta (20-200  $\mu$ L), foram adicionados 80 microlitros de acetofenona diretamente sobre a biomassa em crescimento, dando início à contagem de tempo de reação. Nos tempos iguais a 1 h, 3 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h, alíquotas de 900  $\mu$ L do caldo foram transferidas, utilizando-se micropipeta (100-1000  $\mu$ L), para um frasco cilíndrico de vidro (2 mL) contendo 900  $\mu$ L de acetato de etila. Os produtos foram extraídos e a fase aquosa foi dispensada (removida com pipeta Pasteur). Após a última coleta, a biomassa foi separada em peneira e lavada em um béquer com 100 mL de água. Os *pellets* e a biomassa aderida foram separados. O excesso de água de cada um dos dois tipos de biomassa foi removido comprimindo-se, com uma espátula, a biomassa contra a trama de uma peneira de polietileno. Removido o excesso de água, o material foi colocado para secar sobre papel toalha, em uma estufa a 80 °C durante 24 h.

## 2.8 REAÇÕES DE REDUÇÃO EMPREGANDO 20 $\mu$ L OU 20 mg DE SUBSTRATO

Para cada reação, empregou-se a biomassa formada em um frasco reagente (300 mL) contendo 100 mL de extrato de malte. Ao serem completadas 168 h de cultura (30 °C/150 rpm), foi adicionado o substrato (acetofenona ou um derivado) diretamente sobre a biomassa em crescimento, dando início à contagem de tempo de reação. Substratos líquidos (20  $\mu$ L) foram adicionados empregando-se uma micropipeta, enquanto substratos sólidos foram previamente pesados (20 mg) em pequenos frascos cilíndricos (1,8 mL). Com uma pinça, segurou-se cada frasco pela boca e despejou-se o sólido sobre a biomassa. Parte do substrato pode ficar aderida ao frasco e, para calcular a massa efetivamente transferida, usou-se a pesagem por diferença.

Com 24 h de reação, os frascos reagentes foram retirados do *shaker*. Adicionaram-se 30 mL de acetato de etila e agitou-se o sistema para extração do produto. A fase líquida foi transferida para um funil de extração (utilizou-se uma peneira para separar a biomassa). Separadas as fases, 1000  $\mu\text{L}$  da fase orgânica foram reservados para análise cromatográfica. Os *pellets* foram transferidos para um béquer de 2 L e lavados com 100 mL de água. Em seguida, foram separados na peneira. O excesso de água foi removido espremendo a biomassa contra a malha da peneira, com ajuda de uma espátula. A secagem foi feita sobre papel toalha em estufa a 80 °C. A biomassa que cresceu aderida ao vidro foi tratada da mesma maneira que os *pellets*. Após 24 h de secagem, as massas (*pellets* e aderida) foram pesadas separadamente em balança analítica.

## 2.9 REAÇÕES COM ADIÇÃO DE SUBSTRATO ANTES DA INOCULAÇÃO

Procedimento análogo ao da seção 2.7 (reações de redução empregando 80  $\mu\text{L}$  de substrato), com as seguintes modificações:

- 1) O substrato foi adicionado, em quantidades variadas, antes da inoculação do meio. Nos ensaios em triplicatas foram adicionados 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$  e 80  $\mu\text{L}$  de acetofenona. Ensaios simples foram conduzidos com 50  $\mu\text{L}$ , 60  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  e 120  $\mu\text{L}$ .
- 2) A metodologia para a suspensão de esporos e a inoculação está descrita em 2.5 (suspensão de esporos e inoculação de meio líquido), mas foram ser empregados 10 cilindros no preparo da suspensão e 1200  $\mu\text{L}$  na inoculação.

## 2.10 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Os extratos em acetato de etila foram concentrados antes das análises. Para extratos derivados do emprego de 30 mL de acetato de etila, reduziu-se o volume a  $\frac{1}{4}$  do original.

Após a concentração das amostras, as análises cromatográficas (CG) foram realizadas empregando coluna quiral CYDEX-B (25 m  $\times$  0,22 m  $\times$  0,22  $\mu\text{m}$ ), usando Hélio como gás de arraste (1 mL.min<sup>-1</sup>) em um cromatógrafo Varian CP-3380 com detector de ionização de chama DIC. De cada extrato, injetaram-se 0,2  $\mu\text{L}$ . Identificados no cromatograma os três picos de interesse (substrato remanescente e

os enantiômeros derivados), a integração computadorizada das áreas correspondentes, permite calcular conversão, C, e Excesso Enantiomérico do Isômero (S), eeS (Equações 2 e 3).

$$C = \left[ \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + A_3} \right] \times 100\% \quad (2)$$

$$ee_S = \left[ \frac{A_3 - A_2}{A_2 + A_3} \right] \times 100\% \quad (3)$$

Onde:

$A_1$  = Área do pico atribuído à cetona;

$A_2$  = Área do pico atribuído ao enantiômero (R)

$A_3$  = Área do pico atribuído ao enantiômero (S)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

O processo de isolamento resultou em 58 isolados, sendo 21 provenientes da rizosfera da embaúba, 11 da aroeira, 10 da mamona, 5 da goiabeira e apenas 1 de gramínea. Inicialmente, o objetivo desta pesquisa foi selecionar fungos com atividade na biorredução de íons prata e, com essa atividade, foram selecionadas e identificadas quatro espécies: *Aspergillus carneus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrinum* e *Purpureocillium lilacinum*. Como no LAPRON-UEFS já se desenvolviam trabalhos na área de biocatálise direcionados para síntese orgânica, os fungos identificados acima foram avaliados como biocatalisadores na redução de cetonas pró quirais. O bom desempenho da linhagem de *Aspergillus terreus* isolada na biotransformação de acetofenona em (S)1-feniletanol, em união com dificuldades para o desenvolvimento do projeto original, fez que a pesquisa fosse redirecionada.

Os demais exemplares resultantes do isolamento, sem atividade na redução de prata, também foram testados. Desta seleção, três linhagens de *Aspergillus terreus* foram selecionadas, (CPQBA 822-13 DRM 02; CPQBA 822-13 DRM 03; CPQBA 822-13 DRM 05), além da linhagem de *A. terreus* utilizada neste trabalho (CPQBA 822-13 DRM 01). A identificação revelou que todos os isolados pertenciam à mesma espécie.

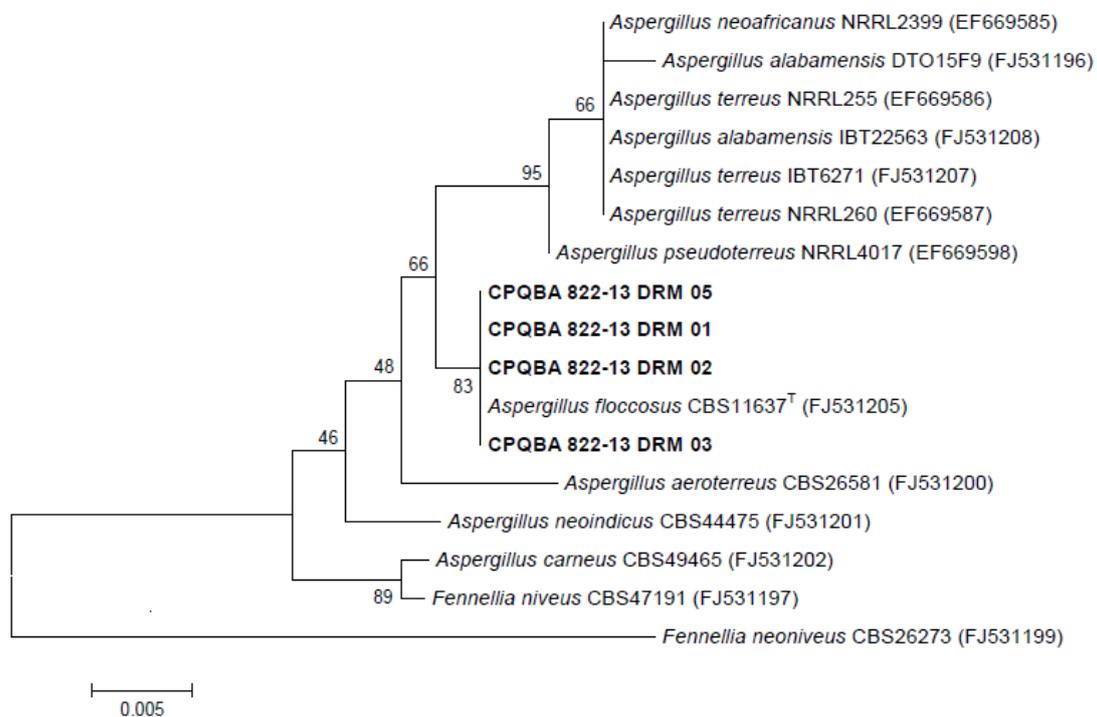
As identificações foram uma prestação de serviço do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). As relações evolutivas entre as sequências parciais dos genes ribossomais ITS 1 e ITS 2 das amostras analisadas e de sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank, resultaram numa árvore filogenética (Figura 1), que revelou que todos os isolados com atividade na biorredução de acetofenona pertencem à mesma espécie, denominada *Aspergillus terreus* (Figura 1).

Verifica-se que, na árvore filogenética, a espécie recebe o nome de *Aspergillus floccosus*. Embora exista uma proposta de criação de uma nova espécie dentro da Seção Terrei (Samson *et al.*, 2011), que seria denominada *Aspergillus floccosus*, por enquanto, este termo nada mais é que um sinônimo de *Aspergillus terreus*, como pode ser verificado na seguinte URL de um site especializado:

(<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=191719>).

Apesar de ser sinônimo de *Aspergillus terreus*, foi constatado que o termo “*Aspergillus floccosus*” proporciona baixíssimo retorno, quando utilizado como palavra chave na busca de artigos científicos na área de biocatálise e, por este motivo, deve ser evitado.

FIGURA 1. ÁRVORE FILOGENÉTICA DEMONSTRANDO AS RELAÇÕES EVOLUTIVAS ENTRE AS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DOS GENES RIBOSSOAIS DAS AMOSTRAS CPQBA 822-13 DRM 01, CPQBA 822-13 DRM 02, CPQBA 822-13 DRM 03, CPQBA 822-13 DRM 05 E DE SEQUÊNCIAS DE LINHAGENS DE MICRO-ORGANISMOS RELACIONADOS PRESENTES NAS BASES DE DADOS DO CBS E GENBANK. (FIGURA REPRODUZIDA DO RELATÓRIO DE PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS DO CPQBA).



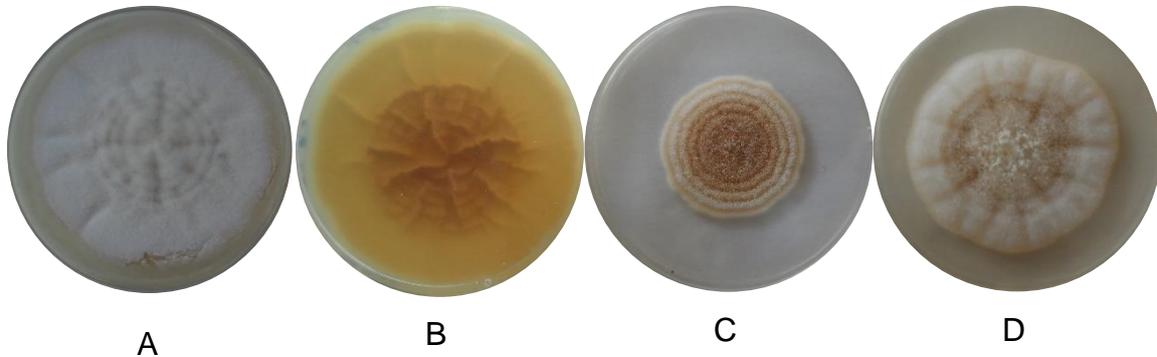
Fonte: Relatório CPQBA

Antes da identificação, as linhagens DRM 01; DRM 02; DRM 03 e DRM 05 eram tratadas como espécies diferentes, pois, apesar de possuírem comportamentos equivalentes como biocatalisadores na redução de acetofenona, apresentavam aparências distintas. A causa das diferenças foi investigada e verificou-se que, quando cultivadas em placas de Petri, a aparência e o tamanho das colônias variaram em função da espessura da camada de ágar-extrato de malte. As Figuras 2.A e 2.B mostram uma colônia de *Aspergillus terreus* com 15 dias, cultivada sobre meio com profundidade superior a 4 mm. Nesta condição, a colônia apresentou ausência de pigmentação e vincos radiais (melhor visualizados no verso da colônia - Figura 2.B) que provocam ondulações na superfície. A região perimetral da colônia apresentou

uma textura diferenciada da região central, mas cabe salientar que esta diferenciação nem sempre ocorre. A partir da borda desta colônia, foram feitas repicagens sobre camadas de ágar-extrato de malte de diferentes profundidades. Camadas com 0,5 mm, 1 mm, 1,5 mm e 2 mm, inoculadas simultaneamente, após quatro dias em BOD a 28°C, produziram colônias com, respectivamente, 10 mm, 12 mm, 14 mm e 16 mm (Figura 2.D) de diâmetro. As colônias inoculadas sobre camadas de extrato de malte com até 1 mm de profundidade, como a representada na Figura 2.C, mostraram franjas de crescimento nítidas e pigmentação marrom, que se iniciou no centro da colônia e, com o tempo, espalhou-se radialmente. Em profundidade de 1,5 mm, as franjas tornaram-se menos nítidas e já se observavam vincos. A colônia inoculada sobre camada de 2 mm de profundidade (Figura 2.D) passa a ter características híbridas entre aquelas cultivadas em camadas delgadas e em camadas espessas. A partir de 2 mm, quanto maior a quantidade de meio, maiores as chances de um crescimento análogo ao representado na Figura 2.A. Diferenças fenotípicas provocadas em consequência de variações na composição do meio de cultura são esperadas, mas não foram encontrados relatos tratando das diferenças provocadas em função da espessura do meio. Esse desconhecimento fez com que, em diversas ocasiões, a variação na aparência das colônias fosse atribuída, erroneamente, a algum tipo de contaminação. Além disso, também erroneamente, antes da identificação filogenética, alguns isolados foram tratados como espécies distintas.

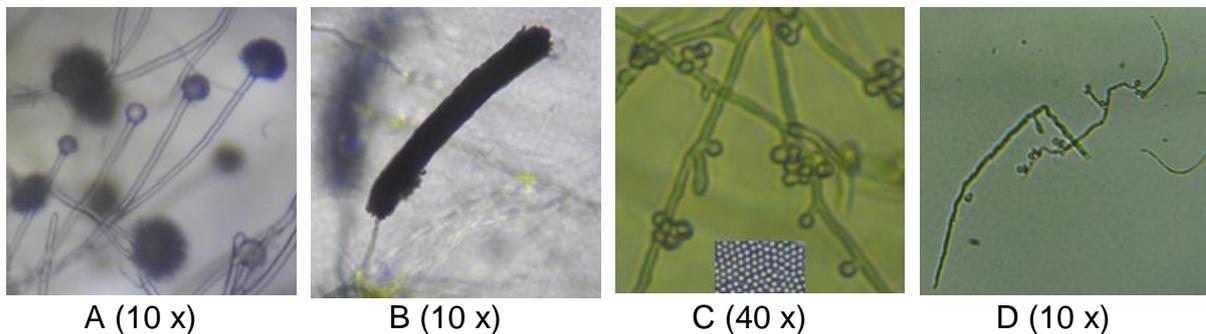
Em microscópio ótico, conidióforos típicos do gênero *Aspergillus* foram observados. A Figura 3.3.A reproduz algumas das estruturas encontradas com maior frequência e mostra, em primeiro plano, quatro conidióforos em diferentes estágios de maturação. É possível observar que as vesículas são arredondadas e suportadas por hastes longas. Embora os conidióforos mostrados na Figura 3.A representem a situação que foi observada com maior frequência, conidióforos semelhantes ao da Figura 3.B, onde a extensão das cadeias de conídios é muito maior, não foram raros. O tamanho e o formato do conidióforo variou, principalmente, em função do tempo de crescimento.

FIGURA 2. COLÔNIAS DE *Aspergillus terreus* CULTIVADAS EM ÁGAR-MALTE A 2%, BOD, 28°C. **A** E **B**: 15 DIAS, PROFUNDIDADE DA CAMADA DE MEIO  $\geq$  4 mm, FRENTE VERSO RESPECTIVAMENTE. **C** E **D**: 7 DIAS, AMBAS REPICADAS DA BORDA DA COLÔNIA **A**. AS DIFERENÇAS DE TAMANHO E APARÊNCIA FORAM DETERMINADAS PELA PROFUNDIDADE DA CAMADA DE ÁGAR-MALTE: 1 mm EM **C**; 2 mm EM **D**.



Fonte: Autor

FIGURA 3. IMAGENS DE *Aspergillus terreus* TOMADAS EM MICROSCÓPIO ÓTICO. **A**: QUATRO CONIDIÓFOROS TÍPICOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO. **B**: CONIDIÓFORO COM CADEIAS DE CONÍDIOS MAIS LONGAS. **C**: CLAMIDÓSPOROS E, NO DETALHE, CONÍDIOS PROVENIENTES DE CONIDIÓFOROS. **D**: HIFA COM CLAMIDÓSPOROS, TRATADA INICIALMENTE COMO PERTENCENTE A UM CONTAMINANTE.



Fonte: Autor

Conídios formados diretamente nas hifas (“aleuriconidia”; “Accessory conidia”) também foram observados. Eles apareceram isolados ou formando pequenos “cachos” (Deak *et al.*, 2011). Em um estudo envolvendo 100 linhagens de *A. terreus*, relata-se que os clamidósporos podem adquirir três tipos de conformação, exemplificadas em imagens de microscopia ótica (Deak *et al.*, 2009). A imagem da Figura 3.C, entretanto, não pôde ser associada diretamente a nenhuma daquelas conformações. Para a linhagem de *Aspergillus*, aqui estudada, a presença de clamidósporos foi verificada tanto em lâminas de microscopia preparadas com biomassa cultivada em meio líquido quanto em lâminas preparadas a partir de colônias cultivadas em meio sólido. De acordo com um procedimento descrito para

obtenção de uma suspensão de clamidósporos, o cultivo desta espécie submersa em meio líquido, evita a esporulação e promove a formação de clamidósporos (Lass-Flörl *et al.*, 2005).

Em lâminas de microscopia preparadas a partir de colônias cultivadas em meio sólido, a facilidade de visualizar clamidósporos foi menor, pois, normalmente, eles localizavam-se nas hifas aderidas ao ágar, que ficam escondidas atrás do micélio superficial. A presença de “aleuriconidia” ocorre frequentemente em hifas submersas em ágar (Balajee *et al.*, 2007). Os clamidósporos mostrados na Figura 3.C foram fotografados em hifas localizadas na interface entre o ágar e o ar, mas a imagem não permite constatar se as hifas encontram-se submersas. No detalhe localizado na parte inferior da mesma figura, encontra-se a imagem de conídios provenientes de conidióforos. A escala dos dois registros é a mesma, evidenciando as diferenças de tamanho. Imagens feitas em microscópios de transmissão e de varredura (Deak *et al.*, 2009), mostram essa diferença de tamanhos de forma quantitativa.

A observação da presença de clamidósporos aconteceu antes que fosse feita a identificação da espécie. Naquela ocasião, suspeitou-se de que as hifas produtoras de clamidósporos pertencessem a um contaminante. Para minimizar as dúvidas, partes do micélio contendo clamidósporos foram isoladas e inoculadas em meio sólido. Na Figura 3.D, temos a foto de um dos fragmentos que foi inoculado. As colônias originadas dessas repicagens sempre apresentaram as mesmas propriedades daquelas obtidas a partir de conídios coletados nos conidióforos, minimizando a hipótese de contaminação. Na verdade, a presença destas estruturas serviu para confirmar a identificação filogenética, pois *Aspergillus terreus* é a única espécie da seção *terrei* que apresenta este tipo de estrutura (Lass-Flörl *et al.*, 2005; Balajee *et al.*, 2007).

### 3.2 CRESCIMENTO E PROPRIEDADES DA BIOMASSA

Inicialmente, mesmo cultivando a biomassa nas mesmas condições, as respostas relativas ao crescimento e desempenho na biorredução de acetofenona oscilavam, ou seja, não havia boa reprodutibilidade. Ao lado do valor científico, a reprodutibilidade é um dos principais responsáveis pelo impacto provocado por uma

publicação na área de biocatálise (Asano, Hollmann e Stewart, 2014), ou seja, havia necessidade de identificar e eliminar a causa deste problema.

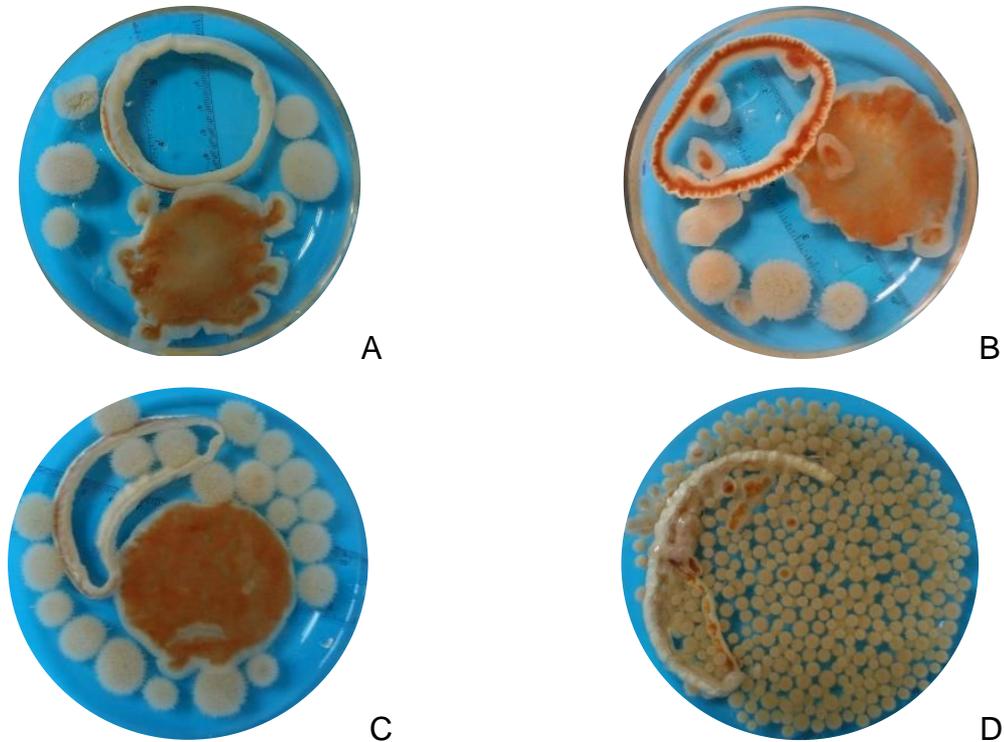
As condições de crescimento, tais como a composição do caldo, o tempo, a temperatura e a velocidade de agitação eram bem controlados e a hipótese de contaminação, como discutido, havia sido descartada. As suspensões de esporos para inóculo, entretanto, embora fossem preparadas sempre da mesma maneira, não tinham a concentração monitorada. Além disso, nem sempre se utilizava como inóculo uma suspensão recém-preparada, ignorando o efeito do tempo sobre a concentração e viabilidade dos esporos. A observação de suspensões envelhecidas mostrou que alguns esporos germinavam, formando pequenas colônias cujas hifas ficaram recobertas com esporos não germinados, não se observando esporos livres. Na literatura é comum que os artigos sobre biocatálise promovida por células inteiras não especifiquem na metodologia qual a concentração de esporos no inóculo (Keppler *et al.*, 2005), ou não mencionem como foi realizada a inoculação (Comasseto *et al.*, 2006; Andrade, L. H., Piovan, L. e Pasquini, M. N. D., 2009) ou utilizam como inóculos recortes de uma colônia cultivada em meio sólido e estocada em geladeira (Piovan *et al.*, 2008). Enquanto isso, em trabalhos envolvendo a obtenção de metabólitos excretados, a regra é expressar a concentração do inóculo, além de existirem muitos trabalhos relacionando a qualidade do inóculo, a morfologia do fungo e a produtividade (Krull *et al.*, 2010). Analisando artigos na área de fermentação, descobriu-se que a qualidade (idade, quantidade de esporos, pH) de um inóculo tem papel fundamental na morfologia da biomassa que irá se formar (Papagianni e Moo-Young, 2002). De modo geral, concentrações de inóculo acima de  $10^8$  (esporos /mL de meio de cultura) promovem o crescimento da biomassa na forma de micélio livre, enquanto concentrações inferiores promovem a formação de *pellets* (Van Suijdam, Kossen e Paul, 1980). Aumentando de  $5 \times 10^4$ /mL para  $5 \times 10^5$ /mL a concentração de esporos de *Penicillium chrysogenum* no meio de cultura inoculado, registrou-se pela primeira vez, de modo quantitativo, a transição de *pellets* para biomassa dispersa no desenvolvimento do micélio (Tucker e Thomas, 1992).

