



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**JOSENEIDE ALVES DE MIRANDA**

**BIORREDUÇÃO DE ACETOFENONA POR  
MICRORGANISMOS DO ESTADO DA BAHIA.**

Feira de Santana, BA

2009

**JOSENEIDE ALVES DE MIRANDA**

**BIORREDUÇÃO DE ACETOFENONA POR  
MICROORGANISMOS DO ESTADO DA BAHIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese  
co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro  
co-orientador: Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto

Feira de Santana, BA

2009

## Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Miranda, Joseneide Alves de  
M643b Biorredução de acetofenona por microrganismos do Estado da  
Bahia / Joseneide Alves de Miranda. – Feira de Santana, 2009.  
62 f. : il.

Orientadora: Angélica Maria Lucchese  
Co-orientadores: Ana Paula Trovatti Uetanabaro  
Aristóteles Góes Neto

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)– Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de  
Santana, 2009.

1. Enzimas – Biotecnologia - Bahia. 2. *Saccharomyces cerevisiae* –  
Análise. 3. Leveduras. 4. Bactérias. 5. Fungos endofíticos.  
I. Lucchese, Angélica Maria, orient. II. Uetanabaro, Ana Paula Trovatti,  
co-orient. III. Góes Neto, Aristóteles, co-orient. IV. Universidade Estadual  
de Feira de Santana. V. Título.

CDU: 582.282.23(814.2)

*Aos*

*Meus pais, Neide e José, que fizeram do meu sonho o deles... sempre presentes em minha vida.*

*Ao*

*Meu grande amor João, companheiro e amigo, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão em todos os momentos.*

*DEDICO*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e permitir-me mais essa vitória. Obrigada Pai!

A minha orientadora Profa. Dra. Angélica Lucchese meu sincero agradecimento pela amizade, ensinamento, confiança e principalmente o exemplo de profissionalismo e ética. É uma honra desenvolver mais um trabalho sob sua orientação e fazer parte de seu grupo de pesquisa. Muito obrigada!

Aos co-orientadores Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto e a Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro pela colaboração e valiosas sugestões.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) pelo apoio acadêmico.

Ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) pelo apoio ao projeto e pela disponibilidade das suas instalações.

Aos colegas do LAPRON: Euder, Fernanda, Renata, Maiara, Mateus, Sérly..são tantos!

Aos amigos Edna Dória, Fabrício, Carlos Eduardo e Alice pela incansável contribuição na execução das atividades, convívio divertido e companheirismo; fica aqui registrado a minha admiração e respeito por esses profissionais.

Aos amigos e colegas do LAPEM: Jaqueline Carvalho, Ritinha, Suzana, Carla, Bruno, Cleber e João. Obrigada pela contribuição indispensável!

Ao secretário do PPGBiotec, Helton, pela pronta disposição.

Aos meus pais, muito obrigada pela paciência e compreensão pela minha ausência. O meu eterno agradecimento por decidirem viver o meu sonho.

Ao meu companheiro, João, por acompanhar a minha luta esses dois anos e compreender a importância deste trabalho para mim. você é o grande incentivador desta realização. Obrigada meu amor!

À cada um que fez parte desta história!

*"Pondo de lado todo o impedimento... corramos com  
perseverança a carreira que nos está proposta."  
(Hebreus, 12:1.)*

## RESUMO

A Biorredução tem grande importância na produção de substâncias opticamente puras, sendo amplamente utilizada para sínteses assimétricas. As bioconversões ocorrem com alta especificidade e eficiência por serem catalisadas por enzimas, formando um dos isômeros a partir de um substrato pró-quiral. O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial redutor dos microrganismos (leveduras, bactérias e fungos) isolados no território baiano frente ao substrato carbonílico acetofenona; verificando a conversão do substrato (acetofenona) em álcool quiral e identificando o excesso enantiomérico com que as reações biocatalíticas ocorreram. Foram utilizadas culturas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em cachaçarias do estado da Bahia, rizobactérias isoladas no sul da Bahia e fungos endofíticos. Foi testada a ação desses microrganismos sobre o substrato acetofenona. Os produtos foram analisados por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, para verificar a conversão do substrato em álcool; o excesso enantiomérico foi obtido em cromatógrafo gasoso equipado com coluna quiral obtendo-se separação para os isômeros da acetofenona com um excesso enantiomérico de até 100%, para a cepa bacteriana I68. Os fungos CDC026 e CDC086 converteram a acetofenona em (R)-álcool, as demais cepas que apresentaram resultados positivos para acetofenona produziram o (S)-álcool em excesso. Conclui-se que em geral os microrganismos testados apresentaram boa capacidade de redução da acetofenona em experimentos de biotransformação, constituindo-se fontes de compostos enantiomericamente puros.

**Palavras-chave:** Biorredução, leveduras, bactérias, fungos endofíticos, excesso enantiomérico.

## ABSTRACT

The biorreduction has great importance in the production of optically pure substances and is widely used for asymmetric synthesis. Bioconversions occur with high specificity and efficiency because they are catalyzed by enzymes, forming one of the isomers from a pro-chiral substrate. This work had as main objective to evaluate the potential reduction of micro-organisms (yeasts, bacteria and fungi) isolated in the state of Bahia using as carbonyl substrate the acetophenone, analyzing its conversion into alcohol and identifying the enantiomeric excess produced. Strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from sugar cane brandy distilleries of Bahia state, rhizobacteria isolated from *Arachis pintoi* (forage peanut) in southern Bahia and endophytic fungi isolated *Hevea brasiliensis*. The products were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry to verify the conversion of the substrate in alcohol and enantiomeric excess was determined by gas chromatography with chiral stationary phase. Of the 28 microorganisms evaluated 18 acted as biocatalysts. Products of reduction of acetophenone were obtained with yields between 6 and 79% and enantiomeric excess from 41 to 100%. Fungi CDC026, CDC086 and MDF077 converted acetophenone into (R)-alcohol, with ee of 54, 56, and 84%, while the other strains that showed positive results for acetophenone yielded the (S)-alcohol. Whereas 64% of test organisms were able to act as catalysts in the enantioselective reduction of acetophenone, it was observed that the microbial diversity of the state of Bahia is a source of new catalysts for the production of enantiomeric pure compounds.