Para melhorar a reprodutibilidade, passou-se a determinar a concentração de esporos e a utilizar somente suspensões de esporos recém-preparadas. Isto resolveu parcialmente o problema da reprodutibilidade: O laboratório onde o trabalho foi

desenvolvido possui duas incubadoras orbitais de modelos diferentes e, mesmo ajustadas para a mesma temperatura (30°C) e velocidade de agitação (150 rpm), promoviam a formação de biomassas com morfologias, bem como com atividades catalíticas bastante distintas. Deste modo organizou-se um experimento onde todas as inoculações fossem realizadas a partir de uma mesma quantidade de esporos, todos provenientes de uma mesma suspensão recém preparada (exceto quando se faça alguma ressalva). A concentração dos esporos, determinada por contagem em câmara de Neubauer, foi de  $170 \pm 63$  esporos/ $\mu\text{L}$ . A contagem permitiu a observação dos esporos da solução recém preparada. Ao contrário do observado na suspensão envelhecida, os esporos se mostraram predominantemente na forma isolada, embora agrupamentos de dois a doze esporos também tenham sido observados. Além disso, dois fragmentos de hifas e uma hifa curta, contendo três clamidósporos também foram notados. A agregação de esporos em suspensão é frequentemente observada, mas as explicações do fenômeno, geralmente em termos de hidrofobicidade e de interações intermoleculares, podem ser conflitantes (Grimm *et al.*, 2004).

Na Figura 4 podem ser observadas fotografias das biomassas formadas nas duas incubadoras. Observou-se que, embora a rotação fosse a mesma nos dois agitadores, um deles apresentava menos movimentação no líquido. Notamos que a agitação promovida era significativamente diferente devido à diferença nas órbitas dos dois agitadores: Para uma mesma velocidade de rotação, quanto maior a órbita, maior a movimentação do líquido. Com órbita de 12 mm (agitação suave), a biomassa se formou, predominantemente, aderida ao vidro. A biomassa aderida formou um anel na interface do líquido com o ar, e no fundo do frasco reagente, a adesão formou um disco. Os poucos *pellets* se formaram em suspensão, tornaram-se bastante volumosos. Quando a agitação foi realizada no agitador com órbita de 50 mm (agitação turbulenta), a maior parte da biomassa cresceu na forma de *pellets*. O número de *pellets* formados foi alto e os diâmetros bem menores que dos *pellets* formados com órbita de 12 mm. O anel de biomassa também se formou, mas a aderência ao fundo do frasco reagente foi pouco frequente, com a biomassa se desenvolvendo pouco.

FIGURA 4. BIOMASSAS DE *Aspergillus terreus* CULTIVADAS DURANTE 168 HORAS A 30°C E 150 RPM: A, B E C: CULTIVADAS E TESTADAS SOB AGITAÇÃO COM ÓRBITA DE 12 mm. D: CULTIVADA E TESTADA SOB AGITAÇÃO COM ÓRBITA DE 50 mm. ALÉM DOS PELLETS, TEMOS A BIOMASSA QUE SE FORMOU ADERIDA AO VIDRO (ANEL E DISCO).



Fonte: Autor

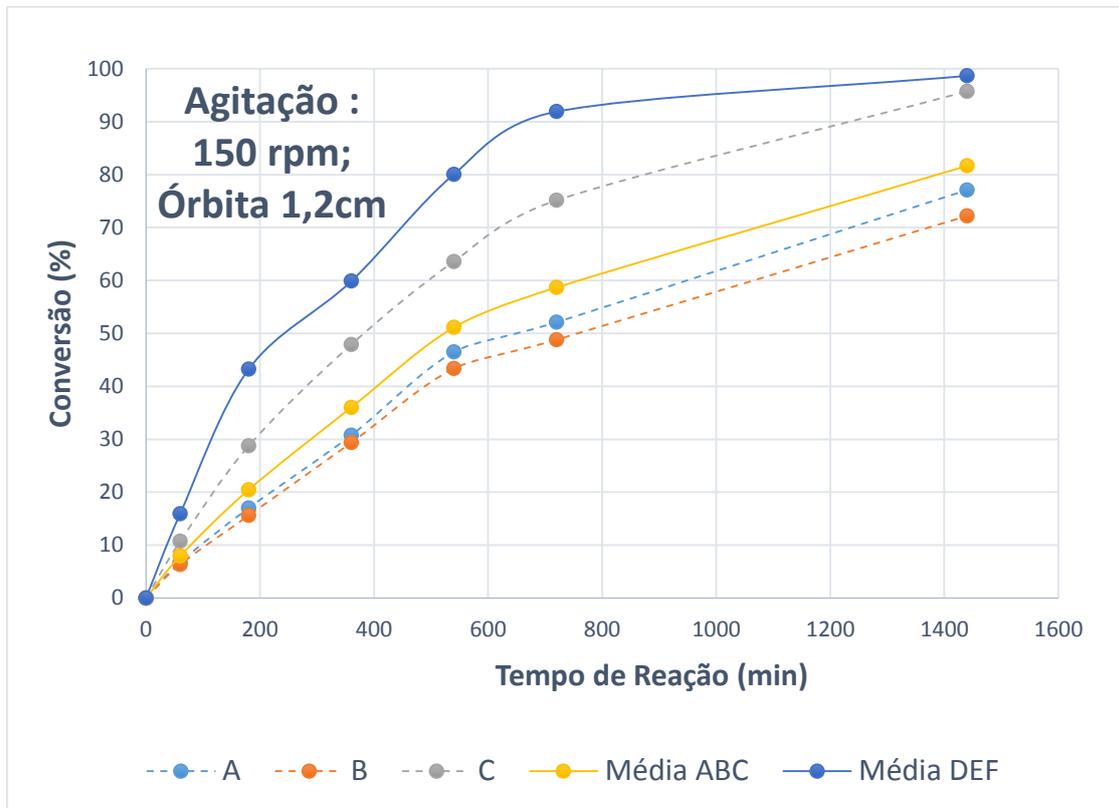
A morfologia da biomassa tem papel determinante na produtividade de um processo biotecnológico (Krull *et al.*, 2013). Quando submersa no meio de cultura, a biomassa pode crescer de forma dispersa, na forma de *clumps* ou de *pellets*. *Pellets* e *clumps* tem formatos diferentes, mas diferem na distribuição de densidade: *Pellets* possuem núcleo mais denso, enquanto *clumps* tem densidade homogênea e, com o passar do tempo, podem ou não transformar-se em *pellets* (Thomas, 1992).

Os resultados de conversão em função do tempo, determinados para as biomassas A, B e C da Figura 4, foram utilizados na construção do gráfico apresentado na Figura 5, devendo-se notar que a concentração do produto da reação, [1-feniletanol], e o valor da conversão, C, são grandezas diretamente proporcionais, de acordo com o estabelecido na Equação 04:

$$[1 - feniletanol] = C \times [acetofenona]_0 \quad (4)$$

Onde  $[acetofenona]_0$  = concentração inicial de acetofenona.

FIGURA 5. VALORES DE CONVERSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO, DETERMINADOS APÓS A ADIÇÃO DE 80 mg DE ACETOFENONA SOBRE AS BIOMASSAS A, B E C, CRESCIDAS DURANTE 168 HORAS A 30°C E 150 RPM SOB ÓRBITA DE 12 mm.



Fonte: Autor

Em consequência da relação estabelecida na Equação 4, a taxa de variação da conversão,  $\Delta C/\Delta t$ , torna-se diretamente proporcional à velocidade de reação. Observando a Figura 5, pode-se afirmar que as velocidades promovidas pelo uso das biomassas A e B são semelhantes e inferiores à velocidade promovida pela biomassa C. Também pode-se observar que, em média, a eficiência catalítica da biomassa cultivada sob agitação com 12 mm de órbita foi menor que a eficiência da biomassa cultivada sob agitação com 50 mm de órbita.

A Tabela 2 apresenta os resultados de pesos secos para culturas sob agitação suave e sob agitação turbulenta. A distribuição de massa entre *pellets* e biomassa aderida também é apresentada em termos da fração em massa,  $X_{Pellets}$ . Sob agitação suave, o peso seco médio,  $m_{Total}$ , sofreu variação insuficiente para determinar diferenças cinéticas registradas na Figura 5. É provável que a biomassa com formato de *pellets* tenha atividade catalítica maior que a biomassa aderida e, desse modo, uma maior quantidade de *pellets*, na composição, trará maior atividade.

TABELA 2. PESOS SECOS DE BIOMASSAS FORMADAS SOB AGITAÇÃO EM ÓRBITA DE 12mm (LINHAS A, B, C) OU EM ÓRBITA DE 50mm (LINHAS D, E, F).

<b>BIOMASSA</b>	<b><math>m_{Pellets}</math> (g)</b>	<b><math>m_{Aderida}</math> (g)</b>	<b><math>m_{Total}</math> (g)</b>	<b><math>X_{Pellets}</math></b>
<b>A</b>	0,0603	0,3605	0,4208	0,14
<b>B</b>	0,0776	0,3519	0,4295	0,18
<b>C</b>	0,1851	0,1202	0,4480	0,41
<b>Média de A, B e C</b>	$0,11 \pm 0,07$	$0,33 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,15$
<b>D</b>	0,4081	0,1868	0,5949	0,69
<b>E</b>	0,5225	0,1270	0,6495	0,80
<b>F</b>	0,4558	0,0859	0,5417	0,84
<b>Média de D, E e F</b>	$0,46 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,05$	$0,60 \pm 0,05$	$0,78 \pm 0,08$

FONTE: AUTOR

Obs:  $m_{Total} = (m_{Pellets} + m_{Aderida})$ ;  $X_{Pellets} = (m_{Pellets} / m_{Total})$ . Crescimento: 168 h; 30°C; 150 rpm. Secagem: 80°C; 24 horas.

Em relação à agitação órbita de 12mm, a órbita de 50mm proporcionou 33% a mais de biomassa, sendo que 78% desta apresentou a forma de *pellets*, cuja contagem, resultou numa média de  $(288 \pm 21)$ . Esse número foi obtido com uma concentração de  $1,1 \pm 0,4 \times 10^3$  esporos/mL de caldo. Na literatura, o número médio de *pellets* formados para concentração de  $6,9 \pm 0,1 \times 10^7$  foi de 600, com diâmetro médio de 3,5 mm (Bizukojc e Ledakowicz, 2010). Os *pellets* das biomassas D, E e F foram medidos e as respectivas massas médias calculadas. Os resultados na Tabela 3 mostram um desvio alto nas medidas do diâmetro médio. Esse desvio não foi determinado para a massa média, pois a secagem dos *pellets* não foi feita individualmente. De acordo com os resultados, a maior massa média corresponde aos *pellets* de maior tamanho médio, mas a razão (massa média/diâmetro médio) não foi a mesma para D, E e F, inviabilizando uma relação quantitativa simples entre massa e o tamanho médios de um *pellet*.

TABELA 3. MASSA E DIÂMETRO MÉDIOS DOS PELLETS DAS BIOMASSAS D, E, F.

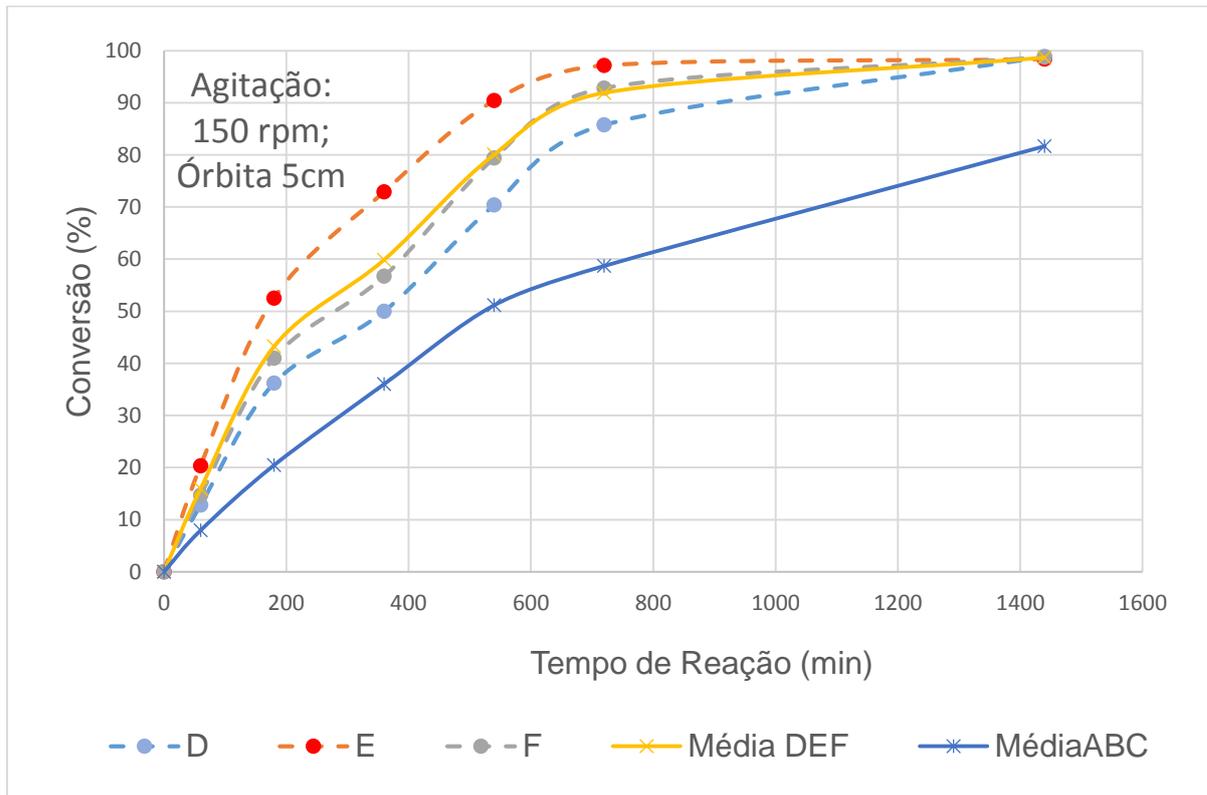
<b>Pellet da biomassa</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
<b>Massa média (<math>\mu</math>g)</b>	1417	1956	1480
<b>Diâmetro médio (mm)</b>	$(5,8 \pm 0,9)$	$(6,7 \pm 0,9)$	$(5,7 \pm 0,8)$

FONTE: AUTOR.

A atividade catalítica da biomassa formada sob agitação com órbita de 50mm também foi testada na redução de acetofenona, de modo análogo ao utilizado com a biomassa formada sob agitação suave. A Figura 6 apresenta os resultados que, avaliados em conjunto com os dados da Tabela 3, mostram uma relação direta entre

$m_{Pellets}$  e a velocidade de reação, reforçando a hipótese de que a biomassa formada em suspensão possui maior atividade.

Figura 6. VALORES DE CONVERSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO, DETERMINADOS APÓS A ADIÇÃO DE 80 mg DE ACETOFENONA SOBRE AS BIOMASSAS D, E, F, CRESCIDAS 168 HORAS A 30°C E 150 RPM (ÓRBITA 5 cm) E VALOR MÉDIO DAS CONVERSÕES ATINGIDAS PELAS BIOMASSAS A, B, C (ÓRBITA 1 cm).



Fonte: Autor.

TABELA 4. COMPARATIVO DAS BIOMASSAS DE A. TERREUS CRESCIDAS SOB AGITAÇÃO ORBITAL COM RAIOS DE 12 mm E DE 50 mm.

Agitação: órbita 12 mm/ 150 rpm			Agitação: órbita de 50 mm/ 150 rpm		
Biomassa	C_180"	C_180"/m	Biomassa	C_180"	C_180"/m
A	0,17	0,40	D	0,36	0,61
B	0,16	0,36	E	0,53	0,81
C	0,29	0,64	F	0,41	0,74
Média	0,20 ± 0,07	0,47 ± 0,15	Média	0,43 ± 0,08	0,72 ± 0,10

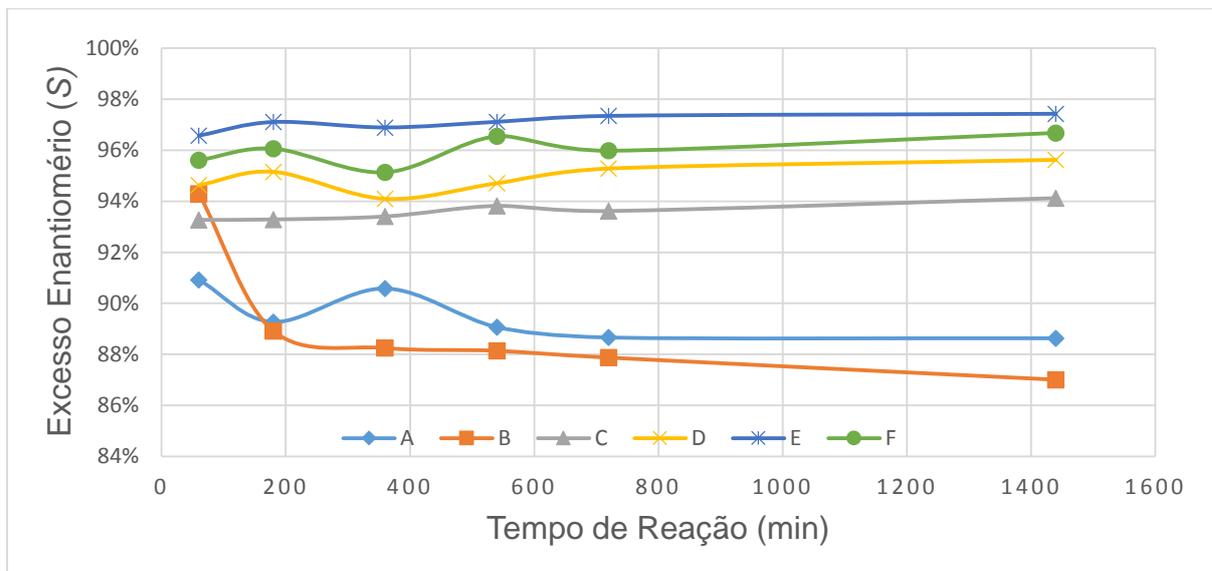
FONTE: AUTOR.

**OBS:** C\_180': CONVERSÃO AOS 180 MINUTOS DE REAÇÃO COM 80 mg DE ACETOFENONA (FIGURAS 5 E 6); m = PESO SECO TOTAL (TABELA 2).

De acordo com os resultados registrados na Tabela 4, tem-se uma maior conversão quando o processo é conduzido sob agitação turbulenta. Os valores de

conversão ponderados pelo peso seco ( $C_{180'}/m$ ) mostram que, mesmo neutralizando a contribuição da massa, as diferenças continuam, exceto para a biomassa C. Neste caso, a conversão ponderada se aproxima dos valores atingidos na agitação turbulenta. Ou seja, se a conversão proporcionada pela biomassa C foi mais baixa, a menor quantidade de biomassa formada foi o fator que mais contribuiu.

FIGURA 7. EXCESSO ENANTIOMÉRICO (S) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO PARA BIOMASSAS CULTIVADAS SOB AGITAÇÕES COM ÓRBITA DE 12 mm (A, B, C) E COM ÓRBITA DE 50 mm (D, E, F).



Fonte: Autor

A enantiosseletividade é outro fator importante na caracterização da eficiência catalítica. Expressa na forma de excesso enantiomérico de (S) 1-feniletanol,  $ee_S$ , teve os valores determinados em função do tempo, nas mesmas reações usadas na determinação dos dados de conversão. Os resultados, apresentados graficamente na Figura 7, mostram que, quando a biomassa é composta predominantemente por *pellets*, o excesso enantiomérico determinado aos 60 minutos de reação mantém-se praticamente inalterado até o final. O valor médio de  $ee_S$  para as biomassas D, E e F foi  $(96 \pm 1\%)$ . Quando o componente majoritário é a biomassa aderida ao vidro, além de mais baixo,  $ee_S$  tende a diminuir com o tempo. Neste caso, a maior variação aconteceu entre 60 minutos e 180 minutos.