**Keywords:** Bioreduction, yeasts, rhizobacterias, endophytic fungi, enantiomeric excess.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Setores que utilizam biocatálise.
- Figura 2:** Diagramas de energia comparativos de uma reação não catalisada
- Figura 3:** Regra de Prelog para a redução assimétrica de cetonas.
- Figura 4:** Estrutura do Cofator Nicotinamina adenina dinucleotídeo.
- Figura 5:** Esquema de redução de compostos carbonílicos por desidrogenases
- Figura 6:** Forma de utilização dos biocatalisadores em processos indústrias
- Figura 7:** Redução quiral de cetona pró-quiral gerando par diastereoisomérico de álcoois
- Figura 8:** Síntese de fluoxetina utilizando a levedura *S. cerevisiae*
- Figura 9:** Síntese de L-carnitina utilizando a levedura *S. cerevisiae*
- Figura 10:** Bioedução de 4-tert-butilciclohexanona (1) e a 4-metilciclohexanona (2) por *S. rubidaea*.
- Figura 11:** Redução biocatalítica de heteroaril metil cetonas
- Figura 12:** Redução biocatalítica de 1-acetonaftona em (1S)-(-)-naftiletanol
- Figura 13:** Bioedução de cetonas proquirais aromáticas utilizando *L. strigellus*
- Figura 14:** Fluxograma de bioredução.
- Figura 15:** Cronogramas obtidos por CGMS, para reações de redução química da acetofenona: (A) acetofenona; (B) álcool racêmico.
- Figura 16:** Cronograma obtidos por CG equipado com coluna quiral, para reação de redução química da acetofenona com borohidreto de sódio
- Figura 17:** Reação de redução de uma cetona pelo tetrahidretoborato.
- Figura 18:** Testes de redução da acetofenona por *Daucus carota* L.
- Figura 19:** Cronograma obtidos por CG equipado com coluna quiral, para reações de redução da acetofenona obtendo álcool quiral com configuração (S) por síntese com *Daucus carota* L.
- Figura 20:** Controles de contaminantes dos testes de bioredução.
- Figura 21:** Cronograma obtidos por CGMS, para reações de bioredução utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figura 22:** Cronogramas obtidos por CG equipado com coluna quiral, para reações de redução da acetofenona realizadas por leveduras
- Figura 23:** Biorreduções de cetonas em presença de grupos retiradores de elétrons
- Figura 24:** Controles de contaminantes dos testes de bioredução para bactérias.
- Figura 25:** Cronograma obtidos por CGMS, para reações de bioredução utilizando bactérias

- Figura 26:** Cronogramas obtidos por CG equipado com coluna quirál, para reações de redução da acetofenona realizadas por bactérias
- Figura 27:** Cronograma da co-injeção da amostra de biorredução de I68 e álcool racêmico sintetizado.
- Figura 28:** Testes de biorredução para fungos endofíticos.
- Figura 29:** Cronogramas obtidos por CGMS, para reações de biorredução utilizando fungos endofíticos
- Figura 30:** Cronogramas obtidos por CG equipado com coluna quirál, para reações de redução da acetofenona realizadas por fungos endofíticos

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Classificação das enzimas
- Tabela 2:** Vantagens e desvantagens das reações com enzimas isoladas e com células de microrganismos.
- Tabela 3:** Redução de cetonas aromáticas por *Rhodotorula* sp. AS2.2241
- Tabela 4:** Leveduras utilizadas nos testes de biorredução
- Tabela 5:** Bactérias utilizadas nos testes de biorredução
- Tabela 6:** Fungos endofíticos e identificação das variedades de *H. brasiliensis* de onde foram isolados.
- Tabela 7:** Quantidades trabalhadas nos testes de biorredução.
- Tabela 8:** Redução de Acetofenona por isolados de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Tabela 9:** Redução de Acetofenona por isolados de bactérias.
- Tabela 10:** Redução de Acetofenona por fungos endofíticos.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem	°C	Graus centígrados
µL	Microlitros	pH	Potencial hidrogeniônico
h	Hora		
M	Molar	<i>rpm</i>	Rotações por minuto
min	Minutos	seg	Segundos
mL	Militros	UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
mm	Milímetros		
mM	Milimolar	YMA	<i>Yeast Mannitol Agar</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada		
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida		
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada		
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida		
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear		
<b>T</b>	Temperatura		

**SUMÁRIO**

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	BIOCATÁLISE	16
2.2	ÁLCOOIS QUIRAIS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	SUBSTRATO	33
3.2	MICROORGANISMOS	33
3.3	REATIVAÇÃO E CULTIVO DOS MICROORGANISMOS	36
3.4	REDUÇÃO VIA QUÍMICA DO SUBSTRATO REAGENTE: ACETOFENONA	36
3.5	REDUÇÃO DA ACETOFENONA POR <i>DAUCUS CAROTA L.</i> (CENOURA)	37
3.6	PROCEDIMENTOS GERAIS PARA AS BIOTRANSFORMAÇÕES	38
4	DISCUSSÃO	41
4.1	REDUÇÃO VIA QUÍMICA DO SUBSTRATO ACETOFENONA	41
4.2	REDUÇÃO DA ACETOFENONA POR <i>DAUCUS CAROTA L.</i> (CENOURA)	42
4.3	LEVEDURAS	43
4.4	BACTÉRIAS	47
4.5	FUNGOS	51
5	CONCLUSÕES	54
6	RESULTADOS	55
	REFERÊNCIAS	
	APÊNDICE	
	ANEXO	



## 1 INTRODUÇÃO

As transformações de compostos através do metabolismo dos seres vivos são denominadas de biocatálise, sendo a utilização de enzimas (presentes nos microrganismos) como biocatalisadores de reações químicas, o fundamento básico da biocatálise.