A análise dos resultados apresentados nas Figuras 5 e 6 mostra que, em todos os ensaios, a biomassa que apresentou maior valor de  $C_{60'}$  (conversão determinada com 60 minutos de reação), continuou à frente das demais até o final do processo. Já a análise dos resultados da Figura 7 mostra que, para biomassa formada sob agitação

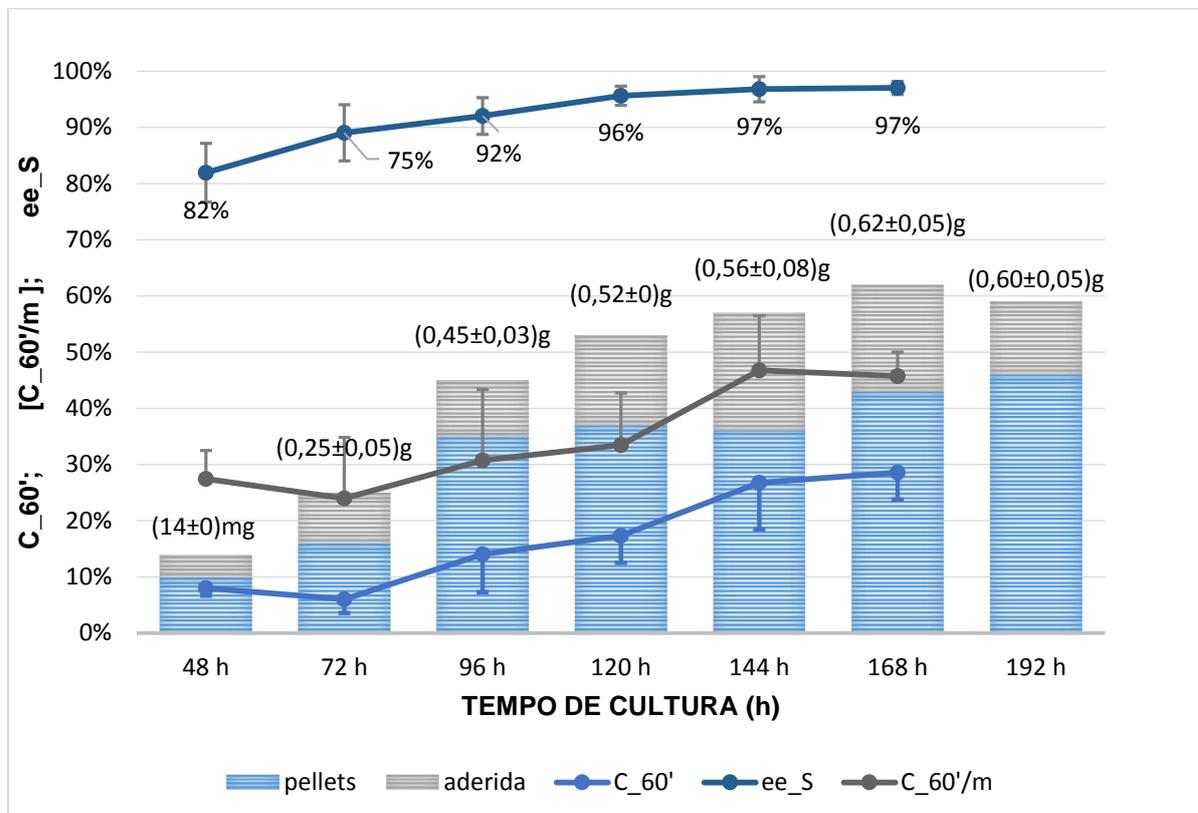
turbulenta, o excesso enantiomérico no produto formado com 60 minutos de reação se mantém no decorrer do tempo. Dessas observações surgiu a ideia de, durante a construção da curva de crescimento da biomassa, avaliar também a eficiência catalítica. Considerou-se para isso que, a adição de uma quantidade pequena de substrato, 20 mg, nos últimos 60 minutos de crescimento da biomassa, não vai gerar um resultado, em termos de biomassa seca, significativamente diferente daquele que seria obtido sem essa adição. Paralelamente, a análise do produto formado irá enriquecer a curva de crescimento, atribuindo valores de enantiosseletividade e de atividade catalítica para cada tempo de crescimento.

Para a construção da curva de crescimento, foi escolhido o *shaker* com órbita de 50mm e o emprego 640 µL da suspensão de esporos em cada inoculação. A partir do momento da inoculação do caldo de cultura, tendo sido fixadas as condições de incubação (meio de cultura, temperatura, velocidade da agitação e quantidade de inóculo), o crescimento da biomassa de *Aspergillus terreus* tornou-se função apenas do tempo. Além do peso seco, as propriedades catalíticas modificaram-se durante o crescimento. Para avaliar algumas dessas mudanças, a cada 24 horas, a partir das 48 horas de incubação, foram determinadas, em triplicata:

- A conversão atingida com 60 minutos de reação, partindo-se de 20 mg de substrato, C\_60'.
- O excesso enantiomérico de (S)-1-feniletanol no produto da reação, ee\_S.
- A quantidade de biomassa, expressa em termos de massa seca, m.

De um modo geral, estas três variáveis aumentaram de valor continuamente e, a partir de 144 horas, estabilizam-se. A Figura 8 permitiu que os resultados sejam visualizados simultaneamente. A quantidade de biomassa, quantificada como massa seca, aparece representada pelo gráfico de barras. Como a biomassa é composta de *pellets* e também de biomassa aderida ao vidro, cada barra foi dividida por uma linha horizontal, que mostra as proporções entre as duas formas de biomassa para cada tempo de crescimento.

FIGURA 8. BIOMASSA SECA, ENANTIOSELETIVIDADE ( $ee_S$ ) E CONVERSÃO PARA 60 MINUTOS DE REAÇÃO ( $C_{60'}$ ) COM 20 mg DE ACETOFENONA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CRESCIMENTO DO *Aspergillus terreus* EM EXTRATO DE MALTE A 30°C, 150RPM/ÓRBITA 50 mm.



FONTE: AUTOR.

OBS: As barras de erros representam o desvio padrão da medida. Para evitar sobreposição, em pontos são apresentados somente os desvios positivos ou negativos.

Na média geral,  $71 \pm 6$  % da massa seca foi proveniente dos pellets. O número médio de pellets, resultante de 24 contagens, foi de  $262 \pm 70$ . As maiores taxas de variação de peso seco ocorreram entre 48h e 96h. Depois, o crescimento tornou-se lento. A partir de 144h, a variação na biomassa não foi significativa, ou seja, a biomassa entrou em crescimento estacionário, mantendo-se em aproximadamente 0,60 g. Bizukojc e Ledakowicz (2010) estudaram a evolução da morfologia e da fisiologia de uma cepa de *Aspergillus terreus* associada à formação de metabólitos secundários e apresentaram as curvas de crescimento do fungo para meios inoculados com quatro diferentes concentrações de esporos. Da mesma forma que na Figura 8, apresentam um crescimento inicialmente linear, passando por uma redução de velocidade e se estabilizando a partir de 120 h. Ao contrário de  $C_{60'}$ , o excesso enantiomérico,  $ee_S$ , é uma propriedade intensiva. Sua variação é proporcional à quantidade de biomassa, ou seja, as maiores taxas de variação

aconteceram até 96 horas. Após esse período, ocorre uma desaceleração e estabilização em 144 horas.

De acordo com a Figura 8, para que haja bom desempenho de *Aspergillus terreus*, as condições de crescimento devem favorecer a formação de *pellets* e o tempo de crescimento deve estar em torno de 168 horas. Durante o crescimento, o fator determinante do número de *pellets* é a nucleação das colônias, que ocorre nas primeiras 24 horas. Quanto maior o número de nucleações aderidas ao vidro, menor será a probabilidade de surgirem núcleos de *pellets*. As primeiras hifas que surgem em solução também podem se emaranhar ou envolver esporos que ainda não germinaram, formando um único *pellet*. Esses fatores são de difícil controle, principalmente o segundo deles. Essa falta de controle possibilita uma grande amplitude no número de nucleações. Embora, em uma média de 24 contagens, o número de *pellets* tenha sido ( $262 \pm 70$ ), houve contagens com valores muito acima (ex.: 526; 419) e muito abaixo da média (ex: 118; 152). Possivelmente, o uso de uma agitação mais vigorosa, no início do crescimento da biomassa, diminuirá a adesão ao vidro, aumentando o número de *pellets*. Comprovadamente, uma agitação menos vigorosa tem como consequência um aumento drástico da biomassa aderida ao vidro.

A quantidade de esporos no inóculo também pode influenciar o número de *pellets* produzidos. Para investigar esse efeito, variou-se a quantidade de inóculo, de acordo com o estabelecido na Tabela 5. Na mesma tabela, encontram-se as respostas obtidas para o número de *pellets*, massa seca e massa seca média de cada *pellet*. O aumento de *pellets* em função do aumento do inóculo, entretanto, não foi linear. Por exemplo, quando a quantidade de esporos foi multiplicada por 16, o número de *pellets* cresceu significativamente, mas não chegou a duplicar. Embora não tenha sido quantificado, o crescimento da biomassa foi visivelmente mais rápido a partir da adição de  $4,3 \times 10^5$  de esporos. Entretanto, como as respostas foram determinadas após sete dias, a limitação de nutrientes no meio fez a massa total tender a um valor comum, próximo a 0,62 g. A elevação do número de *pellets*, sem um aumento correspondente na biomassa, resulta na diminuição da massa média dos *pellets* e, conseqüentemente, do tamanho médio dos mesmos. Quando se empregou  $1,7 \times 10^7$  esporos na inoculação, a massa seca foi 0,72 g, ou seja, aparentemente maior que a

média. Entretanto, se considerarmos desvios da ordem de 0,05 g, é possível que a diferença não seja significativa.

Estudos com *Aspergillus terreus* mostram que o aumento no número de *pellets* quando se varia a concentração de esporos dentro de uma faixa de concentração entre  $10^6$  e  $10^9$  esporos/mL, produziu uma variação no número de *pellets* entre 600 e 10000, para 100 L de cultura. O aumento do número de *pellets* é acompanhado de um pequeno aumento na biomassa total (Bizukojc e Ledakowicz, 2010).

TABELA 5. NÚMERO DE *PELLETS* E BIOMASSA SECA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ESPOROS NO INÓCULO.

<b>Quantidade de esporos (x105)</b>	<b>1,08</b>	<b>2,16</b>	<b>4,32</b>	<b>8,64</b>	<b>17</b>
<b>Número de pellets: N</b>	278 ± 54	274	387	380	492
<b>Massa seca em gramas: m</b>	0,62 ± 0,05	0,62	0,62	0,56	0,72
<b>Massa de um pellet (mg): m/N x 1000</b>	1,5 ± 0,2	1,6	1,5	1,4	1,1

FONTE: AUTOR

O valor de ee<sub>S</sub> foi determinado como 98±0% com 20 mg de acetofenona, 97±1% com 80 mg de acetofenona e 94±0% com 120 mg de acetofenona. O aumento na concentração de substrato tornou a reação mais rápida e menos estereosseletiva. A queda na enantiosseletividade acentuou-se quando a quantidade adicionada de substrato ultrapassou 80 mg.

### 3.3 REDUÇÃO DE DERIVADOS DA ACETOFENONA

A biomassa também foi testada na redução de derivados da acetofenona, formados pela substituição de um dos átomos de hidrogênio do anel aromático. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para 24 horas de reação. Após 24 horas de reação, tanto as cetonas com substituinte na posição 2, quanto aquelas com substituinte na posição 3, foram reduzidas aos respectivos álcoois, sendo o excesso do enantiômero S igual ou maior que 97%. As conversões também foram altas. A p-metoxiacetofenona sofreu conversão de 94%. Para as demais cetonas deste grupo, a conversão ficou entre 97% e 99%. A presença de uma metoxila (grupo elétron doador), ligado ao anel aromático nas posições (2) ou (4), causa redução da susceptibilidade da carbonila a um ataque nucleofílico. Desse modo, é provável que a desativação da carbonila seja um dos fatores determinantes da queda no valor da

conversão quando a *para* ou a *orto*-metoxiacetofenona foram empregadas como substrato. Embora o grupo metila também seja elétron doador, esse efeito não foi percebido quando o substrato foi a *orto*-metilacetofenona.

TABELA 6. VALORES DA BIOMASSA SECA (BS), CONVERSÃO DE SUBSTRATO (C) E EXCESSO ENANTIOMÉRICO (S) (ee\_S) NOS ÁLCOOIS QUIRAIS RESULTANTES DA BIORREDUÇÃO PROMOVIDA POR *A. terreus* EM CRESCIMENTO EM ACETOFENONAS SUBSTITUÍDAS

<i>Substituente</i>	<i>BS (g)</i>	<i>C (%)</i>	<i>ee_S (%)</i>	<i>Cromatograma</i>
<i>H</i>	0,50	97	97	<i>Anexo 1</i>
<i>2-CH3</i>	0,48	97	>99	<i>Anexo 2(a)</i>
<i>3-CH3</i>	0,48	97	>99	<i>Anexo 2(b)</i>
<i>4-CH3</i>	0,46	92	82	<i>Anexo 2(c)</i>
<i>2-OCH3</i>	0,53	94	>99	<i>Anexo 3(a)</i>
<i>3-OCH3</i>	0,45	98	>99	<i>Anexo 3(b)</i>
<i>4-OCH3</i>	0,32	27	41	<i>Anexo 3(c)</i>
<i>2-Br</i>	0,52	>99	>99	<i>Anexo 4(a)</i>
<i>3-Br</i>	0,40	>99	>99	<i>Anexo 4(b)</i>
<i>4-Br</i>	0,55	98	48	<i>Anexo 4(c)</i>
<i>2-F</i>	0,46	>99	>99	<i>Anexo 5(a)</i>
<i>3-F</i>	0,43	>99	98	<i>Anexo 5(b)</i>
<i>4-F</i>	0,47	95	82	<i>Anexo 5(c)</i>
<i>2-NO2</i>	0,52	98	>99	<i>Anexo 6(a)</i>
<i>3-NO2</i>	0,57	98	>99	<i>Anexo 6(b)</i>
<i>4-NO2</i>	0,52	97	83	<i>Anexo 6(c)</i>

FONTE: AUTOR.

Condições reacionais: agitação 150 r.p.m., temperatura 30°C, quantidade de substrato - 20 mg ou 20 µL., tempo 24 h.

Para o grupo de cetonas com substituintes na posição quatro (4) do anel aromático, a enantiosseletividade foi significativamente reduzida. De um modo geral, quanto maior o grupo substituinte, mais acentuada foi a queda. Por exemplo, valores de ee\_S de 82% e de 48% foram obtidos com flúor e bromo, respectivamente. Já os valores de conversão não sofreram alterações tão evidentes. Uma interpretação coerente com esses resultados é a de que um substituinte, na posição *para*, não dificulta a redução catalítica da carbonila, mas prejudica o bloqueio da face *re* da carbonila durante o ataque nucleofílico.

Utilizando biomassa com tempo de crescimento entre 72 horas e 96 horas e tampões de diversos valores de pH como solvente, Comasseto *et al.* (2006) avaliaram a atividade de 8 linhagens, tanto na redução de *orto*-, *meta*- e *para*-nitroacetofenonas, quanto na resolução cinética dos respectivos álcoois. Os resultados de redução, apresentados para *orto*-nitroacetofenona, foram semelhantes aos apresentados na

Tabela 6 para todas as oito linhagens. Com *meta*-acetofenona, duas linhagens apresentaram resultados equivalentes aos apresentados na Tabela 6. As outras seis linhagens, com *meta*-acetofenona, apresentaram baixa enantiosseletividade. Nas reações com *para*-nitroacetofenona, a enantiosseletividade foi baixa, sendo que, em cinco linhagens, o enantiômero (R) tornou-se predominante. Algumas das linhagens estudadas por COMASSETO *et al.* (2006) foram empregadas em outros trabalhos, onde a atividade na redução de diversos derivados de acetofenona foi explorada (Andrade, L. H. *et al.*, 2004; Andrade, L. H., Piovan, L. e Pasquini, M. D., 2009). Outras linhagens, que apresentaram atividade na reação de Baeyer–Villiger, tiveram esta atividade estudada (Andrade, Leandro H. *et al.*, 2004; Keppler *et al.*, 2005).

De um modo geral, os resultados mostram que o excesso enantiomérico nos produtos pode passar de (S) para (R) a depender do substrato e do tempo de reação. Estas características não foram observadas nas reações catalisadas pela linhagem isolada e explorada neste estudo. Entretanto, observou-se inversão da enantiosseletividade quando a adição de acetofenona ao extrato de malte foi feita antes da inoculação, ou seja, quando se utilizou uma solução de extrato de malte e acetofenona como meio de cultura. Como a presença de acetofenona pode inibir o crescimento da biomassa, as inoculações foram feitas com uma suspensão mais concentrada em esporos (Tabela 7).

TABELA 7. ATIVIDADE CATALÍTICA DA BIOMASSA DO ASPERGILLUS TERREUS QUANDO A ACETOFENONA É ADICIONADA ANTES DA INOCULAÇÃO.

<b>Acetofenona (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Configuração</b>	<b>ee (%)</b>	<b>C (%)</b>	<b>BS (g)</b>
<b>0 / 80</b>	(S)	97 $\pm$ 1	99,1 $\pm$ 0,6	0,96 $\pm$ 0,02
<b>10</b>	(S)	83 $\pm$ 9	95 $\pm$ 3	<i>n.d.</i> *
<b>20</b>	(S)	68 $\pm$ 11	96 $\pm$ 3	<i>n.d.</i> *
<b>50</b>	(R)	66	67	0,96
<b>60</b>	(R)	76	53	0,89
<b>80</b>	(R)	82 $\pm$ 10	26 $\pm$ 8	0,75 $\pm$ 0,1
<b>100</b>	(R)	65	11	0,64
<b>120</b>	(R)	68	4	0,52

FONTE: AUTOR

Condições reacionais: agitação 150 r.p.m., temperatura 30°C, tempo 8 dias; **0\_7d**; **80\_24h**: fungo cultivado durante sete dias na ausência de acetofenona para depois fazer a reação (80  $\mu$ L/ 24 h). Os resultados apresentados com desvios correspondem às médias de triplicatas.

\*Reação interrompida no quarto dia. Biomassa seca não determinada.

A biomassa seca (B.S.) correspondente a oito dias de cultura pode diminuir quando acetofenona encontra-se presente no meio de cultura. Aparentemente, a inibição do crescimento acentua-se com a adição de 50/60 microlitros do substrato. Além da redução na quantidade, uma diferença de coloração é facilmente notada pois, quanto maior a quantidade de substrato presente, mais branco é o micélio. As características catalíticas também foram alteradas, de modo gradual, proporcional à quantidade de acetofenona, tornando evidente a presença de oxiredutases com enantiosseletividades opostas. Alguns resultados preliminares, não relatados aqui, indicaram que a acetofenona inibe a síntese da enzima (S) estereosseletiva. Quando se adiciona pouca acetofenona no início da reação, o ee<sub>S</sub> determinado nos produtos começa baixo e cresce significativamente no tempo. Provavelmente, a oxidação reduziu a concentração de acetofenona, permitindo, assim, a produção da enzima (S) estereosseletiva que, aparentemente, promoveu uma reação mais rápida que a enzima (R) estereosseletiva.

## CONCLUSÕES

A linhagem de *A. terreus* apresenta alta atividade na redução da acetofenona e de uma série de acetofenonas *orto* ou *meta*-substituídas no anel aromático, produzindo sempre álcoois quirais com elevado excesso (97% a 99%) do enantiômero (S). Entretanto, quando a acetofenona é adicionada antes da inoculação do meio de cultura, a redução é lenta, produzindo (R)-1-feniletanol em excesso de 87% e conversão de 25%.

Foram identificados e esclarecidos alguns aspectos importantes relativos ao cultivo desse micro-organismo, como a relação entre a espessura do meio de cultura e as características fenotípicas. Neste trabalho foi demonstrado que, *shakers* com órbitas diferentes podem, a depender do micro-organismo estudado e da concentração do inóculo, produzir biomassas com propriedades muito diferentes, chamando a atenção para a importância do apontamento deste parâmetro na descrição de uma metodologia.

A curva de crescimento e a atividade catalítica, em termos de conversão e estereosseletividade, foram determinadas simultaneamente. Esta metodologia economiza tempo e material, mas não é frequentemente utilizada ou descrita.

#### 4. REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. H. et al. Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, n. 4-6, p. 129-135, 2004. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138111770400236X> >.

\_\_\_\_\_. Asymmetric synthesis of arylselenoalcohols by means of the reduction of organoseleno acetophenones by whole fungal cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, n. 1-6, p. 47-54, 2004. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-2442450566&partnerID=40&md5=02114452fa043dc3cadf55eda6d3923a> >.

ANDRADE, L. H.; PIOVAN, L.; PASQUINI, M. D. Improving the enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*: the role of glycerol as a co-solvent. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, n. 13, p. 1521-1525, 2009. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67651124995&partnerID=40&md5=b839f7aad71996c12388bd9b0ddffd67> >.

ANDRADE, L. H.; PIOVAN, L.; PASQUINI, M. N. D. Improving the enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*: the role of glycerol as a co-solvent. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 13, p. 1521-1525, 2009. ISSN 0957-4166. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095741660900442X> >.

ASANO, Y.; HOLLMANN, F.; STEWART, J. D. Editorial on Biocatalysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, n. 0, p. 132-134, 2014. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117714000198> >.

BALAJEE, S. A. et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. **Stud Mycol**, v. 59, p. 39-46, 2007. ISSN 0166-0616 (Print) 0166-0616.

BEHRENS, G. A. et al. Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2191-2215, 2011. ISSN 1615-4169. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201100446> >.

BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 41-54, 2010. ISSN 0959-3993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-0140-1> >.

BRAGA, A. L. et al. Catálise assimétrica no Brasil: desenvolvimento e potencialidades para o avanço da indústria química brasileira. **Química Nova**, v. 36, p. 1591-1599, 2013. ISSN 0100-4042.

COMASSETO, J. V. et al. Biotransformations of ortho-, meta- and para-aromatic nitrocompounds by strains of *Aspergillus terreus*: Reduction of ketones and deracemization of alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 24-30, 2006.

DEAK, E. et al. *Aspergillus terreus* accessory conidia are multinucleated, hyperpolarizing structures that display differential dectin staining and can induce heightened inflammatory responses in a pulmonary model of aspergillosis. **Virulence**, v. 2, n. 3, p. 200-7, 2011. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21543882> >.

\_\_\_\_\_. *Aspergillus terreus* accessory conidia are unique in surface architecture, cell wall composition and germination kinetics. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7673, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888344> >.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**. 5th. Germany: Springer-Verlag, 2004. 454.

GRIMM, L. H. et al. Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. **Biotechnol Bioeng**, v. 87, n. 2, p. 213-8, 2004. ISSN 0006-3592 (Print) 0006-3592.

ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 174-180, 2005. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593105000165> >.

KEPPLER, A. F. et al. Enzymatic evaluation of different *Aspergillus* strains by biotransformation of cyclic ketones. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 7, p. 967-975, 2005. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-17844361937&partnerID=40&md5=a3a02bce7646973abdc017da7813b595> >.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, n. 2, p. 111-20, 1980. ISSN 0022-2844 (Print) 0022-2844.

KRULL, R. et al. Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 121, p. 1-21, 2010. ISSN 0724-6145 (Print) 0724-6145.

\_\_\_\_\_. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 112-123, 2013. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165612003574> >.

LASS-FLORL, C. et al. In vitro activities of amphotericin B and voriconazole against aleurioconidia from *Aspergillus terreus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 6, p. 2539-40, 2005. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804.

PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1271-1278, 2002. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003295920200002X> >.

PIOVAN, L. et al. Chemoselective screening for the reduction of a chiral functionalised ( $\pm$ )-2-(phenylthio)cyclohexanone by whole cells of Brazilian micro-organisms. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 19, n. 20, p. 2385-2389, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-57049102843&partnerID=40&md5=b8dfd8c0de351ff6fff6c9337be92c28> >.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985. ISSN 1472-765X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x> >.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, n. 4, p. 406-25, 1987. ISSN 0737-4038 (Print) 0737-4038.

SAMSON, R. A. et al. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 0, p. 39-55, 6// 2011. ISSN 0166-0616. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614600579> >.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 8, p. 1596-9, 2007. ISSN 0737-4038 (Print) 0737-4038.