O potencial biocatalítico dos microrganismos frente a substratos orgânicos vêm tendo ampla aplicação na química orgânica moderna, especialmente devido ao crescente interesse da indústria de química fina (Farmacêutica e Agroquímica), na estereosseletividade da redução dos compostos pró-quirais e, conseqüentemente, em seu grande potencial de aplicação na síntese de compostos enantiomericamente puros (ELIEL; WILEN; MANDER, 1994). A biocatálise é uma ferramenta sintética de grande importância, uma vez que indústrias, farmacêuticas e agroquímicas, requerem processos de otimização contínua (BORGES, 2008).

O procedimento de biocatálise mais comumente utilizado é feito através de células totais de microrganismos cultivados em meios apropriados, onde toda a maquinária enzimática está disponível, o que pode gerar uma mistura de produtos biotransformados (BEATRIZ, LIMA e MARQUES, 2005). Células íntegras de microrganismos apresentam uma grande diversidade de enzimas capazes de catalisar um grande número de reações químicas (BARBIERI et al., 2001).

Os microrganismos compreendem uma enorme diversidade em espécies e, apesar das inúmeras aplicações biológicas reportadas na literatura (NEWMAN; GRAGG; SNADER, 2000; BUTLER, 2004; CHIN et al., 2006; GALM; SHEN, 2007; LAM, 2007), o potencial biocatalítico dos microrganismos isolados no território nacional é pouco explorado dentro do contexto da transformação de compostos não naturais (PORTO, 2006), deixando o campo aberto para a pesquisa de estudos de biocatálise direcionados à síntese orgânica.

Alguns microrganismos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é extensivamente estudada, devido principalmente a fácil disponibilidade, baixo custo, fácil manipulação, não ser patogênico e poder trabalhar à temperatura ambiente (BARALDI, 2004).

Segundo Harvey (2000) a contínua necessidade de novos compostos protótipos para ensaios contra um número crescente de alvos moleculares, faz com que a diversidade química dos produtos naturais seja relevante na descoberta futura

de fármacos. Microrganismos constituem uma fonte excepcionalmente rica de importantes fármacos, a exemplo de antibióticos, agentes redutores do colesterol (estatinas), antidepressivos (fluoxetina), entre outros (DEMAIN, 1999; NEWMAN; GRAGG; SNADER, 2000; PEREIRA, 1997).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial redutor dos microrganismos (leveduras, bactérias e fungos) isolados no território baiano frente ao substrato carbonílico acetofenona, determinando a conversão deste substrato no álcool correspondente e a enantiosseletividade dos catalisadores avaliados. Assim, esse estudo visa contribuir para evidenciar a importância dos microrganismos em processos de bioprospecção, assim como em experimentos de biotransformação.

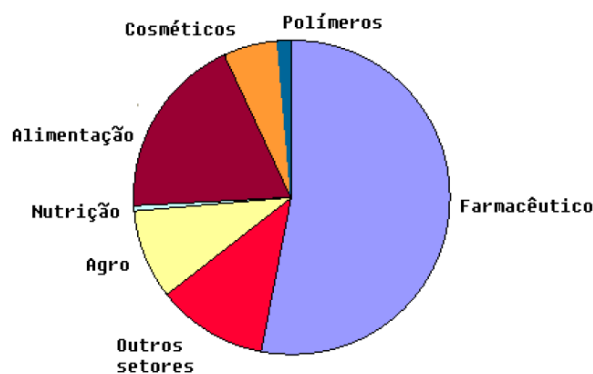


## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 BIOCATÁLISE

A biocatálise está relacionada às transformações de compostos através do metabolismo dos seres vivos. Desde os primórdios da humanidade, os povos utilizavam processos fermentativos na fabricação de pães, de bebidas alcoólicas e de laticínios (MORAN, 2001; VIEIRA, 2006). Foi Pasteur em 1862 que estabeleceu as bases científicas da utilização de microrganismo ao conseguir a oxidação do etanol a ácido acético usando cultura pura de *Bacterium xylinum* (RODRIGUES, 2001). Dumas em 1874 pela primeira vez observou a ação redutora da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, adicionando enxofre pulverizado a uma suspensão fresca de fermento biológico em solução de açúcar, constatando o desprendimento de sulfeto de hidrogênio (RODRIGUES, 2001).

Por transformações enzimáticas ou microbianas de substratos pode-se obter muitos compostos enantiomericamente puros, que são de grande importância para a indústria farmacêutica e de química fina (MILAGRE, 2005). Nas últimas décadas cresceu a exigência de compostos enantiomericamente puros, especialmente na área de fármacos quirais (Figura 1), levando a uma expansão de pesquisas na área de biocatálise (WENDHAUSEN, 1998).



**Figura 1:** Setores que utilizam biocatálise.

**Fonte:** STAATHORF et al, 2002.

Atualmente, fármacos somente podem ser comercializados na sua forma racêmica se comprovado que ambos enantiômeros possuem atividade farmacológica ou que o enantiômero farmacologicamente inativo seja inócuo à saúde (PERLES, 2006). Como exemplo, de biocatálise, pode-se citar a síntese enantiosseletiva do (S)-ibuprofeno, um composto usado como analgésico e antiinflamatório não esteroidal, a partir do extrato enzimático do fungo *Aspergillus niger* (CLEIJ et al (1999) apud PERLES (2006)).

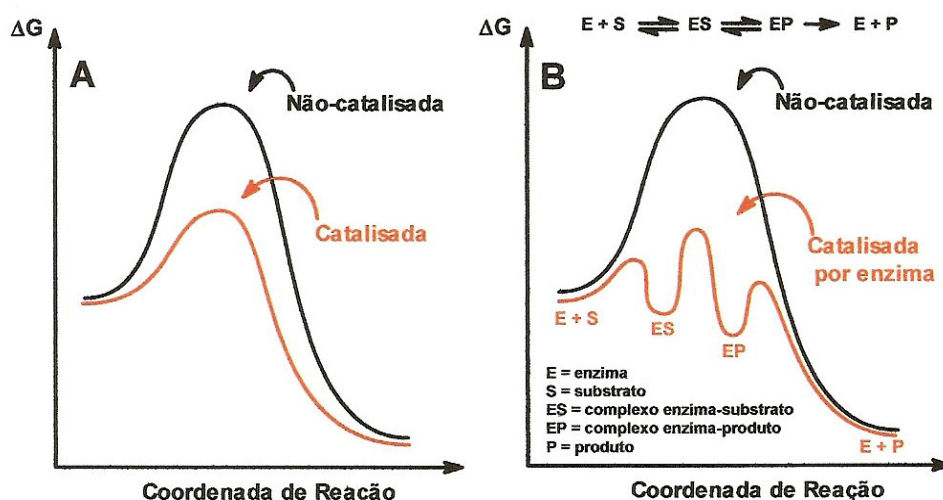
Na última década os biocatalisadores (células inteiras e/ou enzimas isoladas) tiveram ampla aplicação como agentes seletivos para a solução de problemas sintéticos da química orgânica (MORAN, 2001). As bioconversões ocorrem com alta especificidade e eficiência por serem catalisadas por enzimas. A forma espacial como o substrato se liga à enzima, determina a formação de um estereoisômero como único produto (TRAMPER, 1996). Stinson (1994) relata que os estudos científicos das biotransformações servem como um suporte para sínteses químicas, ou seja, para condensações, degradações ou resoluções racêmicas de compostos naturais ou sintéticos. Assim considerando que a química orgânica moderna está predominantemente fundamentada em métodos sintéticos altamente seletivos, especialmente os enantiosseletivos, os quais dependem de reagentes e/ou catalisadores quirais (ELIEL; WILEN; MANDER, 1994), a biocatálise é uma ferramenta sintética de grande importância .

Biotransformações utilizando enzimas isoladas ou células inteiras de organismos vivos (microrganismos e plantas) têm sido aplicadas em diversos processos industriais e a busca de novos biocatalisadores é uma das áreas que mais cresceu nas últimas décadas (FABER, 2004).

Além de sua importância como metodologia sintética, segundo Desantis e Jones (1999) a biocatálise é uma alternativa viável em síntese orgânica para a química dita ecologicamente correta principalmente devido ao controle ambiental. Salomon e Wendhausen (2007) ressaltam que a produção biotecnológica de produtos químicos por biocatálise é geralmente um processo limpo sem a formação de subprodutos, o que diminui o impacto ambiental provocados pelos muitos poluentes gerados em processos químicos convencionais. Assim, a biocatálise vem

se mostrando como uma tecnologia competitiva e não agressiva ao meio ambiente para produção de substâncias bioativas com alto grau de pureza enantiomérica (VIEIRA, 2006).

Embora os biocatalisadores possam ser utilizados a partir de células inteiras de animais, vegetais e microrganismos (PIOVAN, 2007) as enzimas presentes nestas células é que são os catalisadores capazes de promoverem as reações químicas. As enzimas são proteínas responsáveis pela química da vida, nada é transformado, produzido ou degradado sem a interferência destes biopolímeros (PORTO, 2002). Segundo Lehninger (2000) a maioria das enzimas são proteínas e sua ação está associada a um sítio ativo ou a um ponto para “prender” substratos através de forças intermoleculares o que confere a estas proteínas alta especificidade catalítica por seus substratos. Em reações catalisadas por enzimas, essas aumentam a velocidade e diminuem a energia de ativação das reações, Figura 2.



**Figura 2:** Diagramas de energia comparativos de uma reação não catalisada: (A) uma reação catalisada por catalisador químico; (B) uma reação catalisada por uma enzima.

Fonte: PIOVAN, 2007

Com a utilização de enzimas os passos sintéticos de proteção e desproteção de grupos funcionais (comuns em etapas sintéticas) podem ser omitidos, e sem a necessidade de utilização de altas temperaturas e pressões comumente utilizadas em reações de síntese orgânica tradicional (PIOVAN, 2007).

As reações catalisadas por enzimas são vantajosas, em especial, com relação à versatilidade. A grande diversidade de processos metabólicos, condições brandas de reações (condições essas que evitam a decomposição de substratos), natureza régio, químic e enantiosseletiva, assim como número não limitado de microrganismos, fonte de novas enzimas, são alguns privilégios evidentes em sínteses orgânicas (PORTO, 2002; FABER, 2004; ISHIGE; HONDA; SHIMIZU, 2005 apud PIOVAN, 2007; VIEIRA, 2006).