THOMAS, C. R. Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. **Trends in Biotechnology**, v. 10, n. 0, p. 343-348, 1992. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016777999290266X> >.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 22, p. 4673-80, 1994. ISSN 0305-1048 (Print) 0305-1048.

TUCKER, K.; THOMAS, C. Mycelial morphology: The effect of spore inoculum level. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 11, p. 1071-1074, 1992. ISSN 0141-5492. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01021061> >.

VAN SUIJDAM, J. C.; KOSSEN, N. W. F.; PAUL, P. G. An inoculum technique for the production of fungal pellets. **European journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 211-221, 1980. ISSN 0171-1741. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00508608> >.

YANG, G.; DING, Y. Recent advances in biocatalyst discovery, development and applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, n. 0, 2014 ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089614004799> >.

## CAPÍTULO II

Influência da Acidez e da  
Concentração de Acetofenona na Atividade  
Catalítica da Biomassa de *A. terreus*

## 1. INTRODUÇÃO:

A necessidade de obtenção de produtos enantiomericamente puros em escala industrial, aliada às políticas de sustentabilidade do planeta, que exigem cada vez mais a redução/tratamento dos resíduos gerados pelas indústrias químicas, tornam a utilização de enzimas em processos industriais uma alternativa que pode contemplar, simultaneamente, ambos os requisitos. Esta qualidade dos processos enzimáticos vem justificando a pesquisa em busca da descoberta de novas enzimas e do aprimoramento daquelas já conhecidas, sendo várias as estratégias de pesquisa e desenvolvimento neste campo (Behrens *et al.*, 2011). A avaliação das propriedades catalíticas da biomassa de micro-organismos, em crescimento ou em repouso, quando utilizada como biocatalisador, é uma destas estratégias para a descoberta de novas enzimas. A utilização de células em repouso, em comparação a células em crescimento, tem como vantagens a possibilidade de se controlar a quantidade de biomassa do catalisador e reduzir a presença de produtos secundários oriundos do metabolismo microbiano nos produtos de reação.

O gênero *Aspergillus* é subdividido em subgêneros, e os subgêneros em seções. *Aspergillus terreus* é a espécie mais importante dentro da seção *Terrei*. Recentemente, foi proposto que algumas das linhagens de *A. terreus* fossem consideradas uma nova espécie (**comb. et stat. nov.** MycoBank MB560393), denominada *Aspergillus floccosus* (Samson *et al.*, 2011). Aparentemente, a proposta não foi aceita, pois o número de registro (MB560393) aparece como não válido no endereço <http://www.mycobank.org/>. Deste modo, por enquanto, o termo *floccosus* é simplesmente sinônimo de *terreus*, que é o termo mais frequente na denominação desta espécie. Trata-se de um micro-organismo cosmopolita, encontrado nos mais variados climas. Apesar de comum, *A. terreus* não é empregado em atividades antrópicas, como a produção de alimentos e bebidas, por tratar-se de agente patogênico causador de aspergiloses, dentre outras infecções, principalmente em pacientes imunodeprimidos (Lass-Flori, 2012; Slesiona *et al.*, 2012). Entretanto, com o desenvolvimento da pesquisa em microbiologia e biotecnologia, foram descobertas importantes aplicações para esta espécie. Via fermentação, é produzido o ácido itacônico, um ácido dicarboxílico empregado na produção de resinas, plásticos, tintas e fibras

sintéticas (Steiger *et al.*, 2013). Além disso, alguns metabólitos secundários deste fungo, como a lovastatina, apresentam atividade farmacológica aproveitada na produção de medicamentos (Casas López *et al.*, 2003).

Nos anos 2000, os resultados do uso da biomassa de linhagens de *A. terreus* como biocatalisador de reações estereosseletivas foram discutidos numa série de publicações acadêmicas (Comasseto, J. V. *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2004; Comasseto *et al.*, 2004; Keppler *et al.*, 2005; Comasseto *et al.*, 2006; Assis *et al.*, 2007; Piovan *et al.*, 2008; Andrade, Piovan e Pasquini, 2009). As linhagens exploradas nesses trabalhos, num total de dez, fazem parte da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação André Toselo (<http://fat.org.br>) e da Coleção de Culturas do Instituto de Botânica e Jardim Botânico de São Paulo (<http://www.ibot.sp.gov.br>). Com exceção de uma, todas as demais linhagens foram provenientes do isolamento de material coletado, geralmente solo, em diversas regiões do Brasil. Utilizando-se células inteiras, o potencial dos fungos foi explorado, de modo geral, quanto à redução estereosseletiva de cetonas pró-quirais (acetofenona e derivados), quanto à dextrimerização de aril etanóis e também quanto à atividade em reações de Bayer-Villiger. Neste último caso, também acetofenonas, mas principalmente derivados de cicloexanonas, foram utilizados como substrato. Na maior parte dos resultados, observou-se a competição entre monooxigenases (Bayer–Villiger) e desidrogenases nas reações catalisadas.

O solo do município de Santo Amaro da Purificação/BA/Brasil, principalmente nas vizinhanças de uma antiga fundição, é contaminado por metais pesados, principalmente chumbo e cádmio. O isolamento e a identificação de bactérias deste solo ambientalmente impactado foram realizados (Souza, 2013), e continuam em andamento em alguns projetos de pós-graduação do Programa em Biotecnologia da UEFS. O presente trabalho é o primeiro a explorar, utilizando células inteiras em repouso, o potencial de enzimas produzidas por uma linhagem de *Aspergillus terreus*, isolada daquele solo contaminado. Os efeitos de diferentes concentrações de acetofenona, do pH do meio, do tempo de crescimento da biomassa e do tempo de reação, sobre a conversão e excesso enantiomérico em reações químicas de redução de

cetonas a álcoois para uma determinada biomassa de *A. terreus*, suspensa em água destilada foram avaliados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS (TAMPÕES E ÁGUA ESTÉREIS) PARA AS REAÇÕES QUÍMICAS

Em frascos reagentes de 300 mL, contendo 100 mL de água destilada, foram adicionadas as massas de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e fosfato de potássio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) discriminadas na Tabela 1, de acordo com o pH desejado. Em seguida, as soluções foram esterilizadas em autoclave (120°C/15 minutos) e armazenadas para uso no momento da reação. Para reações em água, seguiu-se o mesmo procedimento, sem a adição dos sais.

TABELA 1. MASSAS DE  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  E  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  PARA 100 ML DE ÁGUA EM FUNÇÃO DO pH DESEJADO ( $[\text{PO}_4^{3-}] = 0,1 \text{ MOL/L}$ ).

<b>pH</b>	<b>4,5</b>	<b>5,0</b>	<b>5,5</b>	<b>6,0</b>	<b>6,5</b>
<b><i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O/g</i></b>	1,38	1,36	1,31	1,16	0,84
<b><i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O/g</i></b>	0	0,051	0,120	0,400	1,021

FONTE: AUTOR

### 2.2 PRODUÇÃO DA BIOMASSA UTILIZADA COMO BIOCATALISADOR

Meio de cultura estéril (malte/ágar 2% em placa de Petri), foi inoculado com um fragmento de colônia de *A. terreus*, preservada em água estéril. Após 7 dias de crescimento (BOD/28 °C), foi recortado um cilindro de 3 mm de diâmetro na região mediana entre o centro e a borda. O cilindro foi transferido para um frasco de vidro com tampa (18 mL) contendo 14,5 mL de glicerol a 20% (v/v). O sistema foi agitado vigorosamente (manualmente), formando uma suspensão de esporos. Imediatamente após a agitação, sugou-se a suspensão de esporos com seringa (20 mL) e agulha descartáveis. O conteúdo da seringa foi distribuído entre dois frascos (10 mL) conta-gotas feitos de polietileno e previamente esterilizados (a agulha foi introduzida no orifício do gotejador para realizar a transferência).

Com a suspensão recém-preparada, foi feita a inoculação do extrato de malte (20 frascos reagentes de 300 mL, cada um com 100 mL de extrato de malte a 2%, previamente esterilizados em autoclave). Cada inoculação foi feita dispensando 640  $\mu$ L da suspensão dentro de cada frasco reagente. Imediatamente antes da dispensa do referido volume, a suspensão foi agitada manualmente e a inoculação foi feita de modo asséptico (capela de fluxo laminar e chama). Os frascos reagentes, contendo extrato de malte inoculado, foram incubados em agitador orbital a 30°C e 150 rpm (órbita 50 mm).

Após o tempo de cultura desejado (96-168 h), os *pellets* de biomassa de cada frasco foram recolhidos em peneira de polietileno e transferidos para béqueres de 2 L, acumulando a biomassa produzida em 10 frascos. Os *pellets* foram ressuspensos em 1000 mL de água destilada, agitando-se levemente com uma colher de alumínio (haste longa). A suspensão foi sendo, aos poucos, passada pela peneira de polietileno e os *pellets* foram novamente recolhidos. Cada vez que a capacidade da peneira foi atingida, interrompeu-se a separação para que o excesso de água fosse drenado. A biomassa na peneira foi revolvida com a colher de alumínio até que a água parasse de escorrer e, em seguida, foi transferida para um béquer seco, onde toda a biomassa lavada foi sendo acumulada. A quantidade de biomassa produzida em 10 frascos, a depender do tempo de cultura, foi suficiente para realizar até 20 reações químicas.

O pH dos meios reacionais onde os micro-organismos cresceram foi medido e os meios e a água de lavagem, juntamente com a biomassa não utilizada, foram esterilizados em autoclave (120°C/30minutos) e descartados.

### 2.3 REAÇÕES DE REDUÇÃO DA ACETOFENONA

Aos sistemas preparados em “2.1”, de acordo com o meio reacional desejado, transferiu-se  $6,0 \pm 0,1$  g da biomassa lavada. Antes de cada pesagem, a biomassa foi revolvida com a colher, para homogeneizar a distribuição da água.

Encerradas as pesagens, com auxílio de uma micropipeta de volume variável (20-200  $\mu$ L), foi adicionado acetofenona (20  $\mu$ L  $\approx$  20mg) a cada um dos sistemas contendo biomassa e solvente. O horário de cada adição foi anotado

em etiquetas aderidas aos frascos de 300 mL, que foram transferidos para o agitador orbital (30 °C; 150 rpm / órbita 50 mm). Contando-se o tempo a partir da adição do substrato, foram retiradas alíquotas de 2,0 mL do meio reacional nos tempos 4 h, 12 h e 24 h. As alíquotas foram coletadas em pipeta graduada e transferidas para um tubo de ensaio contendo 2 mL de acetato de etila. O tubo de ensaio foi agitado para extração do produto. Após a separação das fases, a fase aquosa foi removida com pipeta Pasteur e a fase orgânica foi armazenada para análise cromatográfica. Encerrada a reação, o conteúdo dos sistemas foi individualmente passado em peneira, retirando-se os *pellets*. O excesso de água foi removido espremendo a biomassa contra a malha da peneira, com ajuda de uma colher de alumínio. A biomassa foi desidratada, também separadamente, sobre papel toalha em estufa a 80 °C. Após 24 h de secagem (peso constante), as massas foram pesadas em balança analítica.

Para testar a tolerância à acetofenona, foi realizado procedimento análogo ao descrito acima, mas as quantidades adicionadas variaram de 20 µL a 200 µL (tipicamente 20, 40, 65, 85, 100, 120, 140 e 160 µL) e as alíquotas para análise foram tomadas em intervalos de tempo maiores (tipicamente 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, 192 h).

Para as reações com *para*, *meta* e *o*-fluoracetofenona e também com *p*-metilacetofenona, o procedimento foi análogo ao empregado nas cinéticas com 20 µL de acetofenona, mas, além do controle do volume, os substratos foram também pesados em balança analítica. Os substratos sólidos, *p*-nitroacetofenona e *p*-metoxiacetofenona foram pesados (20 mg) antes da transferência. A extração final, após 24 horas de reação, foi feita no volume total remanescente, utilizando-se 30 mL de acetato de etila e um funil de separação de fases. Em alguns testes, o pH do meio reacional foi medido no final do processo, antes de descartar os resíduos. O descarte dos resíduos foi realizado após esterilização em autoclave (120 °C / 30 min).

## 2.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Os extratos em acetato de etila foram concentrados antes das análises. Para extratos derivados do emprego de 30 mL de acetato de etila, reduziu-se o volume a  $\frac{1}{4}$  do original.

Após a concentração das amostras, as análises cromatográficas (CG) foram realizadas empregando coluna quiral CYDEX-B (25 m x 0,22 m x 0,22  $\mu\text{m}$ ), usando Hélio como gás de arraste ( $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) em um cromatógrafo Varian CP-3380 com detector de ionização de chama DIC. De cada extrato, injetaram-se 0,2  $\mu\text{L}$ . Identificados no cromatograma os três picos de interesse (substrato remanescente e os enantiômeros derivados), a integração computadorizada das áreas correspondentes permitiu calcular conversão, C, e Excesso Enantiomérico do Isômero (S), ee\_S (Equações 2 e 3).

$$C = [(A_3+A_2) / (A_1+ A_2+ A_3)] \times 100\% \quad (2)$$

$$ee\_S = [(A_3-A_2) / (A_3+A_2)] \times 100\% \quad (3)$$

Onde:

A<sub>1</sub> = Área do pico atribuído à cetona;

A<sub>2</sub> = Área do pico atribuído ao enantiômero (R)

A<sub>3</sub> = Área do pico atribuído ao enantiômero (S)

TABELA 2. 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.)
H	100	---	0	0
	150	5	---	10
4-Me	100	---	10	10
	200	10	-----	20
4-MeO	140	---	15	12
	200	10	---	21
2, 3 ou 4-F	100	---	10	10
	200	10	---	20
4-NO <sub>2</sub>	150	---	12	12
	200	15	---	30

FONTE:AUTOR

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

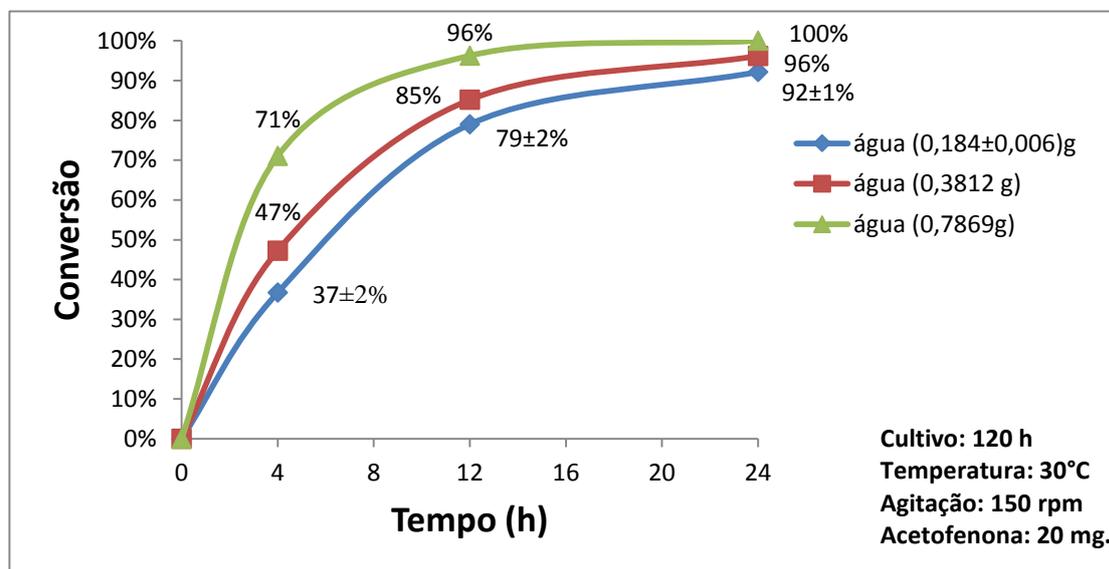
#### 3.1 INFLUÊNCIAS DE PH E DO TEMPO DE CRESCIMENTO.

A conversão,  $C$ , e o excesso enantiomérico,  $ee_S$ , foram determinados em uma série de reações de redução de acetofenona a 1-feniletanol, catalisadas pela biomassa do fungo *A. terreus*. Os resultados estão apresentados na forma de gráficos, que mostram  $C$  e  $ee_S$  em função do tempo de reação. Os resultados sofreram variações significativas, de acordo com a idade da biomassa (tempo de cultura) e do pH do meio aquoso onde as reações foram conduzidas. A influência do tempo de cultura foi verificada a partir da catalisação das reações com biomassas cultivadas: (a) 72 h; (b) 96 h; (c) 120 h; (d) 144 h; (e) 168 h. A influência do pH foi verificada conduzindo-se a reação em tampão fosfato a 0,1 mol/L, com os seguintes valores de pH: (a) 4,5; (b) 5,0; (c) 5,5; (d) 6,0; (e) 6,5. Além da utilização dos meios tamponados, a condução de reduções em água destilada, sem controle de pH, também foi realizada.

Numa reação química catalisada, a conversão é função de vários fatores, dentre eles a quantidade de catalisador. A conversão de acetofenona (20 mg) foi determinada em função do tempo para três quantidades distintas de biomassa (catalisador). As condições de reação e os valores de conversão determinados em função do tempo encontram-se especificados na Figura 1, onde as três séries de resultados estão identificadas pelo solvente empregado na reação (água) e pela quantidade de biocatalisador, expressa entre parênteses, em termos de massa seca. O efeito da quantidade de biocatalisador no valor da conversão foi mais expressivo quando avaliado no início da reação. Por exemplo, com 4 h de reação, a conversão quase dobrou em consequência da elevação da quantidade de biomassa. Desse modo, para avaliar o efeito de outras variáveis, tais como pH do meio e idade da biomassa, na eficiência catalítica, foi necessário controlar a quantidade de biomassa empregada. Esse controle é um pouco trabalhoso, pois exige que, após crescimento e lavagem, o percentual de água retido pelas diversas biomassas varie pouco. A Figura 2 registra as quantidades de biomassa, em termos de massa seca, utilizadas nas reações onde foram avaliados os efeitos da acidez do meio reacional e do tempo de crescimento do fungo na conversão de 20 mg de acetofenona a 1-feniletanol. A relativa

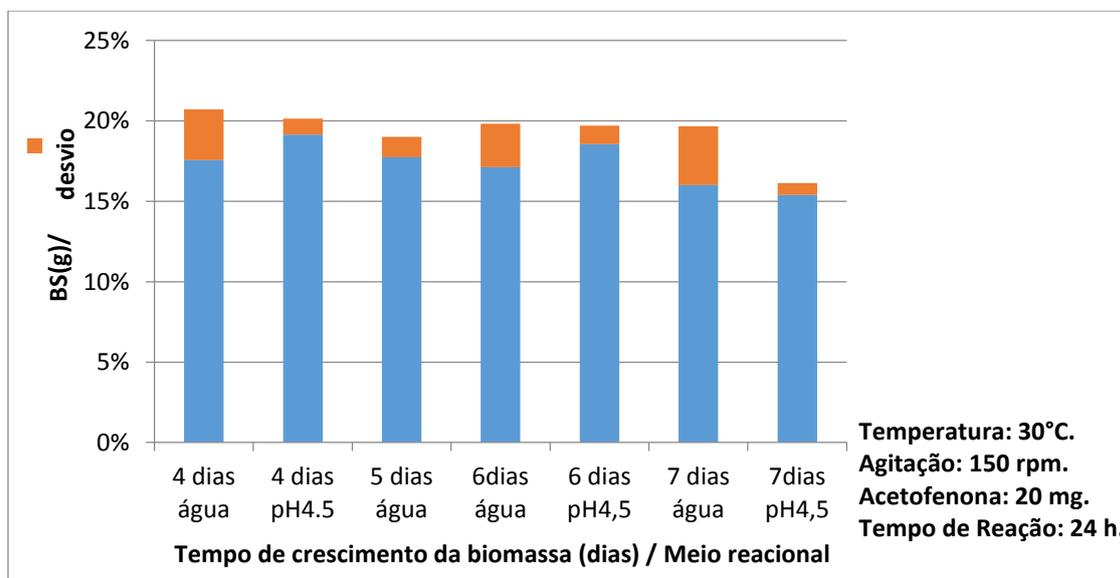
constância dos resultados demonstra que o controle do teor de água na biomassa foi eficiente.

FIGURA 1. CONVERSÃO MÉDIA DE ACETOFENONA EM 1-FENILETANOL, MEDIADA POR 3 QUANTIDADES DIFERENTES DE BIOMASSA, REGISTRADAS ENTRE PARÊNTESES, NA FORMA DE BS.



FONTE: AUTOR

FIGURA 2. COMPARAÇÃO DAS BS MÉDIAS OBTIDAS APÓS 24 h DE REAÇÃO PARA DOIS TIPOS DE MEIO (ÁGUA DESTILADA E TAMPÃO pH 4,5 A 0,1 MOL/L) UTILIZANDO BIOMASSAS COM DIVERSOS TEMPOS DE CULTIVO.

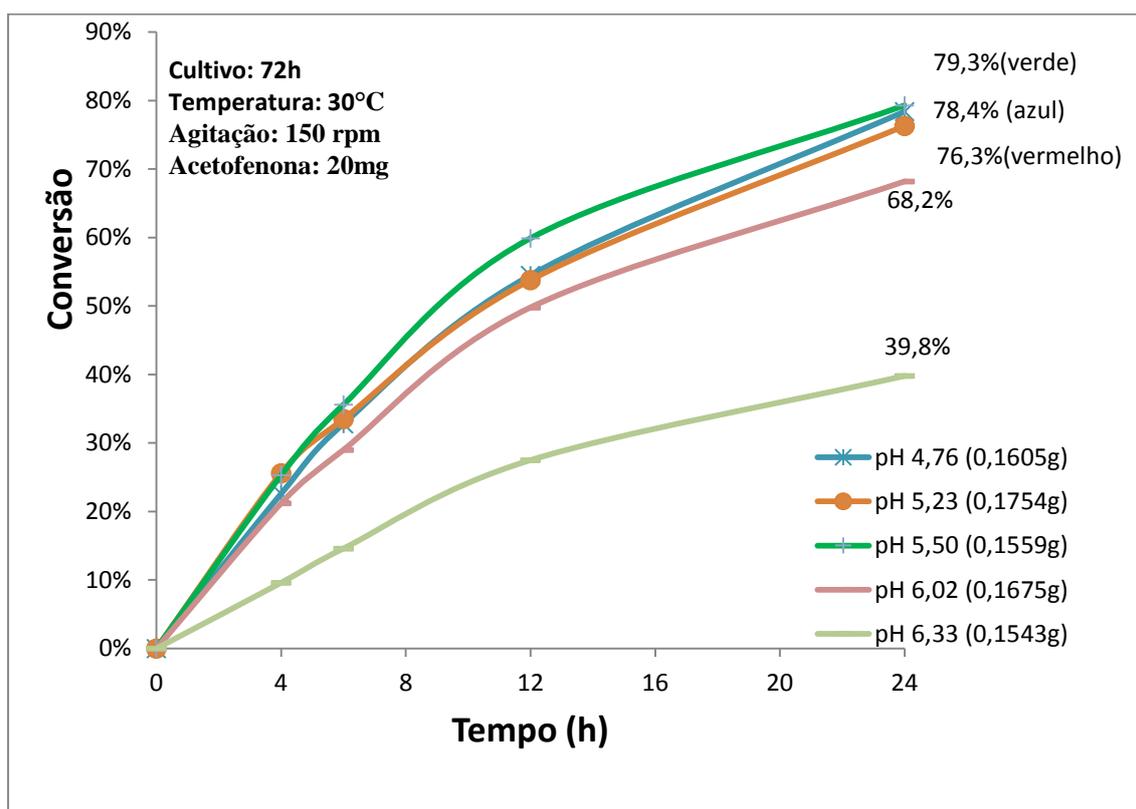


FONTE: AUTOR

A influência do tempo de cultura na conversão foi inicialmente determinada para biomassa cultivada por 72 h. Os resultados estão

representados nas curvas da Figura 3. Cada série de dados forma uma linha, identificada pelo valor do pH medido ao término de cada ensaio (24 h de reação). Entre parênteses, junto do valor do pH, registrou-se a quantidade de biomassa utilizada como catalisador, expressa em termos de massa seca. Ao observar a figura, a série de resultados determinados em pH 6,3 ficou em destaque, devido à sua posição isolada, abaixo das demais, consequência dos baixos valores de conversão. As séries correspondentes aos três meios mais ácidos ficaram entrelaçadas, ou seja, a variação do pH entre 4,5 e 5,5 não interferiu significativamente na conversão atingida em 24 h. A linha correspondente aos resultados obtidos em pH 6 ficou numa posição intermediária. De um modo geral, a elevação do pH ou não interferiu, ou acarretou em queda na conversão.

FIGURA3. CONVERSÃO DE ACETOFENONA A 1-FENILETANOL, MEDIADA POR BIOMASSA COM 72 h DE CULTIVO, PARA CINCO VALORES DISTINTOS DE pH. AS MASSAS ENTRE PARÊNTESES CORRESPONDEM AOS VALORES DE BS.

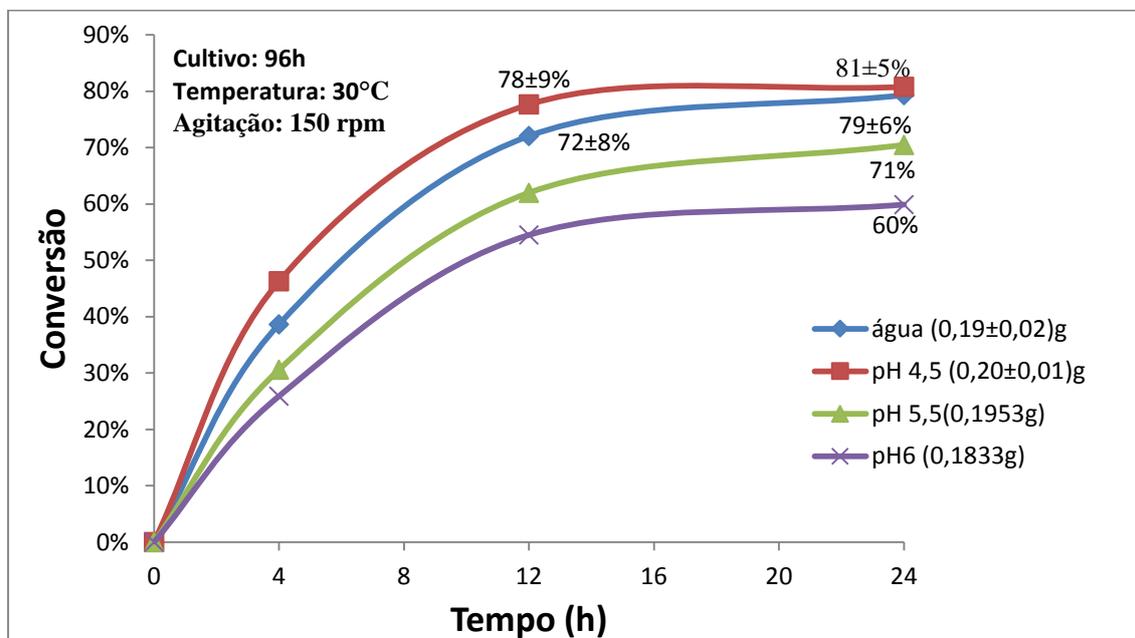


FONTE: AUTOR

Na Figura 4, estão os resultados registrados para reações catalisadas com biomassa cultivada durante 96 h. Os ensaios em água e em pH 4,5 foram realizados em triplicata, enquanto os ensaios realizados com os demais valores de pH foram ensaios simples. Novamente, o emprego de tampão fosfato ou não

alterou significativamente, ou reduziu, os valores das conversões determinadas com 24 h de reação.

FIGURA 4. CONVERSÃO DE ACETOFENONA A 1-FENILETANOL, MEDIADA POR BIOMASSA COM 96 h DE CULTIVO, EM QUATRO VALORES DE pH. EM ÁGUA, O pH FICA EM TORNO DE 5. ENTRE PARÊNTESES ESTÃO AS MASSAS SECAS CORRESPONDENTES.

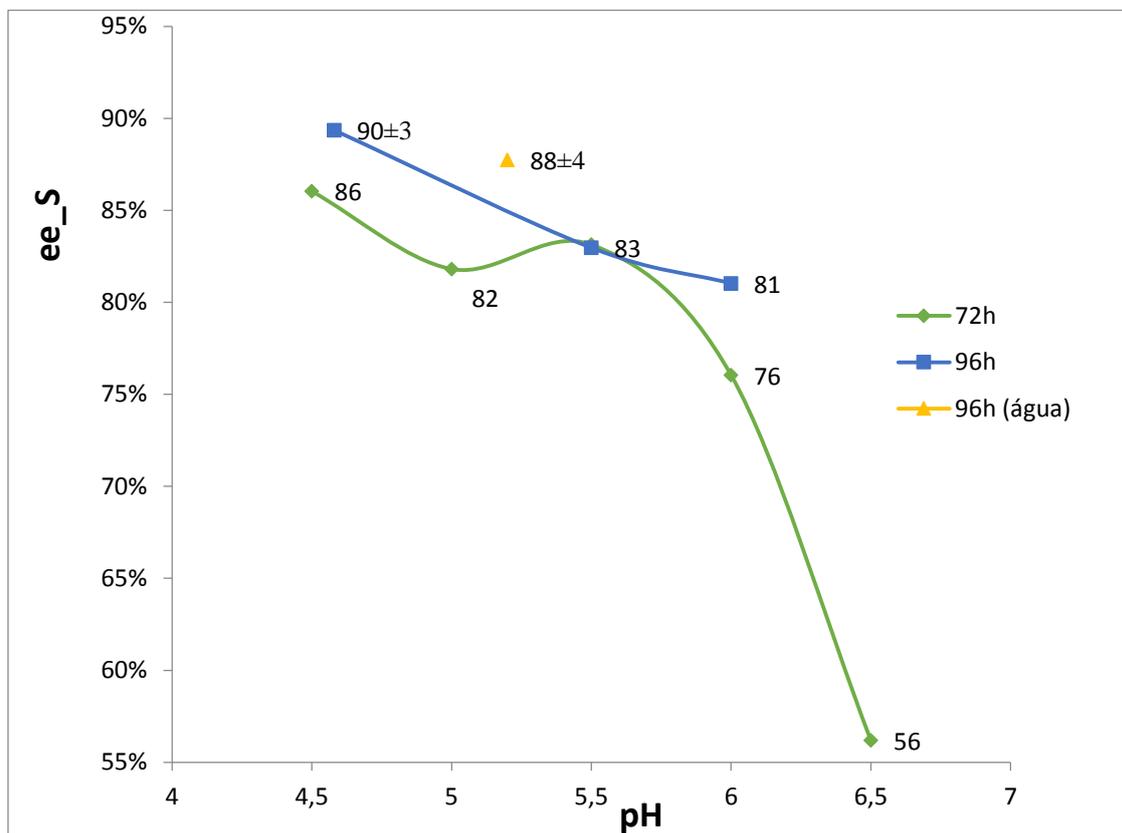


FONTE: AUTOR.

Quando considerado o tempo final de reação (24 h), os resultados da conversão para biomassas cultivadas por 96 h (Figura 4) ou 72 h (Figura 3), comparados para as mesmas condições de acidez, foram semelhantes. Para tempos menores, como 12 h, por exemplo, a biomassa cultivada por 96 h proporcionou conversões bem acima dos valores atingidos com a biomassa cultivada por 72 h. A redução da acetofenona, quando catalisada pela biomassa cultivada por 96 h, foi mais rápida, ou melhor, atingiu o equilíbrio em menos tempo ( $C_{12h}=78\%$ ;  $C_{24h}=81\%$ ). A quantidade média de biocatalisador empregada nas reações catalisadas pela biomassa cultivada por 72 h foi de  $0,16\pm 0,01$  g. Já a quantidade de biomassa nas reações catalisadas pela biomassa cultivada por 96 h foi de  $0,19\pm 0,02$  g apresentando-se, em média, 20% maior. Entretanto, as conversões atingidas em 12 h de reação foram, aproximadamente, 33% mais elevadas, indicando menor eficiência da biomassa mais jovem.

Na Figura 5, foram registrados os valores dos excessos enantioméricos de (S)1-feniletanol, determinados nos produtos das reações promovidas pelas biomassas cultivadas por 72 h e 96 h. Os resultados foram determinados para 24 h de reação e aparecem em função do pH do meio em que a reação ocorreu. O resultado médio referente à série (triplicata) de reações feitas em água (sem tampão) aparece como um ponto isolado. A posição deste ponto no gráfico foi coordenada com valor medido de pH no tempo final de reação (pH = 5,2). De um modo geral, a estereosseletividade diminuiu em função da redução da acidez. Acima de pH 6, a diminuição tornou-se muito acentuada e, para qualquer pH, a biomassa mais velha (96 h) foi mais estereosseletiva.

FIGURA 5. EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE (S)1-FENILETANOL EM FUNÇÃO DO pH, PARA TEMPO DE REAÇÃO IGUAL A 24 h, PARA BIOMASSAS COM 72 h E 96h DE CULTIVO.



FONTE: AUTOR.

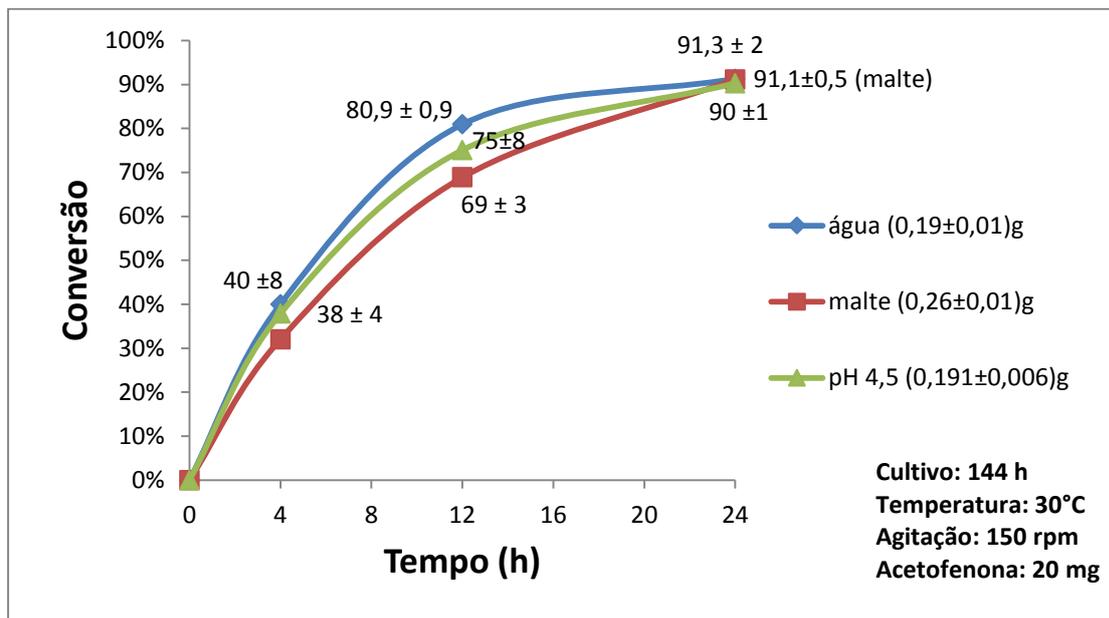
Além dos resultados apresentados nas Figuras 3, 4 e 5, foi medido o pH do extrato de malte após o crescimento dos fungos, não só para 72 h e 96 h de crescimento, mas também para 120 h, 144 h e 168 h. O valor médio de pH, independentemente do tempo de crescimento, foi  $4,6 \pm 0,1$ . Em um ensaio

realizado em triplicata, a biomassa cultivada por 96 h foi deixada em contato com água destilada durante 12 h. O pH resultante na solução foi  $5,2 \pm 0,1$ . Ou seja, o metabolismo da linhagem de *A. terreus* aqui explorada, quando colocado em um meio aquoso não tamponado, provoca a acidificação para uma faixa de pH entre 4,5 e 5,3. A utilização deste fungo fora desta faixa de pH, de acordo com os testes realizados, indicaram uma piora tanto na conversão, quanto no excesso enantiomérico das reações de redução de acetofenona. Por este motivo, apenas reações em água e em tampão fosfato pH 4,5 foram consideradas na avaliação de biomassas com tempos de cultura superiores a 96 h.

Para biomassa cultivada por 144 h, a redução de acetofenona foi testada em três solventes diferentes: água destilada, tampão pH 4,5 e extrato de malte. Os resultados (médias de triplicatas), com os respectivos desvios padrão, estão representados na Figura 6. Para extrato de malte (curva em vermelho), a redução inicia-se mais lenta que em água (azul) ou tampão (verde). Mas, no decorrer do tempo, a reação em extrato de malte sofre menor desaceleração que nos demais solventes e, ao final de 24 h, as conversões tornam-se equivalentes para as três situações avaliadas. Convém observar que, enquanto para “água” e “pH 4,5” a conversão parece estar se estabilizando com 24 h de reação, para o fungo em extrato de malte, a inclinação da curva em vermelho indica que, com um maior tempo, a conversão iria aumentar, provavelmente em decorrência do aumento da biomassa durante a reação. Embora tenha sido usada a mesma massa inicial de fungo, em extrato de malte, a massa seca média foi de 0,26 g, contra 0,19 g para água ou tampão pH 4,5.

De acordo com estudos realizados anteriormente, a biomassa desta mesma linhagem de *A. terreus*, após 144 h de cultura em extrato de malte, já atingiu a fase estacionária de crescimento. Entretanto, os procedimentos de lavagem e redistribuição do micélio no extrato de malte aqui adotados (ver parte experimental) fizeram com que o crescimento fosse retomado.

FIGURA 6. CONVERSÃO MÉDIA DE ACETOFENONA EM 1-FENILETANOL, MEDIADA POR BIOMASSA COM 144 h DE CULTIVO, PARA TRÊS MEIOS REACIONAIS DIFERENTES. BS REGISTRADA ENTRE PARÊNTESES.

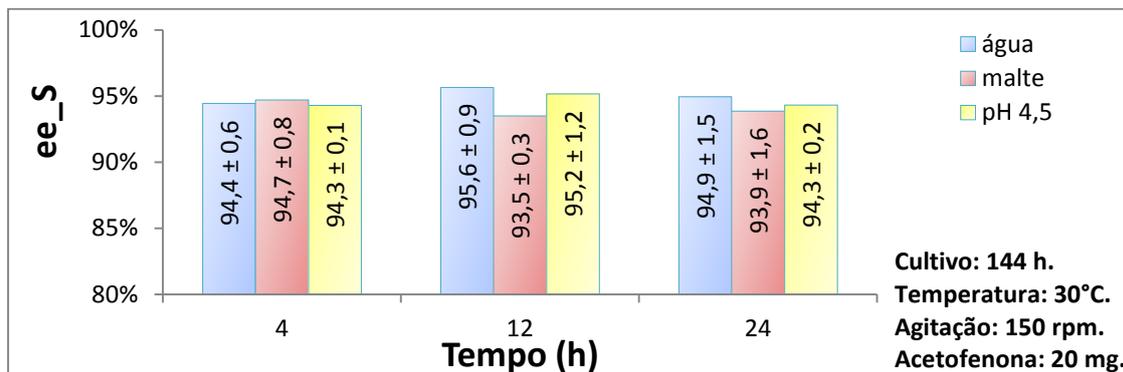


FONTE: AUTOR

Considerando os meios reacionais “água” e “tampão 4,5”, a comparação dos resultados apresentados nas Figuras 5 e 6 demonstraram desempenhos semelhantes nas primeiras 12 h de reação. Entretanto, a conversão de 91% proporcionada pela biomassa crescida em 144 h foi significativamente superior àquelas proporcionadas pela biomassa crescida durante 96 h (79-81%), quando o tempo de reação considerado é de 24 h. Ou seja, empregando-se biomassa com 144 h de cultivo, a velocidade de conversão sofre menor desaceleração em função da redução na concentração de substrato e da passagem do tempo. Este resultado pode ser indicativo de que, na biomassa crescida em 144 h, a presença de cofatores que reativam as enzimas tenha sido maior, proporcionando menor perda de atividade.

A Figura 7 mostra que os valores do excesso enantiomérico determinados não variaram significativamente em função do tempo de reação ou do tipo de solvente empregado. Tomando-se os resultados para 24 h e comparando-os com os da Figura 5 (biomassas com 72 h e 96 h de cultura), notamos um aumento médio de pelo menos 3 pontos percentuais.

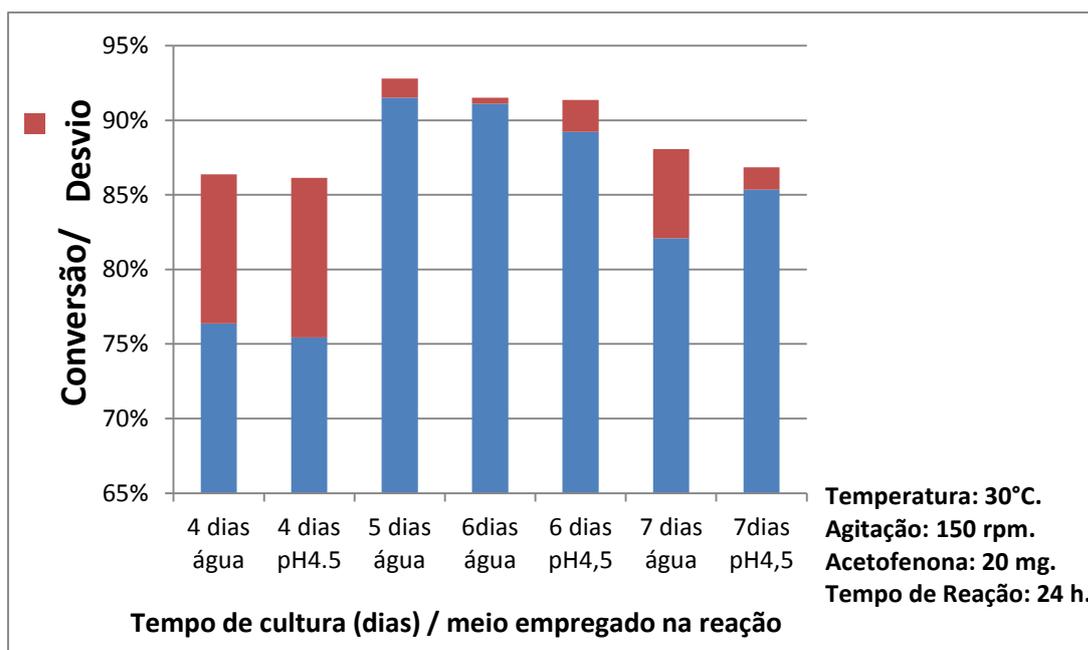
FIGURA 7. EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE (S)1-FENILETANOL PARA VÁRIOS TEMPOS DE REAÇÃO MEDIADA POR BIOMASSA COM SEIS DIAS (144 h) DE CRESCIMENTO.



FONTE: AUTOR

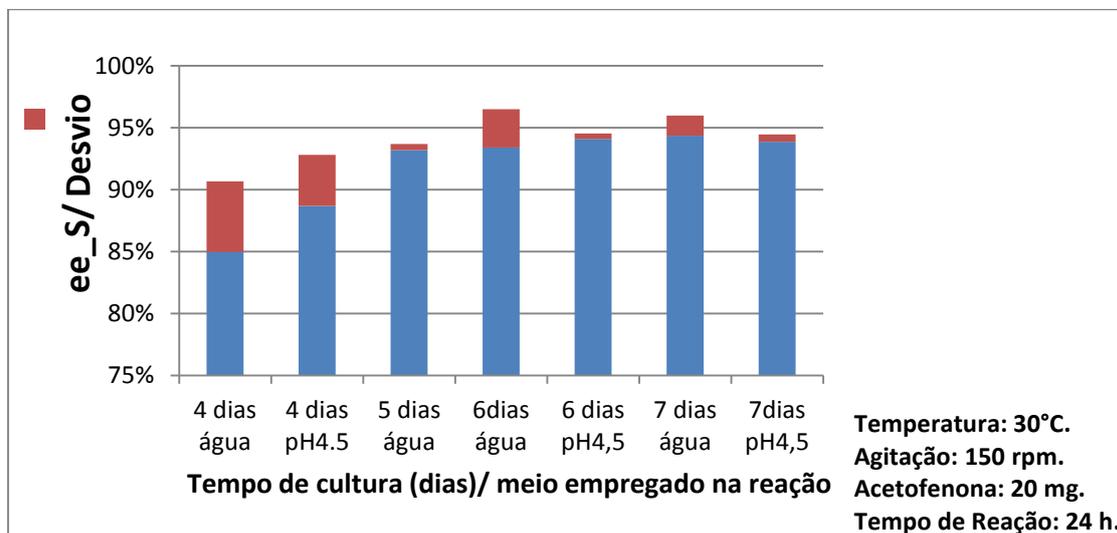
Na Figura 8, podem ser comparados os valores, utilizando-se água e tampão pH 4,5 como meio reacional, das conversões atingidas em 24 h de reação de redução de 20 mg de acetofenona, para biomassas cultivadas a partir de 96 h (4 dias) até 168 h (7 dias). Os valores correspondentes aos excessos de (S)1-feniletanol, nos produtos das respectivas reações, encontram-se representados na Figura 9.

FIGURA 8. CONVERSÕES MÉDIAS ATINGIDAS EM 24 h DE REAÇÃO PARA DOIS TIPOS DE MEIO (ÁGUA DESTILADA E TAMPÃO pH 4,5 A 0,1 MOL/L) UTILIZANDO-SE BIOMASSAS DE *A. terreus* COM DIVERSOS TEMPOS DE CULTIVO. ENSAIOS EM TRIPLICATA, ONDE O RESULTADO MÉDIO CORRESPONDE AO CENTRO DA BARRA VERMELHA.



FONTE: AUTOR

FIGURA 9. VALORES MÉDIOS DE EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE (S)-1-FENILETANOL ATINGIDOS EM 24 h DE REAÇÃO PARA DOIS TIPOS DE MEIO (ÁGUA DESTILADA E TAMPÃO pH 4,5 A 0,1 MOL/L) UTILIZANDO-SE BIOMASSAS DE *A. terreus* COM DIVERSOS TEMPOS DE CULTIVO.