A maioria das enzimas são nomeadas adicionando-se o sufixo “ase” ao nome do substrato ou função química relacionada a reação catalisada por esta. As enzimas são classificadas e divididas, pela Enzyme Commission – EC da União Internacional de Bioquímica (IUB), em seis classes de acordo com a reação catalisada (CABRAL, 2003). O resumo da classificação de enzimas pode ser analisado na Tabela 1.

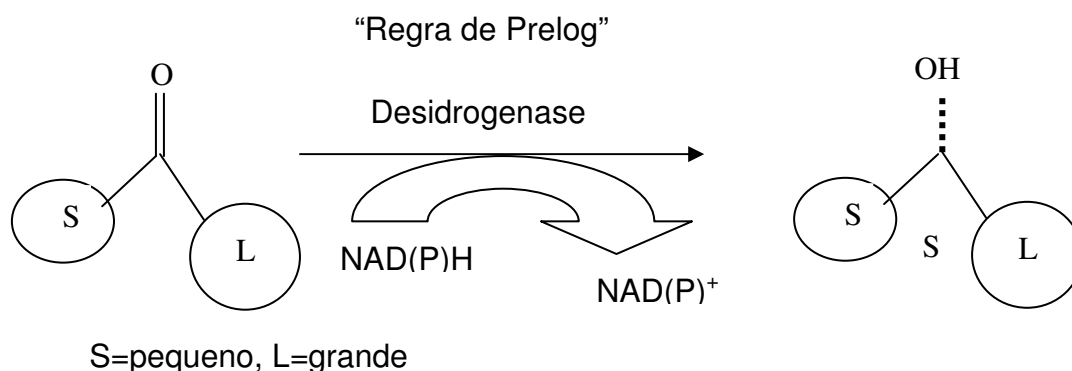
**Tabela 1:** Classificação das enzimas.

<b>CLASSE</b>	<b>REAÇÕES QUE CATALISAM</b>	<b>EXEMPLOS</b>
<b>Oxidoredutases</b>	Catalisam reações de transferencia de elétrons (reações de Oxi-redução)	Desidrogenases Oxidases
<b>Transferases</b>	Catalisam reações de transferencia de grupos funcionais (aldeído, cetona, carboxila, acila, etc.)	
<b>Hidrolases</b>	Catalisam reações de hidrólise	
<b>Liases</b>	Catalisam reações de remoção ou fixação de grupos químicos envolvendo ligações C=C, =N e C=O de forma não hidrolítica	Dehidratases Descarboxilases
<b>Isomerases</b>	Catalisam diversos tipos de isomerização (incluindo a racemização).	
<b>Ligases</b>	catalisam reações de formação e novas moléculas a partir de duas já existentes	Síntetases, que produzem a formação C-O, C-S e C-N

Para exercerem sua atividade catalítica, algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico além de seus resíduos de aminoácidos. Outras, entretanto, requerem componentes químicos adicionais denominados cofatores, que podem ser um íon inorgânico ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) ou uma molécula orgânica complexa, denominada de coenzima. Algumas enzimas para exercerem sua atividade biocatalítica requerem ambos, coenzima e íon metálico (PORTO, 2002).

As enzimas álcool desidrogenases são responsáveis pela redução estereosseletiva de compostos carbonílicos e derivados (WONG; WHITESIDES, 1994), dando origem a alcoois quirais secundários (FABER, 2004).

Durante a reação, a enzima fornece o hidreto, preferencialmente a partir da face pseudo *si*- ou pseudo *re*- da cetona originando (*R*)- ou (*S*)-alcoois, respectivamente. Para a maioria dos casos, o curso estereoquímico da reação, é essencialmente dependente dos requisitos estéricos do substrato, podendo ser previsto no modelo simples, geralmente referido como “Regra de Prelog” (Figura 3).