FONTE: AUTOR

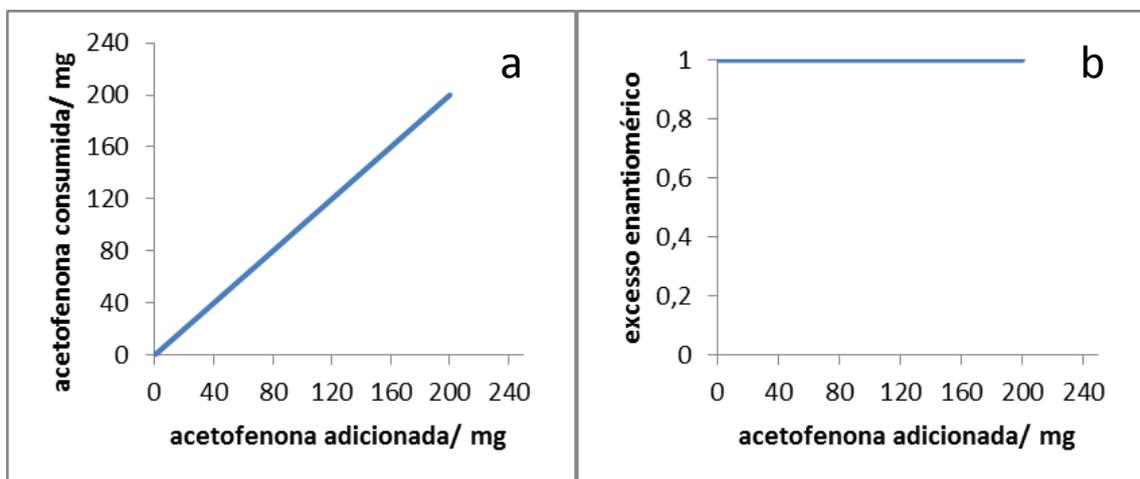
A combinação conversão máxima/desvio mínimo foi atingida quando a biomassa foi cultivada entre 5 e 6 dias. Os valores foram significativamente maiores que aqueles atingidos pelas biomassas cultivadas por 96 h, e foram levemente maiores que os atingidos pela biomassa cultivada por 168 h. Os excessos enantioméricos foram mais baixos quando o tempo de crescimento que precedeu a utilização dos fungos foi menor. A partir de 6 dias de crescimento, o excesso enantiomérico proporcionado pelo biocatalisador estabilizou-se próximo ao valor máximo. Os resultados determinados na presença de tampão fosfato pH 4,5 não mostraram diferenças significativas em relação aos resultados determinados utilizando-se meio aquoso não tamponado. Além disso, o emprego de tampão fosfato com outros valores de pH já havia se mostrado prejudicial. Deste modo, o uso de tampão fosfato foi desconsiderado nas demais investigações experimentais.

### 3.2 PRODUTIVIDADE NA CONVERSÃO E TOLERÂNCIA À ACETOFENONA

Nesta etapa, todos os experimentos foram realizados em água (sem tampão). Com o objetivo de determinar quanto substrato pode reagir, em quanto tempo, mantendo-se um alto índice de estereosseletividade no produto, foram realizadas reações com quantidades crescentes de substrato, mantendo-se

constante a quantidade de biocatalisador. Numa situação ideal, ocorreria o consumo instantâneo de toda acetofenona adicionada, produzindo somente (S)-1-feniletanol. Nesta situação, a quantidade consumida (Y), em função da quantidade adicionada de substrato (X), quando representadas num plano ordenado, traçariam uma reta de inclinação 45° (Figura 10a). Já o excesso enantiomérico, numa situação ideal, valeria sempre 1 (100%), ou seja, se o excesso enantiomérico fosse representado em um plano ordenado como função da quantidade adicionada de substrato, traçaria uma reta cuja ordenada vale sempre 1 (Figura 10b).

FIGURA 10. QUANTIDADE DE ACETOFENONA CONSUMIDA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE ADICIONADA (SISTEMA IDEAL) (a). EXCESSO ENANTIOMÉRICO EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE ADICIONADA DE ACETOFENONA (SISTEMA IDEAL) (b).



FONTE: AUTOR

Para expressar os resultados experimentais no mesmo molde da Figura 10a, definimos “acetofenona consumida” como (Equação 1):

$$\text{Acetofenona consumida} = \text{Acetofenona adicionada} \times \text{Conversão} \quad (1)$$

Nas condições experimentais utilizadas no crescimento do fungo ocorreu formação de biomassa aderida ao vidro e de biomassa em suspensão no meio reacional (*pellets*). A Tabela 3 mostra resultados de ensaios realizados em triplicata, onde se comparou a biomassa aderida (denominada fita) com a biomassa em forma de *pellets*. Em consequência dos resultados inferiores apresentados pela biomassa que se formou aderida ao vidro, somente a biomassa formada em suspensão (*pellets*), passou a ser utilizada como biocatalisador.

TABELA 3. DESEMPENHO DA BIOMASSA EM FUNÇÃO DA REGIÃO ONDE SE DESENVOLVEU: EM SUSPENSÃO NO MEIO DE CULTURA (*PELLETS*) OU ADERIDA AO VIDRO (FITA) APÓS 24 h E 48 h DE REAÇÃO.

Forma da Biomassa	Tempo de reação (120 mg de acetofenona a 30°C/ 150 RPM)			
	24 h		48 h	
	Conversão (%)	ee_S (%)	Conversão (%)	ee_S (%)
Fita	55±4	79±2	70±3	79±2
<i>Pellet</i>	54±1	86,0±0,3	79±1	87± 1

FONTE: AUTOR.

Obs.: Condições de crescimento da biomassa antes da utilização: 144 h; 150 rpm; 30°C.

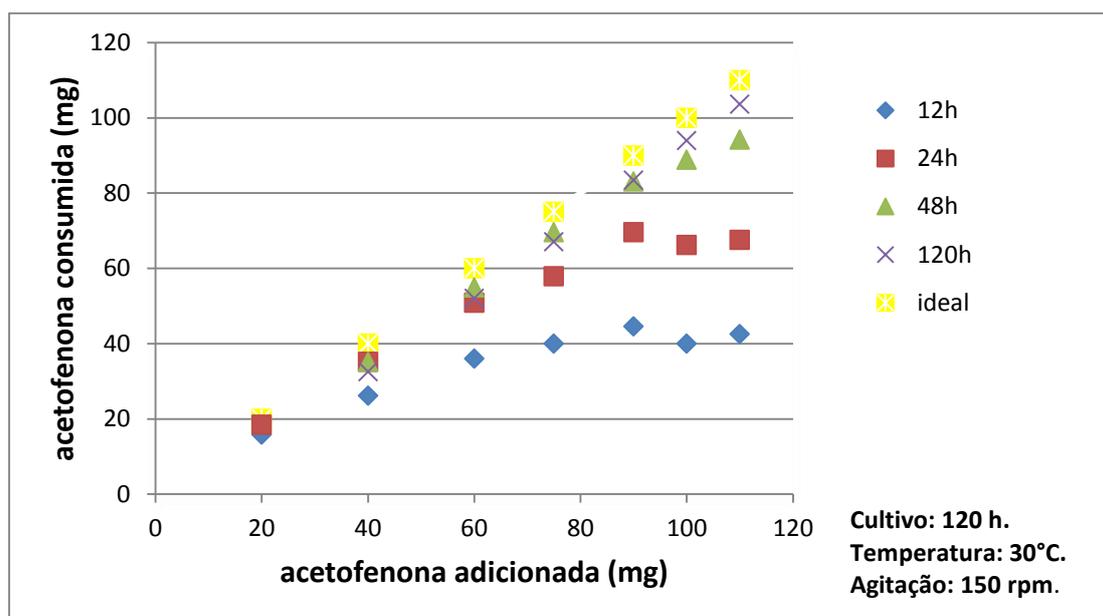
Os estudos sobre a influência do tempo de cultura no desempenho catalítico da biomassa mostraram que, a partir de 6 dias de crescimento, a biomassa de *Aspergillus terreus* atingiu a máxima seletividade (Figura 9) e, com 5-6 dias, a conversão tornou-se máxima (Figura 8). Deste modo, estes tempos de crescimento foram adotados na sequência das investigações experimentais. Para 5 dias de cultura, foram feitos ensaios simples (sem triplicata), para investigar o comportamento geral do sistema.

Da mesma maneira que nas investigações da influência do pH, cada ensaio foi realizado com 6 g de biomassa úmida. As quantidades de acetofenona variaram entre 20 mg e 110 mg. Os resultados encontram-se representados nas Figuras 11 e 12. Embora a biomassa úmida tenha sido a mesma (6,0 g) em todas as reações, foram registradas diferenças nos pesos secos. Em termos de massa seca, utilizou-se, em média, 184±6 mg de biocatalisador nas reações (triplicata) para redução de 20 mg de substrato. Nos outros 6 ensaios (sem triplicata), onde quantidades maiores de substrato foram empregadas, a biomassa seca foi, em média, 138±1 mg. A redução foi consequência da drenagem do excesso de água, após a lavagem do micélio, apesar de não ter sido igualmente eficiente nas duas preparações de biomassa. Embora o procedimento experimental seja eficiente na realização de uma série de reações com quantidades equivalentes de biomassa, a drenagem de água entre uma batelada e outra de biomassa lavada frequentemente resultou em variados teores de água remanescente.

Na Figura 11, foi mostrada a relação que se estabeleceu entre as quantidades de substrato adicionada e convertida (consumida), para 12 h, 24 h,

48 h e 120 h de reação. Quanto maior a massa de acetofenona inicialmente adicionada, mais os pontos experimentais afastaram-se da curva ideal (100% de conversão). Mas, com o passar do tempo, foi registrada a aproximação entre o real e o ideal. Para a adição inicial de até 40 mg de substrato, a aproximação ocorreu em, no máximo, 24 h de reação. Quando a quantidade inicialmente adicionada de substrato ficou na faixa entre 40 mg e 90 mg, a aproximação da linha ideal ocorreu em até 48 h. Com a adição de quantidades de substrato maiores que 90 mg, tempos maiores foram necessários para que a situação experimental (real) se aproximasse da curva ideal. Os dados tomados com 120 h de reação indicam a formação de uma reta experimental um pouco abaixo da reta ideal (conversão real  $\cong$  92%; conversão ideal = 100%).

FIGURA 11. MASSA DE SUBSTRATO CONSUMIDA EM FUNÇÃO DA MASSA DE ACETOFENONA ADICIONADA, PARA QUATRO TEMPOS DE REAÇÃO DE REDUÇÃO, COMPARADOS COM A SITUAÇÃO IDEAL.



FONTE: AUTOR.

Os pontos da série “12 h” revelam que, inicialmente, a quantidade de acetofenona consumida cresceu com o aumento na quantidade de acetofenona adicionada. Entretanto, a partir da adição de 75 mg, a quantidade consumida em 12 h de reação deixou de crescer, estabilizando-se num valor próximo a 40 mg. Esta estabilização indicou que a capacidade máxima de conversão para o sistema, em 12 h de reação, havia sido atingida. A velocidade máxima de conversão, nas primeiras 12 h, foi de aproximadamente 3,3 mg/h (40mg/12h) .

Para os resultados representados na série “12 h”, 75 mg foi a quantidade de substrato mais baixa e, ao mesmo tempo, suficiente para manter a máxima produtividade durante as primeiras 12 h. Nesta situação, a concentração de acetofenona, ao final das 12 h de reação era de 0,35g/L. Este valor pode servir como referência para estimar a concentração mínima de substrato, suficiente para atingir a velocidade máxima de reação neste sistema.

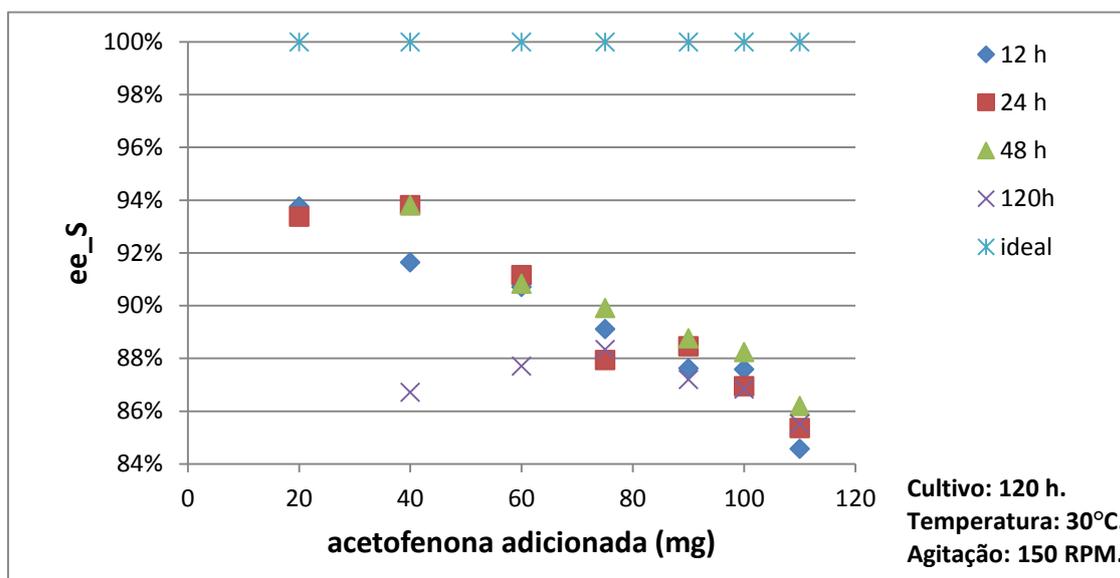
Para 24 h de reação, de acordo com raciocínio análogo ao empregado para a série “12 h”, a quantidade máxima de acetofenona processada foi de, aproximadamente, 68 mg, valor atingido quando a quantidade de acetofenona inicialmente adicionada foi, pelos menos, 90 mg. Assim, a concentração mínima de acetofenona necessária para manter o sistema em atividade máxima por 24 h não deve exceder 0,22 g/L. Quando em atividade máxima, nas primeiras 24 h, a velocidade média de conversão foi 2,8 mg/h (68 mg/24 h).

Considerando que, dos 68 mg processados em 24 h, aproximadamente 40 mg foram processados nas primeiras 12 h, uma forte queda na velocidade média de processamento máximo tornou-se evidente: velocidade média de processamento máximo nas primeiras 12 h  $\cong$  3,3 mg/h; velocidade média de processamento máximo nas 12 h seguintes  $\cong$  2,3 mg/h ([68 mg-40 mg]/12 h). Esta variação na capacidade máxima de reduzir acetofenona foi analisada quando variações na concentração de substrato deixaram de influenciar a velocidade média da reação. Sendo assim, a queda no limite do valor de processamento ficou relacionada a alterações no processo de atuação das enzimas, como por exemplo, uma diminuição na disponibilidade de cofatores enzimáticos.

Os resultados dispostos na Figura 12 indicam que a seletividade para formação de (S)1-feniletanol diminuiu em função da quantidade de acetofenona adicionada inicialmente. Para adição de até 40 mg, o excesso se manteve em cerca de 0,94 (94%). A partir de 40 mg, o excesso enantiomérico sofreu uma queda diretamente proporcional à quantidade adicionada de substrato, atingindo 0,86 (86%) para 110 mg de acetofenona inicialmente adicionados. O fator limitante da capacidade de processamento da acetofenona pelo sistema foi a redução do excesso enantiomérico no produto formado. Estabelecendo como

aceitável um excesso enantiomérico acima de 90%, a quantidade máxima de acetofenona permitida inicialmente seria de 60 mg, para que se obtivesse 92% de conversão em 48 h.

FIGURA 12. VARIAÇÃO DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ACETOFENONA ADICIONADA À BIOMASSA COM CINCO DIAS DE CULTIVO, PARA VÁRIOS TEMPOS DE REAÇÃO.



FONTE: AUTOR.

Na Figura 12, também pode ser avaliado o efeito do tempo de reação sobre o excesso enantiomérico no 1-feniletanol que se formou. Para até 48 h de reação, não houve alterações evidentes, mas análises feitas em 120 h mostraram forte queda no valor do excesso enantiomérico para 40 mg e 60 mg de acetofenona (o excesso enantiomérico, quando se adicionou 20 mg de substrato, foi monitorado somente nas primeiras 24 h). Para quantidades superiores a 60 mg de acetofenona, mesmo com 120 h de reação, não houve alterações evidentes no excesso enantiomérico.

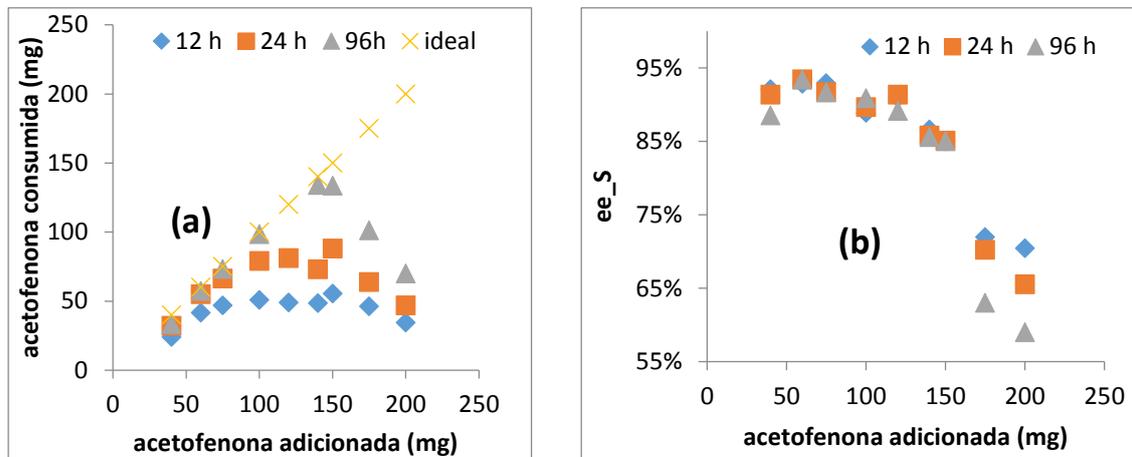
Segundo os resultados apresentados nas Figuras 8 e 9, a biomassa cultivada por 144 h (6 dias) foi a que apresentou o melhor desempenho como biocatalisador, quando se considera a combinação entre conversão e estereosseletividade na redução de acetofenona. Para este tempo de crescimento, foram feitas duas investigações, semelhantes ao estudo realizado para a biomassa com 120 h de crescimento. Na primeira investigação, foram utilizados nove ensaios simples (sem triplicata), cujos resultados encontram-se

nas Figuras 13a e 13b. Na segunda investigação, foram realizados seis ensaios em triplicata, cujos resultados encontram-se nas figuras 14, 15 e 16. Nas triplicatas, os desvios padrão foram, normalmente, inferiores a 5% dos valores das médias, quando a grandeza avaliada foi a conversão. Quando a grandeza avaliada foi o excesso enantiomérico, os desvios padrão ficaram normalmente próximos a 1% e sempre menores que 2%. Provavelmente, os baixos desvios foram consequência de se ter misturado as biomassas produzidas em frascos reagentes diferentes durante a lavagem, homogeneizando as propriedades. Aliado a esse fator, o emprego de quantidades similares de biomassa em cada teste catalítico também contribuiu para minimizar os desvios.

As Figuras 13a e 13b apresentam os resultados dos ensaios simples. A quantidade de biomassa empregada em cada reação, em termos de massa seca, foi  $(0,18 \pm 0,02)$  g, 38% maior que a quantidade média empregada nos testes anteriores. A capacidade máxima de processamento de acetofenona foi de aproximadamente 50 mg nas primeiras 12 h de reação, e de aproximadamente 80 mg nas primeiras 24 h. Estes valores são aproximadamente 18% maiores que aqueles determinados para a biomassa crescida durante 120 h.

O excesso de (S)1-feniletanol nos produtos foi mantido próximo a 90% (0,90), enquanto a quantidade inicialmente adicionada de acetofenona não ultrapassou 120 mg, mas sofreu queda acentuada, principalmente quando a quantidade de substrato adicionada atingiu 150 mg. Ao final de 120 h de contato do substrato com a biomassa, foram medidos os valores de pH. Todos ficaram na faixa entre 6-6,5, exceto nas reações onde as quantidades inicialmente adicionadas de acetofenona foram 40 mg, 150 mg e 200 mg. Nestes três ensaios, os valores de pH foram, respectivamente, 7,0; 7,4 e 7,5. Além disso, os meios reacionais ficaram turvos, ao contrário do que foi observado nos demais ensaios e, como pode ser verificado na Figura 13b, os excessos enantioméricos determinados com 96 h foram mais baixos que os respectivos valores determinados para 12 h e para 24 h de reação.

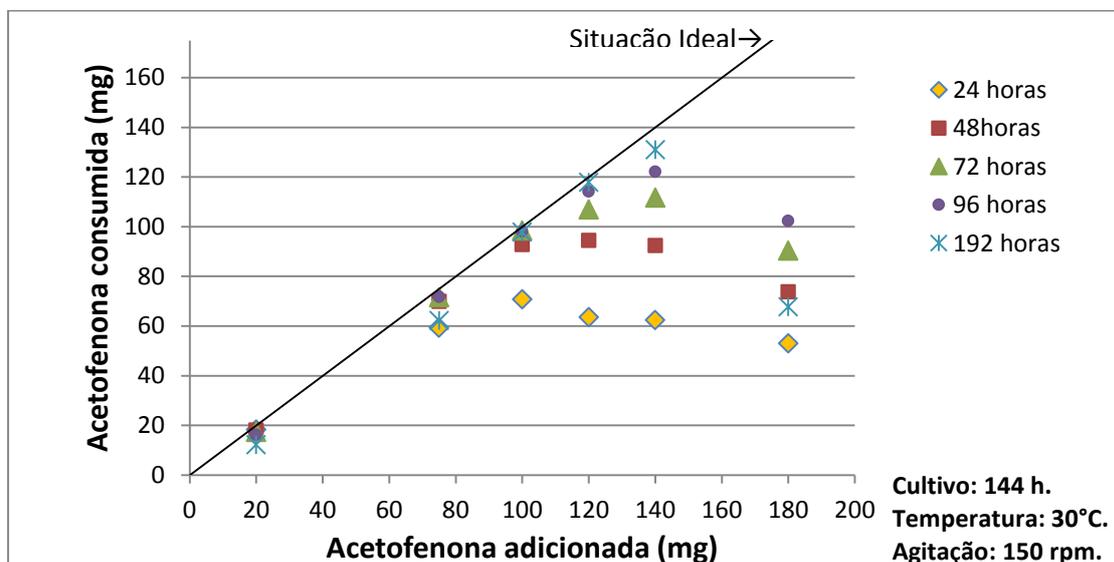
FIGURA 13. MASSA DE ACETOFENONA CONSUMIDA EM FUNÇÃO DA MASSA ADICIONADA, PARA TRÊS TEMPOS DE REAÇÃO E PARA UMA SITUAÇÃO IDEAL(A). EXCESSO ENANTIOMÉRICO NO PRODUTO DA REDUÇÃO DE ACETOFENONA CATALISADA POR BIOMASSA CRESCIDA DURANTE 144 H(B).



FONTE: AUTOR

Para a construção da Figura 14, foram analisadas 6 reações químicas, diferenciadas pela quantidade de substrato inicialmente adicionada. As quantidades consumidas de substrato, determinadas com 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 192 h de reação, foram colocadas como função das quantidades do material de partida. O comportamento revelado na figura mostra que o sistema apresentou duas situações onde a quantidade consumida de acetofenona não variou em função da quantidade adicionada: Para 24 h de reação, entre 75 mg e 140 mg de acetofenona adicionada inicialmente, a quantidade consumida ficou em torno de 60 mg. Para 48 h de reação, de 100 mg até 140 mg de acetofenona adicionada inicialmente, a quantidade consumida ficou em torno de 93 mg. Podemos estimar que este sistema, nas primeiras 24 h, processou no máximo 65 mg de acetofenona. Deste modo, a velocidade média de consumo máximo foi de 2,71 mg/h. Para 48 h de reação, o sistema processou, no máximo, 93 mg de acetofenona, ou seja, em média, 1,94 mg/h (entre 24 h e 48 h foram processados 35 mg, resultando numa velocidade média de 1,46 mg/h). Quando as reações partiram com 180 mg de acetofenona, houve consumo de 53 mg nas primeiras 24 h e de 74 mg nas primeiras 48 h, ou seja, houve queda na produtividade, indicando que o sistema catalítico foi inibido pelo excesso de substrato.

FIGURA 14. ACETOFENONA CONSUMIDA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE INICIALMENTE ADICIONADA, PARA CINCO TEMPOS DE REAÇÃO. A LINHA RETA CORRESPONDE À SITUAÇÃO DE CONVERSÃO IDEAL, ONDE TODO SUBSTRATO ADICIONADO É CONSUMIDO.



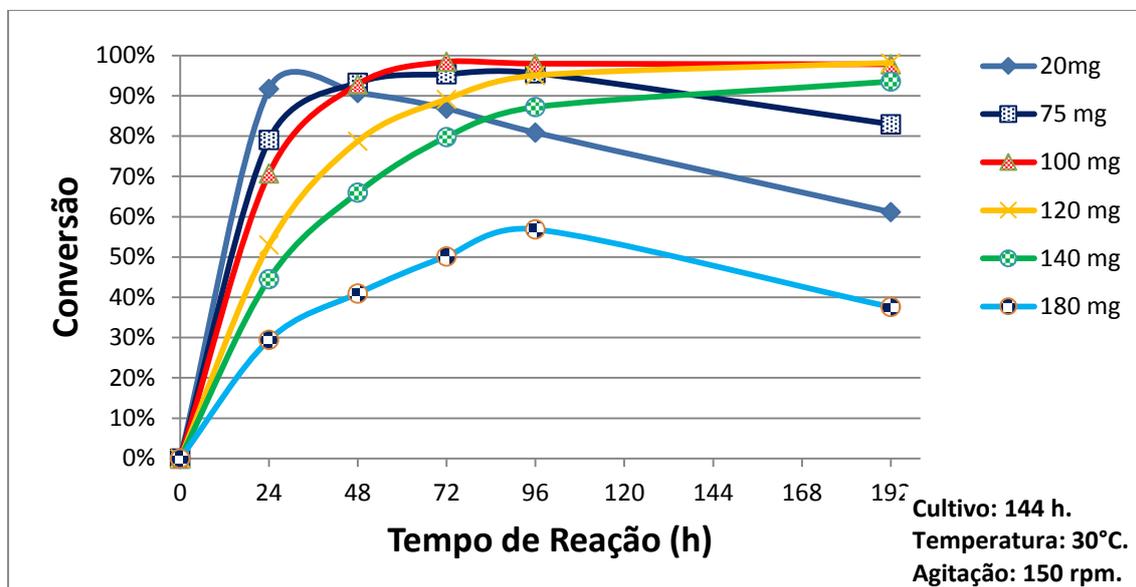
FONTE: AUTOR

Para 96 h de reação e adição de até 120 mg de acetofenona, ficou estabelecida uma relação quase ideal entre as quantidades consumida e adicionada de substrato. Quando se partiu com 140 mg, o desvio da condição ideal foi nítido e, mesmo quando o tempo foi dobrado, ou seja, mesmo com 192 h de reação, o desvio permaneceu facilmente visualizável. Com 180 mg de substrato, o sistema se distanciou muito do ideal e, neste caso, o aumento do tempo de reação incrementou o desvio. Dos 180 mg adicionados, 102 mg foram consumidos em 96 h de reação. Após 192 h, esse valor diminuiu para 68 mg, ou seja, houve reoxidação de parte do substrato. A reoxidação do substrato também foi observada quando foram empregadas quantidades menores ou iguais a 75 mg de acetofenona.

As situações onde houve reoxidação ficam evidentes na Figura 15, onde dados de conversão em função do tempo de reação estão dispostos em séries. Cada série corresponde a uma quantidade de acetofenona inicialmente adicionada. As quantidades de acetofenona inicialmente adicionadas variaram de 20 mg até 180 mg. Para valores intermediários, de 100 mg; até 140 mg, a conversão ou aumentou continuamente, ou se estabilizou num valor máximo.

Nos demais casos, a conversão passou por um valor máximo e voltou a cair, indicando reoxidação do substrato.

FIGURA 15. CONVERSÃO DE ACETOFENONA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO, PARA DIVERSAS QUANTIDADES INICIAIS DE ACETOFENONA COMO SUBSTRATO.



FONTE: AUTOR

Na Tabela 4, são apresentadas, para cinco momentos, as composições percentuais do sistema formado pelas reações em que se iniciou utilizando 20 mg de substrato. Após 24 h de reação, o percentual de (S) 1-feniletanol diminuiu e os percentuais de acetofenona e (R) 1-feniletanol aumentaram. A razão entre os percentuais de acetofenona (9,3%) e (R)1-feniletanol (2,1%) na composição do sistema, determinados com 48 h de reação, correspondeu aproximadamente a 4,5. Com 192 h, a razão tornou-se aproximadamente 6 (39%/6,3%). Ou seja, embora as concentrações destes dois componentes tenham aumentado neste intervalo de tempo, a de acetofenona teve crescimento proporcionalmente maior. Esta informação indica que o processo de reoxidação do substrato atingiu, mais efetivamente, o (S)-1-feniletanol, elevando a concentração de acetofenona e permitindo a formação de mais (R)-1-feniletanol. Estudos anteriores, com este mesmo fungo em crescimento (Capítulo 1), indicaram que a formação do (R)-1-feniletanol pode ocorrer numa reação mais lenta, provavelmente promovida por uma enzima específica que, de acordo com os resultados agora observados, não promoveu uma reoxidação significativa do enantiômero (R). Após atingir um máximo, a conversão também voltou a diminuir em função do tempo para 75 mg

e 180 mg de acetofenona adicionada. Para estes casos, é esperado um processo análogo ao discutido para 20 mg de substrato.

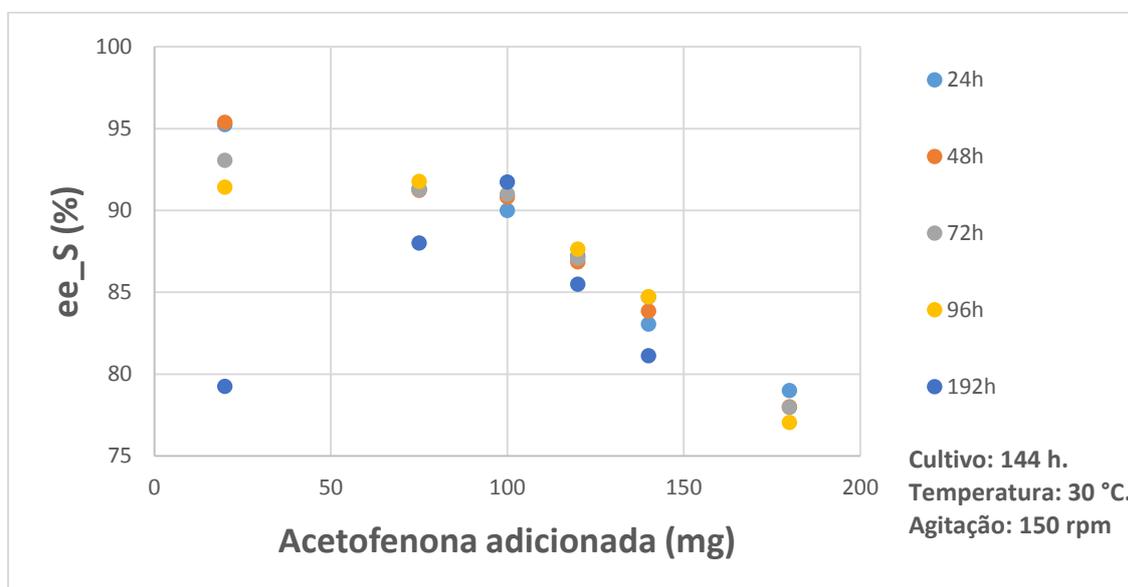
TABELA 4. COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DO SISTEMA PARA QUATRO TEMPOS DE REAÇÃO, PARA UMA QUANTIDADE INICIAL DE 20 MG DE ACETOFENONA.

Componentes	Composição (%) em função do tempo				
	24 h	48 h	72 h	96 h	192 h
(S)1-Feniletanol	89,5±2,6	88,6±2,1	83,8±1,4	77,4±1,2	55±4
(R)1-Feniletanol	2,2±0,2	2,1±0,2	3,0±0,2	3,4±0,3	6,3±0,2
Acetofenona	8,3±2,4	9,3±2,1	13,1±1,1	19,1±1,4	39±4

FONTE: AUTOR

A reoxidação dos produtos provoca uma diminuição do excesso enantiomérico de (S)1-feniletanol. Pois, além de reduzir o percentual deste enantiômero na composição do sistema, permite o aumento no percentual do enantiômero (R). A Figura 16 mostra a variação do excesso enantiomérico em função da quantidade inicialmente adicionada de acetofenona, e também em função do tempo de reação.

FIGURA 16. EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE (S)1-FENIL ETANOL EM FUNÇÃO DA MASSA INICIAL DE ACETOFENONA ADICIONADA EM DIFERENTES TEMPOS DE REAÇÃO.



FONTE: AUTOR.

Analisando inicialmente o efeito do tempo, verifica-se que, nas primeiras 48 h, não houve variação significativa no excesso enantiomérico, para qualquer quantidade de acetofenona considerada. Com 72 h de reação, para 20 mg de

acetofenona, registrou-se uma queda no valor do excesso enantiomérico, que passou de 95% para 93%. A diminuição continuou progressivamente, atingindo 91% com 96 h e 79% com 192 h de reação. A diminuição no excesso enantiomérico já era esperada nas situações em que houve reoxidação dos produtos, ou seja, quando se adicionou 20 mg; 75 mg e 180 mg de acetofenona inicialmente. Entretanto, foi observada a diminuição do excesso enantiomérico também em situações onde não foi notada a reoxidação, como quando se adicionaram 120 mg e 140 mg de substrato.

Na Tabela 5, são apresentados dados detalhados das composições dos sistemas em que as reações foram iniciadas com 120 mg e 140 mg de acetofenona. Nestes dois casos, as quantidades dos dois enantiômeros aumentaram continuamente, ou seja, não se verificou uma reoxidação efetiva. Entretanto, como havia muito substrato para ser processado, o tempo gasto foi muito grande.

TABELA 5. COMPOSIÇÕES PERCENTUAIS DOS SISTEMAS EM QUE SE ADICIONOU INICIALMENTE 120 mg E 140 mg DE ACETOFENONA, DETERMINADAS COM 72 h, 96 h E 192 h DE REAÇÃO.

T/h	Massa inicial de 120 mg			Massa inicial de 140 mg		
	Composição/ %			Composição/ %		
	Acetofenona	(R)1-feniletanol	(S)1-feniletanol	Acetofenona	(R)1-feniletanol	(S)1-feniletanol
72	10,8±0,6	5,8±0,3	83,4±0,9	20,2±4,4	6,1±0,1	73,7±4,4
96	4,9±1,1	5,9±0,5	89,2±1,3	12,8±3,5	6,7±0,4	80,6±3,8
192	1,8±1,6	7,1±1,0	91,1±2,5	6,4±7,3	8,7±1,3	84,8±8,3

FONTE: AUTOR.

Como já foi discutido, a biomassa foi perdendo a capacidade de processar o substrato dia após dia. Desse modo, as reduções tornaram-se muito lentas no final e, aparentemente, a redução na velocidade de formação de (S)1-feniletanol foi maior que a redução na velocidade de formação de (R)1-feniletanol, sendo essa a causa da queda do valor do excesso enantiomérico. Além disso, os dados da tabela indicam que o efeito de elevar a quantidade de substrato de 120 mg para 140 mg tornou as respostas da biomassa menos regulares, tanto em termos de conversão quanto em termos de estereosseletividade. Esta conclusão deve-se à comparação dos valores dos desvios padrão das grandezas registradas na

Tabela 5 onde os desvios para o sistema onde se utilizou 140 mg de substrato foram altos.

Além das variações provocadas em função do tempo, a quantidade de acetofenona inicialmente adicionada também provocou redução do excesso enantiomérico. Quantidades iniciais de substrato inferiores a 100 mg tendem a proporcionar valores mais elevados de excesso enantiomérico. Acima de 100 mg de substrato, registrou-se uma queda linear no valor do excesso enantiomérico, com coeficiente de correlação 0,99. Esse coeficiente foi calculado empregando-se valores de excessos enantioméricos médios, determinados para 72 h de reação e quantidades iniciais de substrato iguais a 100 mg, 120 mg, 140 mg e 180 mg.

Com a adição de 100 mg de acetofenona foram verificados os melhores resultados. A conversão foi  $98,4 \pm 0,1\%$ , o excesso de (S)1-fenil etanol foi  $91,3 \pm 0,9$  e, a partir de 72 h de reação, esses valores não sofreram alteração, ou seja, houve estabilidade. A adição inicial de acetofenona, em quantidades superiores a 100 mg, provocou redução do excesso enantiomérico de acordo com os resultados representados na Figura 15.

TABELA 6. BIOMASSA SECA APÓS 192 H DE REAÇÃO.

Acetofenona adicionada/mg	Massa seca média*	Desvio padrão da média
20	0,0860	$\pm 0,0080$
75	0,0835	$\pm 0,0144$
100	0,0888	$\pm 0,0011$
120	0,1183	$\pm 0,0006$
140	0,1229	$\pm 0,0042$
180	0,0816	$\pm 0,0007$

FONTE: AUTOR.

\*Biomassa cultivada 144 h a 30 °C e 150 rpm.

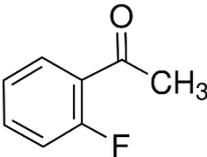
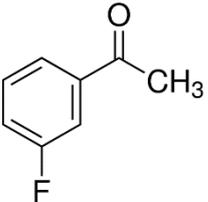
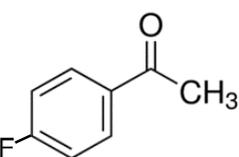
A Tabela 6 mostra as massas secas após 192 h de reação. Ao contrário do que foi registrado em estudos anteriores, não houve regularidade nos valores determinados. Provavelmente, durante o longo tempo de contato entre biomassa e substrato, ocorreu algum tipo de degradação do micélio, que resultou em redução do peso da biomassa seca. De qualquer forma, os resultados registrados na Figura 14, comparados aos registrados nas Figuras 11 e 13a, indicaram que a quantidade de biomassa utilizada neste último ensaio foi menor

que as quantidades utilizadas anteriormente. Talvez apenas por coincidência, mas foi observado que as reduções mais acentuadas na biomassa foram registradas nos ensaios onde houve reoxidação do substrato.

### 3.3 REAÇÕES COM DERIVADOS DE ACETOFENONA

A Tabela 7 mostra os resultados da redução de *orto*, *meta* e *para*-fluoracetofenona aos respectivos álcoois. A seletividade do fungo *A. terreus* como biocatalisador na redução de fluoracetofenonas foi menor que aquela apresentada pelo fungo em crescimento (Capítulo 1). Para 2'-fluoracetofenona ee\_S caiu de 99% para 95,4%. Com 3'-fluoracetofenona, o ee\_S passou de 98% para 97%. Com 4'-fluoracetofenona, ee\_S foi reduzido de 82% para 74% e, além disso, também houve queda na conversão, que passou de 95% para 86%.

TABELA 7. RESULTADOS REFERENTES ÀS REAÇÕES DE REDUÇÃO DE ORTO, META E P-FLUORACETOFENONA, CATALISADAS PELA BIOMASSA DE *A. TERREUS*.

Substrato			
Massa inicial	(21,6±3,3) mg	(22,9±2,8) mg	(20,2±3,0) mg
Conversão (24h)	(99,2±0,2)%	(97,7±0,2)%	(86±1)%
ee_S	(95,4±0,2)%	(96,9±0,2)%	(74,1±0,5)%
BS	(0,14±0,01) g	(0,14±0,00) g	(0,14±0,00) g

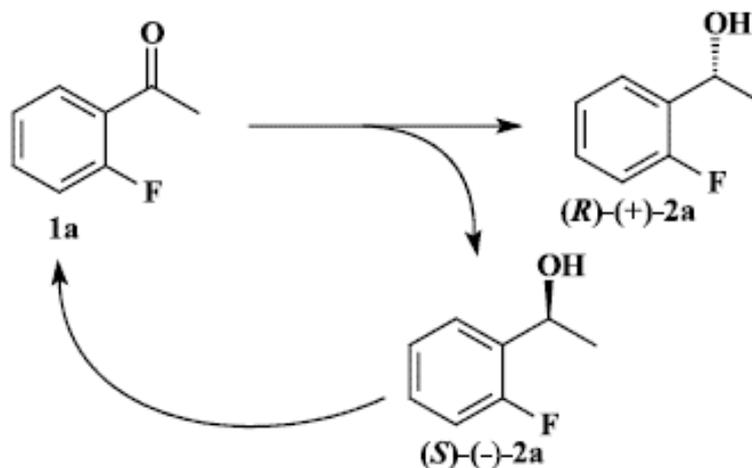
FONTE: AUTOR.

Condições de reação: Tempo: 24 h; Agitação: 150 rpm; Temperatura: 30°C.

A biomassa empregada nos testes com o fungo em crescimento (Capítulo 1), foram realizados com, aproximadamente, o triplo da biomassa utilizada nos testes com a biomassa em repouso, contribuindo para uma menor conversão. A presença de um grupo retirador de elétrons, como o fluoreto, na posição *para* do anel aromático, facilitou o ataque nucleofílico e redução do carbono da carbonila. A conversão relativamente baixa na presença do *p*-fluoreto, entretanto, pode indicar que o impedimento estérico e/ou eletrônico provocado por este substituinte dificultou significativamente a interação do substrato com o sítio enzimático, inibindo a redução e diminuindo a estereosseletividade.

Duas linhagens de *A. terreus* foram testadas como biocatalisadores, tanto na redução de fluoroacetofenonas, quanto na derracemização dos álcoois correspondentes (Comasseto, J. V. *et al.*, 2003). As reações foram conduzidas em condições muito semelhantes no que diz respeito à quantidade de biomassa, quantidade de substrato, temperatura e velocidade de agitação. Os tempos de crescimento das biomassas foram menores, entre 72 h e 96 h, e as reações foram conduzidas em 50 mL de tampão fosfato (pH e concentração não especificados). Os resultados foram bastante inferiores aos registrados na Tabela 6: Com 24 h de reação, a conversão máxima foi 58% e o excesso enantiomérico mais alto foi 67% (S), utilizando *o*-fluoroacetofenona como substrato. Após 17 dias de reação, o excesso enantiomérico mudou de (S) para 72% (R), com 98% de conversão. Para justificar a inversão da estereosseletividade, os autores sugeriram um esquema de reoxidação de (S) 1-feniletanol, reproduzido na Figura 17.

FIGURA 17. ESQUEMA PROPOSTO POR (COMASSETO, J. V. ET AL., 2003) PARA MUDANÇA NA ESTEREOSELETIVIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO.



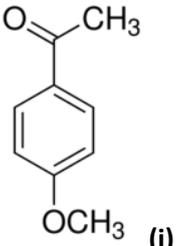
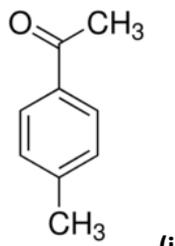
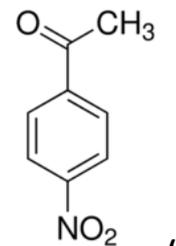
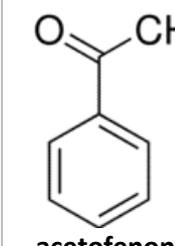
FONTE: COMASSETO, J.V. *ET AL.*, 2003

A adição de glicerol ao meio reacional proporcionou melhoras na conversão e na enantiosseletividade em reações de redução de diversas cetonas aromáticas, catalisadas por outra linhagem de *A. terreus* (Andrade, Piovan e Pasquini, 2009). Dentre os substratos avaliados, encontram-se as cetonas representadas na Tabela 7. Com 2'-fluoroacetofenona houve conversão

de 99% e ee\_S de 94%; com 3'-fluoracetofenona, conversão de 90% e ee\_S de 47% e, para 4'-fluoracetofenona, conversão de 58% e ee\_R de 61%. Ou seja, apesar das melhorias promovidas pelo co-solvente, os resultados não superaram os da Tabela 7.

Na Tabela 8, estão apresentados os resultados da redução de *p*-metoxiacetofenona, (i), *p*-metilacetofenona, (ii), *p*-nitroacetofenona, (iii) e da acetofenona. Quando foram utilizados como substrato os derivados (i) e (ii) da acetofenona, houve conversão mais baixa e, quando se utilizou o derivado (iii), a conversão tornou-se mais alta que a atingida na redução de acetofenona. Estes resultados são coerentes com a previsão teórica de que substituintes doadores de elétrons, quando nas posições *orto* e/ou *para*, dificultam ataques nucleofílicos à carbonila, da mesma forma que substituintes retiradores de elétrons facilitariam este ataque. A enantiosseletividade do biocatalisador, em relação àquela obtida com acetofenona, foi sensivelmente menor com o uso de substratos *p*-substituídos no anel aromático.

TABELA 8. RESULTADOS REFERENTES ÀS REAÇÕES DE REDUÇÃO DE ACETOFENONA E DE *p*-METOXIACETOFENONA, (I), *p*-METILACETOFENONA, (II), *p*-NITROACETOFENONA, (III) ACETOFENONA SUBSTITUÍDAS NA POSIÇÃO *PARA*, CATALISADAS PELA BIOMASSA DE *A. terreus*.