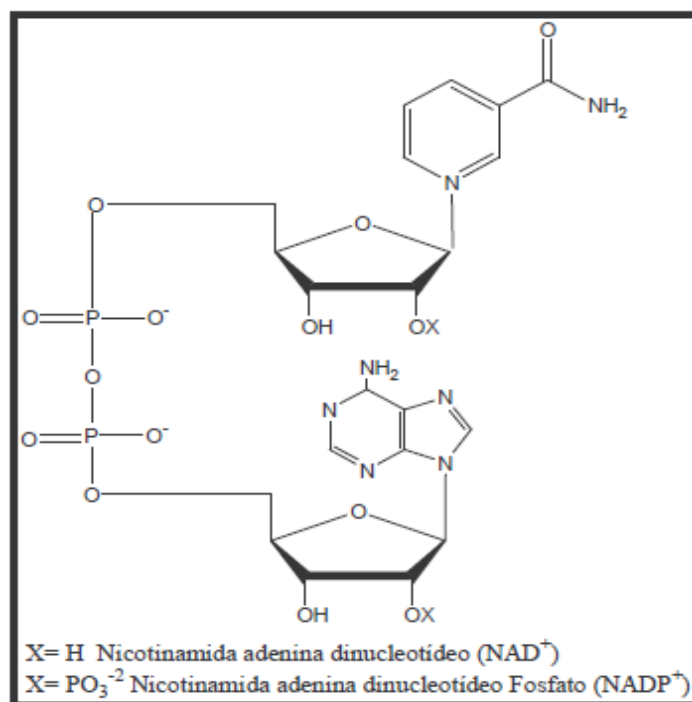


**Figura 3:** Regra de Prelog para a redução assimétrica de cetonas.

**Fonte:** FABER, 2004.

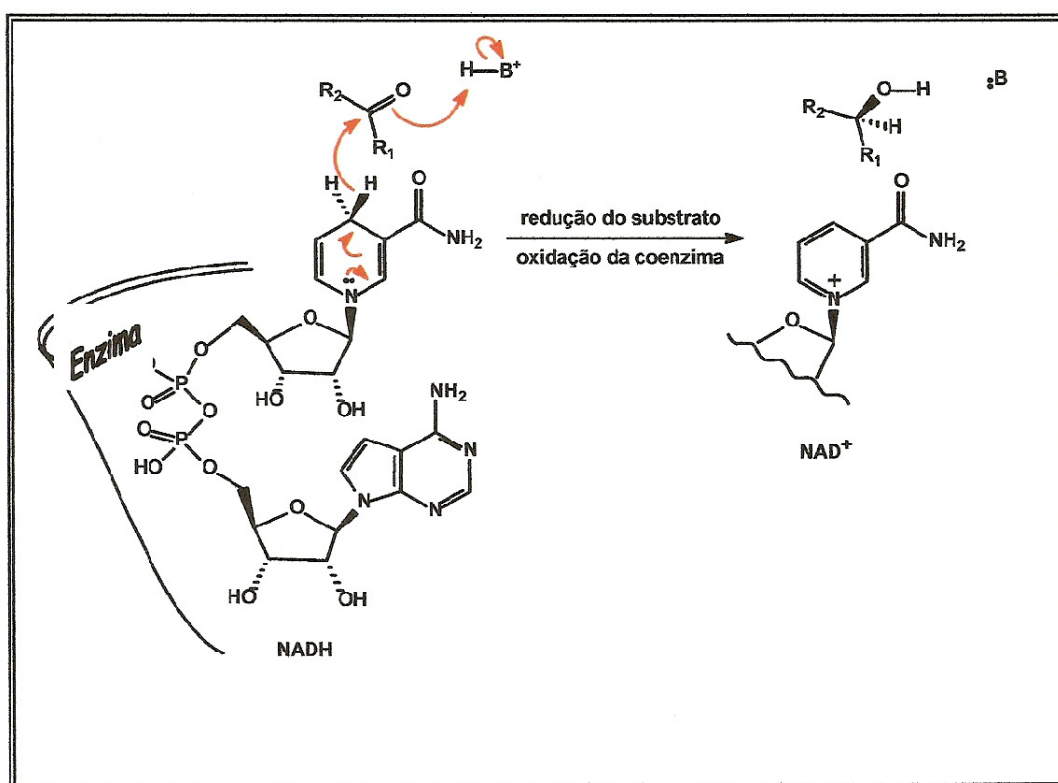
As desidrogenases são enzimas dependentes da coenzima, o dinucleotídeo de adenosina e nicotinamida ( $\text{NAD}^+$ ), representado na figura 4, que é responsável pela adição do hidreto à carbonila, com alta estereoespecificidade. O  $\text{NAD}^+$  é o principal receptor de elétrons nas reações de oxidação de moléculas. Em reações de oxido-redução ocorre uma transferência reversível de elétrons para a base pirimídica - a nicotinamida (PORTO, 2002). O esquema de redução de compostos carbonílicos por desidrogenases está esquematizado na Figura 5.

O cofator possui dois hidrogênios diastereotópicos com a mesma capacidade de serem transferidos. A estrutura da enzima implica no processo e, portanto, sua ligação ao substrato, determinando o hidrogênio a ser transferido a uma determinada face do substrato (WENDHAUSEN, 1998).



**Figura 4:** Estrutura do Cofator Nicotinamina adenina dinucleotídeo.

Fonte: WENDHAUSEN, 1998.



**Figura 5:** Esquema de redução de compostos carbonílicos por desidrogenases

Fonte: PIOVAN, 2007

Em escalas preparativas o uso de cofatores (NADH), muitas vezes inviabiliza o uso das enzimas desidrogenases isoladas. Assim, uma alternativa mais acessível é o uso de microrganismos, que já possuem em seu metabolismo desidrogenases capazes de aceitar substratos não naturais (substâncias que não fazem parte do seu metabolismo) e coenzimas necessárias para que o sistema redox de reações possa ocorrer, assim como os caminhos metabólicos para que ocorra a sua regeneração (NAKAMURA et al., 1991).

As células integras como catalisadores podem ser empregadas na forma de células livres ou imobilizadas em suporte adequado, assim como diferentes metodologias para obtenção destas células podem ser empregadas, segundo Porto (2002), tais como:

- células em crescimento, onde os substratos e a inoculação são adicionados simultaneamente ao meio de cultura ou os substratos são adicionados durante a fase de crescimento do microrganismo;
- células em repouso, o microrganismo é cultivado até seu crescimento e posteriormente a biomassa é filtrada e centrifugada e ressuspensa em solução tampão para adição do substrato.

Segundo Faber (2004) o uso de células íntegras pode apresentar algumas desvantagens, pois é necessário que o substrato ultrapasse a parede celular já que muitas das enzimas estão localizadas dentro das células, o que pode diminuir o rendimento, uma vez que o produto poderá ficar retido ou mesmo sofrer novas reações dentro da célula. A grande quantidade de biomassa presente na reação, pode ocasionar excreção de metabólitos do próprio organismo para o meio reacional, dificultando o isolamento e a purificação do produto. A toxicidade do substrato frente aos microrganismos e diferentes comportamentos desses frente ao mesmo substrato (devido a presença de inúmeras enzimas) também constituem fatores negativos (PIOVAN, 2007).

Cada uma dessas metodologias de forma de aplicação dos biocatalisadores apresenta vantagens e desvantagens, conforme sumariado na Tabela 2, devendo esta escolha ser individualmente analisada (FABER, 2004).