Substrato				
	(i)	(ii)	(iii)	acetofenona
<b>Massa inicial</b>	(20,1±0,2)mg	(21±2) mg	(20,5±0,2) mg	(22±3) mg
<b>Conversão</b>	(30±1) %	(67±2)%	(98±1)%	(94±1)%
<b>ee_s</b>	(75,6±0,5)%	(65±2)%	(60±1)%	(95,4±0,2)%
<b>BS</b>	(0,14±0,01)g	(0,14±0,01) g	(0,14±0,00) g	(0,14±0,01) g

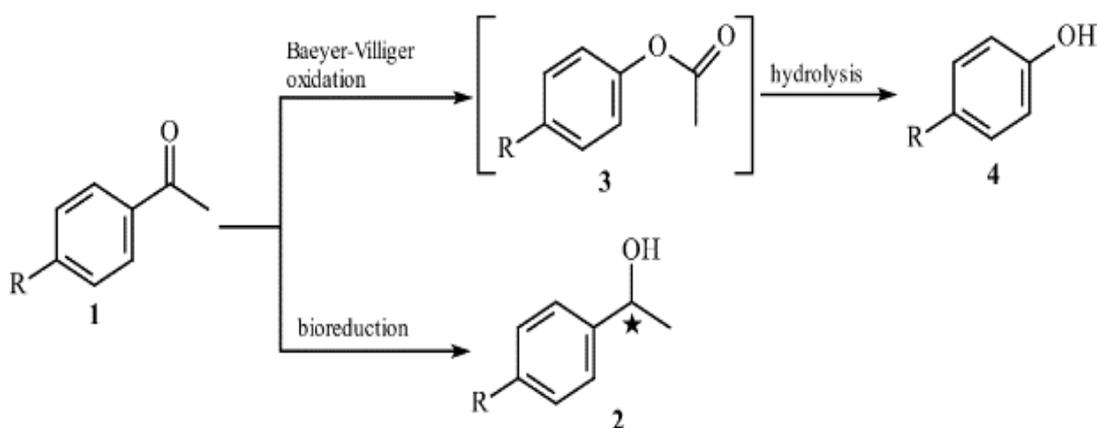
FONTE: AUTOR.

Condições de reação: Tempo: 24 h; Agitação: 150 rpm; Temperatura: 30°C.

Em relação aos ensaios promovidos com o fungo em crescimento (Capítulo 1), era esperada queda na conversão, em decorrência da menor quantidade de biocatalisador utilizada (semelhante ao ocorrido com as fluoracetofenonas). Esta queda foi observada quando os substratos possuíam grupos metil ou metoxi (desativadores da carbonila), e não foi notada com

acetofenona ou com *p*-nitroacetofenona, ou seja, nas reações mais rápidas. Com as células em crescimento, os valores de  $ee_S$  para os substratos (i), (ii), (iii) e acetofenona foram, respectivamente, 70%, 82%, 83% e 97%. Ou seja, de modo geral, a condução da reação com as células em suspensão tendeu a prejudicar a enantiosseletividade, principalmente com substratos *para* substituídos.

FIGURA 18. ESQUEMA PROPOSTO POR (ANDRADE *ET AL.*, 2004) REPRESENTANDO A COMPETIÇÃO ENTRE MONOOXIGENASES E REDUTASES.



FONTE: (ANDRADE *ET AL.*, 2004)

Nas publicações referentes à investigação da atividade de *A. terreus* na redução de acetofenona, como por exemplo (Comasseto, J. O. V. *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2004; Comasseto *et al.*, 2004), é registrada a ação de monooxigenases, que promovem a formação de produtos de adição de Bayer-Villegger que, por hidrólise, produzem fenóis (Figura 18). A ocorrência deste tipo de reação não foi observada neste estudo.

#### 4. CONCLUSÕES

A linhagem de *A. terreus* investigada, ao crescer em extrato de malte, deixa o pH do meio entre 4,5 e 5. A elevação do pH pelo uso de tampão fosfato prejudicou a atividade catalítica, tanto em termos de conversão quanto de enantiosseletividade.

O tempo de crescimento do micélio influenciou significativamente a atividade catalítica, principalmente a enantiosseletividade. As melhores propriedades foram obtidas com o micélio coletado a partir de 144 h de cultura, ou seja, a partir do momento em que o fungo entra em fase de crescimento estacionário.

A utilização de substrato numa concentração próxima à de saturação da biomassa produziu os melhores resultados de seletividade, conversão e estabilidade dos produtos no meio reacional. Abaixo da concentração de saturação, a resolução cinética torna-se importante e, acima da concentração de saturação, ocorre queda na enantiosseletividade.

O *A. terreus* selecionado apresentou propriedades catalíticas bastante diferenciadas daquelas relatadas na literatura, demonstrando a importância do isolamento e investigação de linhagens selvagens, mesmo quando a atividade catalítica já foi estudada para outros organismos da mesma espécie.

## 5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. H. et al. Asymmetric synthesis of arylselenoalcohols by means of the reduction of organoseleno acetophenones by whole fungal cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, n. 1-6, p. 47-54, 2004. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-2442450566&partnerID=40&md5=02114452fa043dc3cadf55eda6d3923a> >.

ANDRADE, L. H.; PIOVAN, L.; PASQUINI, M. D. Improving the enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*: the role of glycerol as a co-solvent. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, n. 13, p. 1521-1525, 2009. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67651124995&partnerID=40&md5=b839f7aad71996c12388bd9b0ddffd67> >.

ASSIS, L. F. et al. Deracemization of (RS)-1-[(4-methylselanyl)phenyl]ethanol and (RS)-1-[(4-ethylselanyl)phenyl]ethanol by strains of *Aspergillus terreus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 415-419, 2007. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-40749096469&partnerID=40&md5=ffb3033db1ae15a825ea9cd08879fb25> >.

BEHRENS, G. A. et al. Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2191-2215, 2011. ISSN 1615-4169. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201100446> >.

CASAS LÓPEZ, J. L. et al. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2-3, p. 270-277, 2003. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022903001303> >.

COMASSETO et al. Bioreduction of fluoroacetophenones by the fungi *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 6, p. 711-715, 2003. ISSN 0957-4166. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095741660300096X> >.

COMASSETO, J. O. V. et al. Deracemization of aryl ethanols and reduction of acetophenones by whole fungal cells of *Aspergillus terreus* CCT 4083, *A. terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT 4964. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, n. 1-6, p. 55-61, 6/21/ 2004. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138111770400075X> >.

COMASSETO, J. V. et al. Biotransformations of ortho-, meta- and para-aromatic nitrocompounds by strains of *Aspergillus terreus*: Reduction of ketones and deracemization of alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 24-30, 2006.

KEPPLER, A. F. et al. Enzymatic evaluation of different *Aspergillus* strains by biotransformation of cyclic ketones. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 7, p. 967-975, 2005. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-17844361937&partnerID=40&md5=a3a02bce7646973abdc017da7813b595> >.

LASS-FLORL, C. *Aspergillus terreus*: how inoculum size and host characteristics affect its virulence. In: (Ed.). **J Infect Dis**. United States, v.205, p.1192-4, 2012.. ISBN 1537-6613

PIOVAN, L. et al. Chemoselective screening for the reduction of a chiral functionalised ( $\pm$ )-2-(phenylthio)cyclohexanone by whole cells of Brazilian microorganisms. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 19, n. 20, p. 2385-2389, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-57049102843&partnerID=40&md5=b8dfd8c0de351ff6ff6c9337be92c28> >.

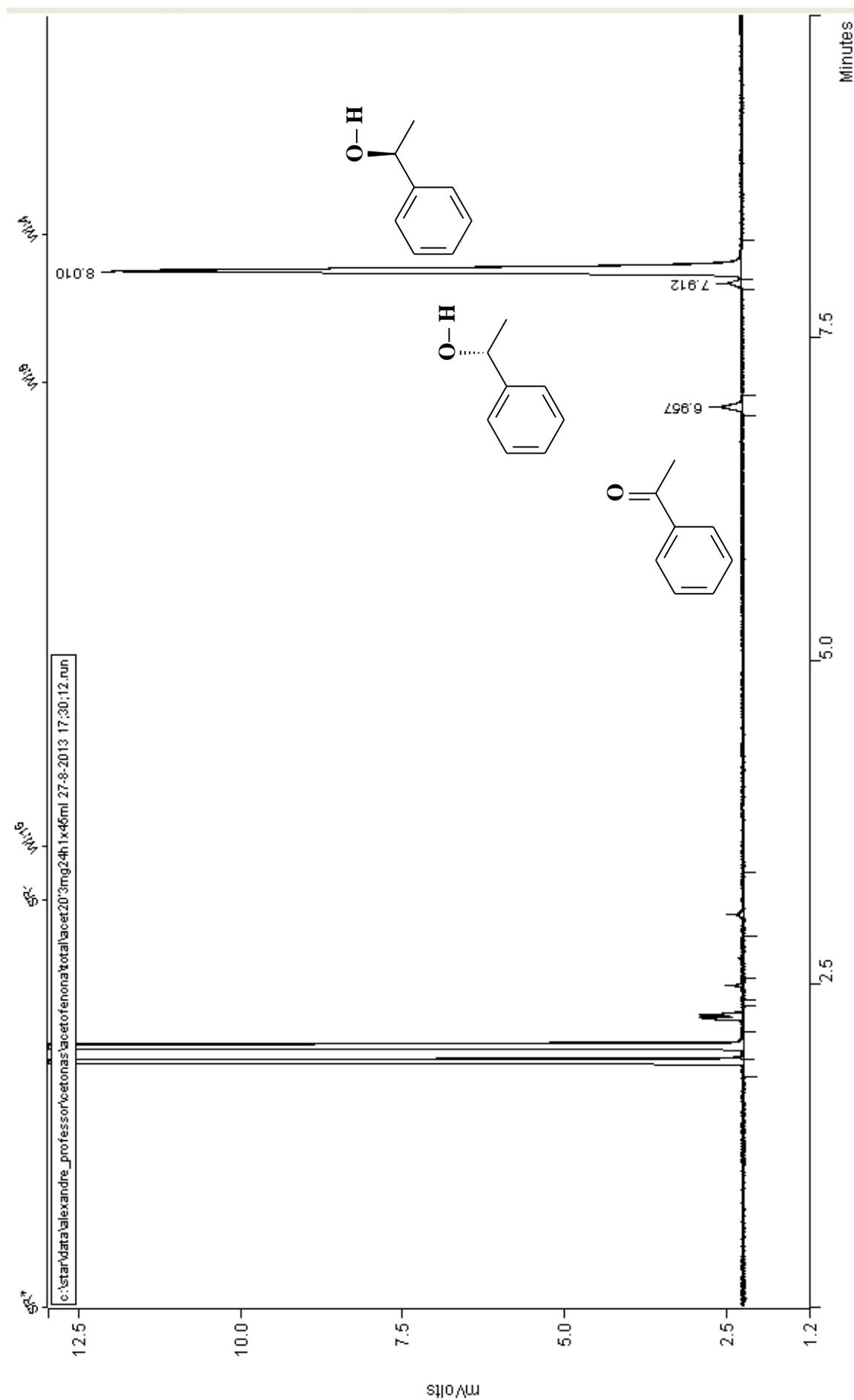
SAMSON, R. A. et al. New species in *Aspergillus* section Terrei. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 0, p. 39-55, 2011. ISSN 0166-0616. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614600579> >.

SLESIONA, S. et al. Murine infection models for *Aspergillus terreus* pulmonary aspergillosis reveal long-term persistence of conidia and liver degeneration. **J Infect Dis**, v. 205, n. 8, p. 1268-77, 2012. ISSN 0022-1899.

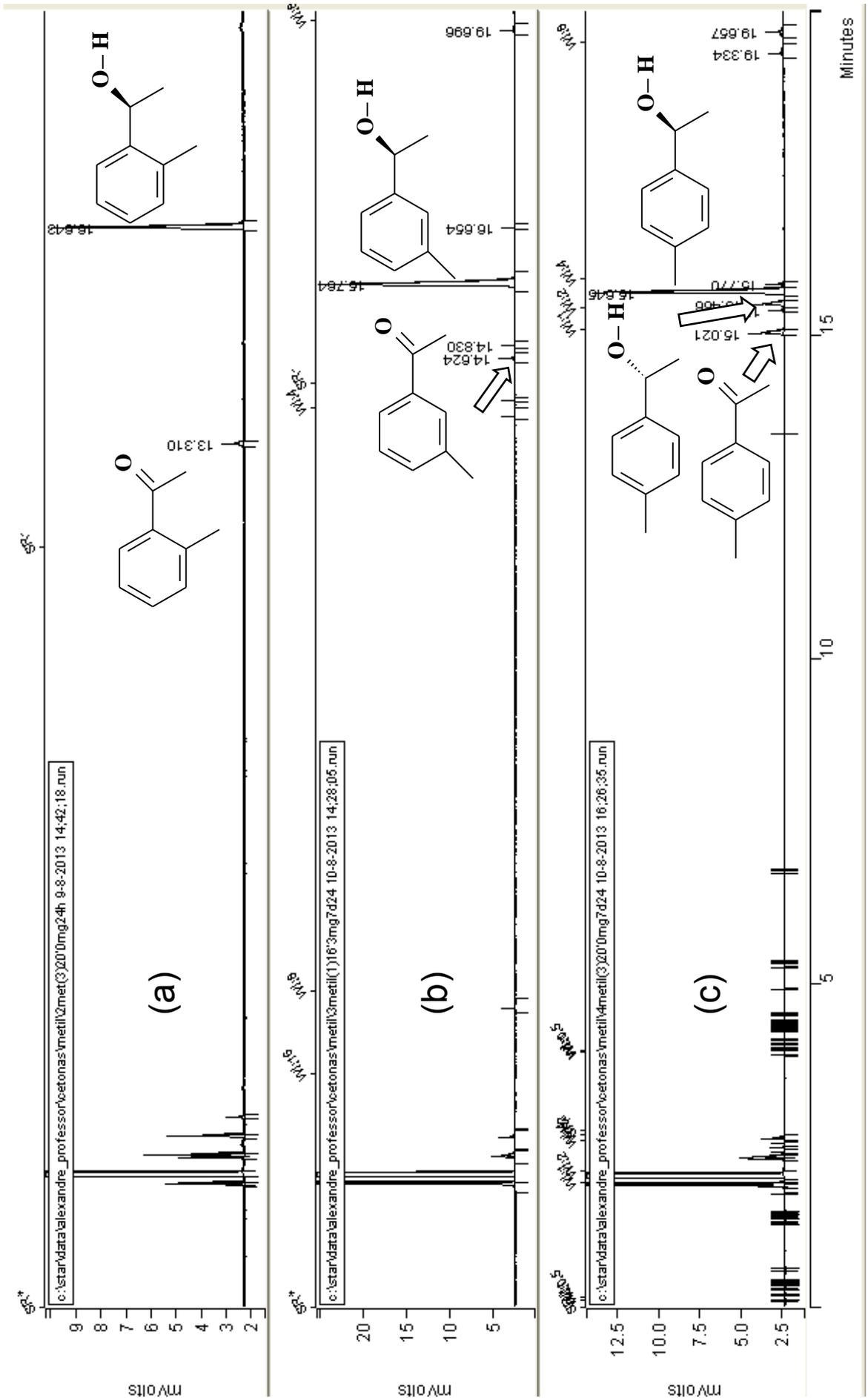
SOUZA, A. F. C. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A CHUMBO E CÁDMIO EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE RIZOSFERAS DE PLANTAS COLETADAS EM SANTO AMARO (BA)**. 2013 (*Mestrado*). Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

STEIGER, M. G. et al. Biochemistry of microbial itaconic acid production. **Front Microbiol**, v. 4, p. 23, 2013. ISSN 1664-302x.

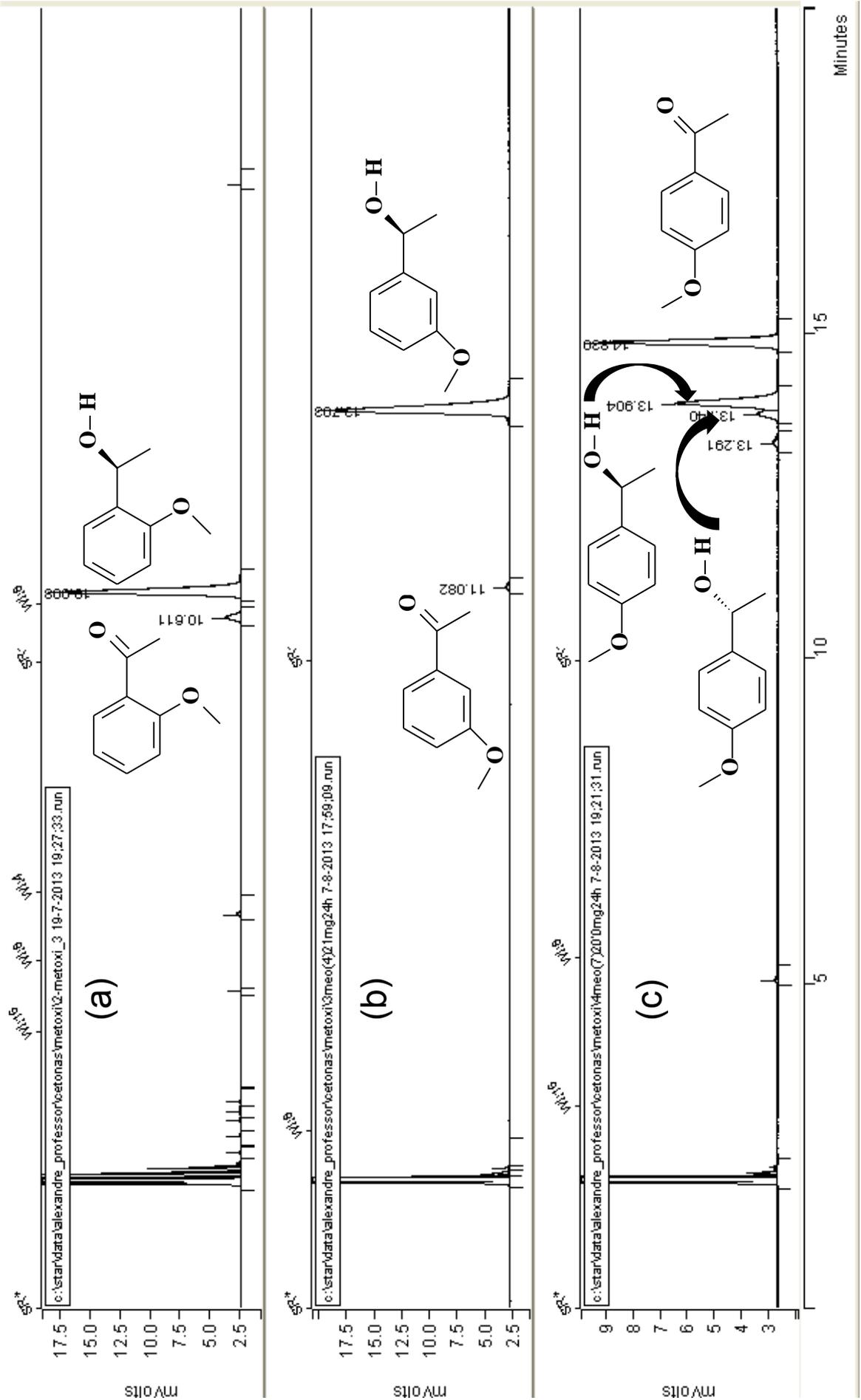
# ANEXO 1 – Cromatogramas dos produtos das reações de redução de acetofenona.



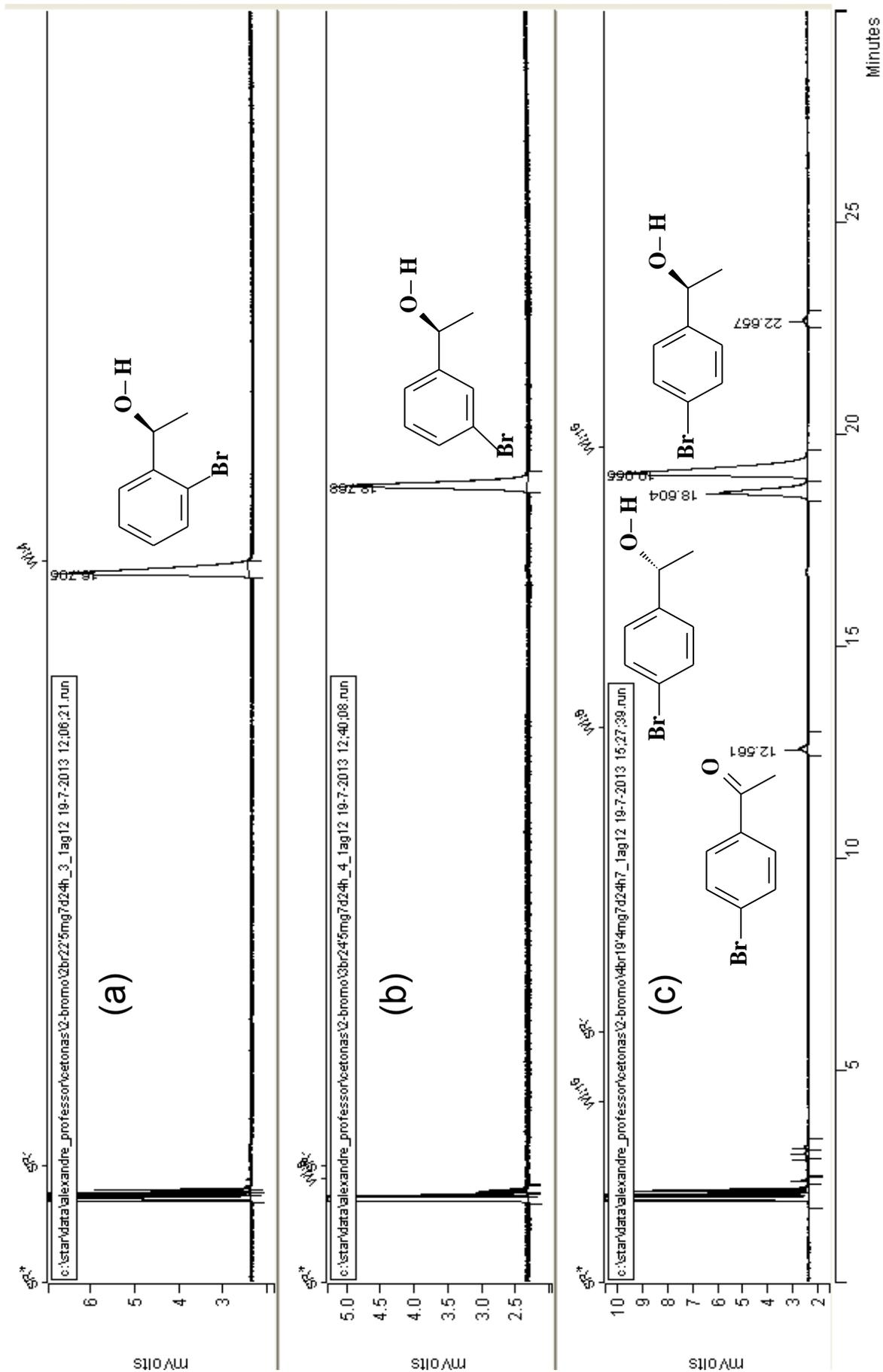
**ANEXO 2 – Cromatogramas dos produtos das reações de redução de metilacetofenonas.**



**ANEXO 3 – Cromatogramas dos produtos das reações de redução de metoxiacetofenonas.**



**ANEXO 4 – Cromatogramas dos produtos das reações de redução de bromoacetofenonas.**



**ANEXO 5 – Cromatogramas dos produtos das reações de redução de fluoroacetofenonas.**