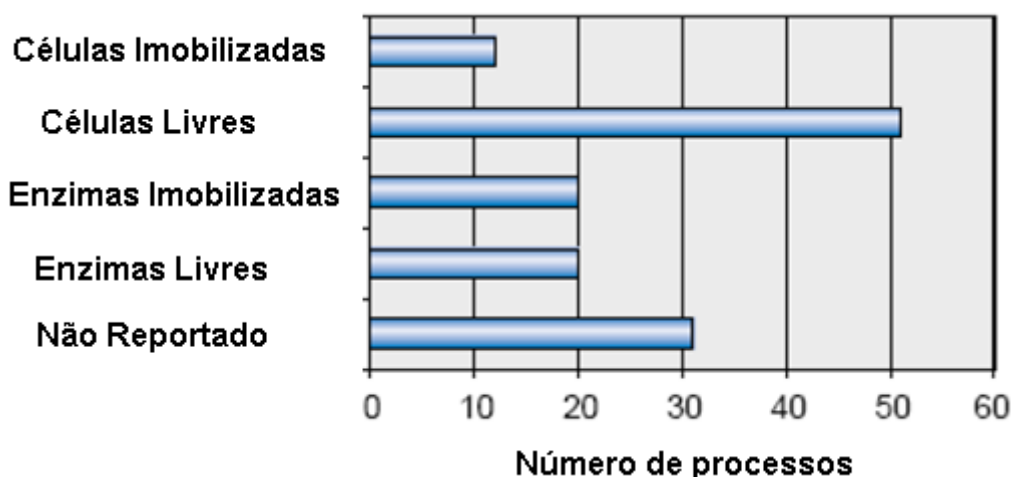


**Tabela 2:** Vantagens e desvantagens das reações com enzimas isoladas e com células de microrganismos.

<b>Enzimas isoladas</b>		
<b>Tipo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Geral	Aparelhagem simples, melhor produtividade, maior tolerância de concentração	É necessário reciclar o cofator
Suspensas em meio aquoso	Alta atividade enzimática	Parte das reações são realizadas, substratos lipofílicos são insolúveis
<b>Células integras</b>		
Geral	Não é necessário reciclar o cofator, dificuldade de isolamento dos produtos	Equipamento caro, baixa produtividade, baixa tolerância a solventes orgânicos, subprodutos e presença de metabólitos
Células em crescimento	Alta atividade enzimática	Grande quantidade de biomassa, mais subprodutos
Células em repouso	Facilidade para realizar, menos subprodutos	Baixa atividade enzimática
Células imobilizadas	As células podem ser reutilizadas	Baixa atividade enzimática

**Fonte:** FABER, 2004.

Entretanto, segundo Staathorf (2002), em processos industriais a principal forma de utilização desses biocatalisadores ainda é como células livres, conforme demonstrado na Figura 6.



**Figura 6:** Forma de utilização dos biocatalisadores em processos industriais  
**Fonte:** STAATHORF, 2002.

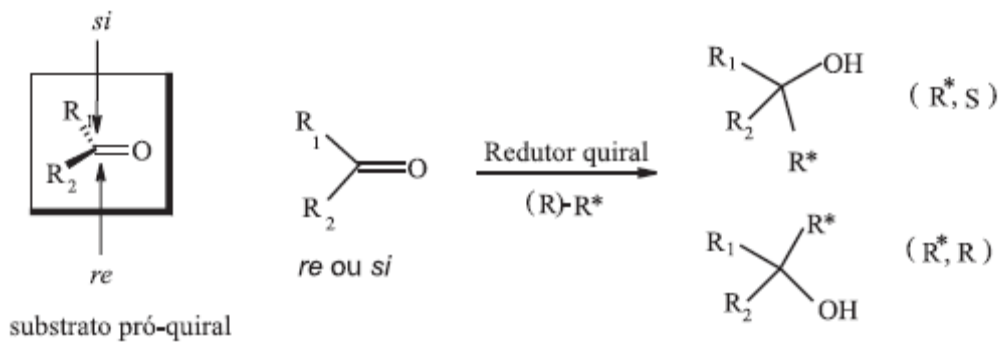
## 2.2 ÁLCOOIS QUIRAIS

Dentre os precursores ou intermediários quirais importantes na síntese de diversos compostos quirais de importância biológica estão os álcoois, a exemplo do (*S*)-(-)-citronelol, utilizado na síntese da milbemicina  $\beta$ 3 (BARRETT, 1986), e o (*R*)-(+)-citronelol, empregado na síntese da proxifomina (TAPOLCZAY, 1985). Álcoois quirais são de grande importância na indústria de química fina, como a indústria farmacêutica, onde a pureza dos enantiômeros é essencial. No entanto, usualmente não são muito conhecidos como precursores quirais naturais, apesar de serem precursores importantes, podendo servir como intermediários ou como blocos de construção quirais (“chiral building blocks”), na síntese de vários compostos de interesse biológico (PINHEIRO; FERREIRA, 1998; HAGE et al, 2001).

O grande interesse nesta área de pesquisa não está simplesmente na redução do substrato, mas principalmente na estereosseletividade da redução destes compostos pró-quirais e, conseqüentemente, em seu grande potencial de aplicação na síntese de compostos farmacêuticos, que em sua maioria possui centros quirais cuja configuração, geralmente precisa ser definida (PEREIRA; DURÁN, 1997). O aspecto mais importante para a obtenção destes compostos quirais é o controle estereoquímico, essencial para uma boa síntese enantiosseletiva e que possui uma influência nas considerações estratégicas, incluindo a escolha de uma rota em particular. A eficiência da síntese assimétrica, ou o grau de seletividade na obtenção preferencial de um dos enantiômeros, é geralmente avaliada em termos

de excesso enantiomérico (e.e.), definido por  $(R - S)/(R + S) \times 100$ , onde  $R$  e  $S$  são as quantidades relativas dos enantiômeros  $R$  e  $S$  (TEMBA, 2003).

Temba (2003) ressalta, que a preparação de álcoois quirais pode ser efetuada por vias sintéticas complexas, porém sua obtenção pode ser de modo mais simples e prático como a reação de um composto carbonílico pró-quiral  $R_1COR_2$  com um agente redutor quiral ( $R^*$ ). Essa reação pode originar indução assimétrica, uma vez que as duas faces (*re* e *si*) do plano das cetonas pró-quirais são enantiotópicas e no estado de transição podem formar intermediários diastereotópicos, conduzindo à obtenção de um dos enantiômeros preferencialmente (ELIEL; WILE; MANDER, 1994; TEMBA, 2003). A figura 7 demonstra tal reação.

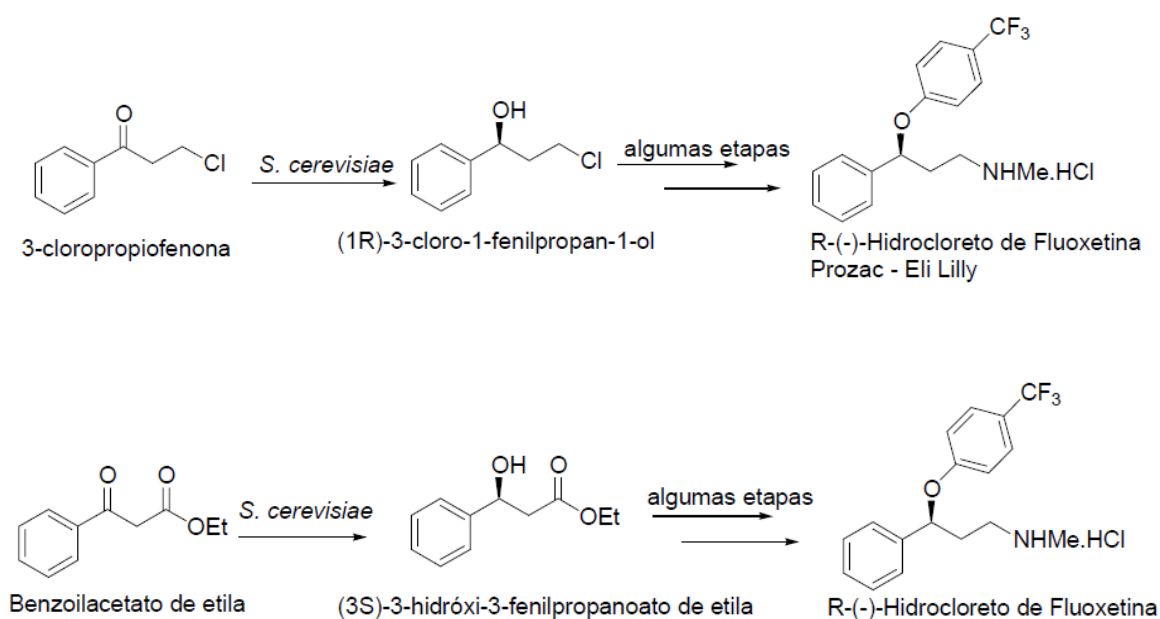


**Figura 7:** Redução quiral de cetona pró-quiral gerando par diastereoisomérico de álcoois

**Fonte:** TEMBA, 2003.

Diversos métodos químicos têm sido desenvolvidos para a redução de cetonas de forma enantiosseletiva, como o uso de organoaluminatos, particularmente o BINAL-H, organoboranos, complexos de ródio (I) e rutênio (II), especialmente o Ru(II)-BINAP (TEMBA, 2003). Entretanto a redução pelo uso de biocatalisadores tem sido uma rota alternativa a estes métodos químicos pela alta versatilidade, eficiência e seletividade (FABER, 2004), sendo empregadas em diversas etapas sintéticas na produção de fármacos.

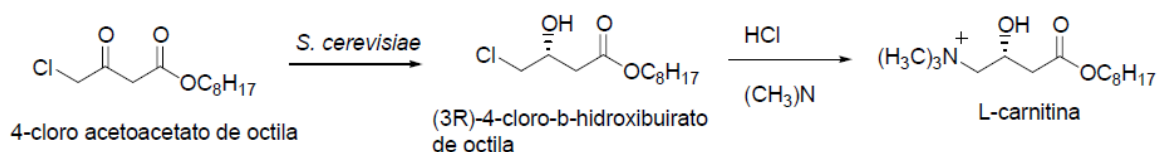
A fluoxetina, droga usada como antidepressivo, pode ser sintetizada utilizando dois procedimentos (Figura 8), que são iniciados com uma etapa de bioconversão catalisada pela levedura *S. cerevisiae* (PEREIRA, 1997).



**Figura 8.** Síntese de fluoxetina utilizando a levedura *S. cerevisiae*

**Fonte:** Beatriz, Lima e Marques, 2005.

A L-carnitina, medicamento usado para prevenir o infarto do miocárdio pode ser obtida através de duas etapas de reação, sendo a primeira etapa uma biotransformação catalisada pelas células de *S. cerevisiae*, conforme mostrado na figura 9. A produção seletiva do isômero “L” (*R*) é essencial já que a forma isomérica “D” (*S*) é tóxica par o organismo humano (BEATRIZ, LIMA E MARQUES, 2005).



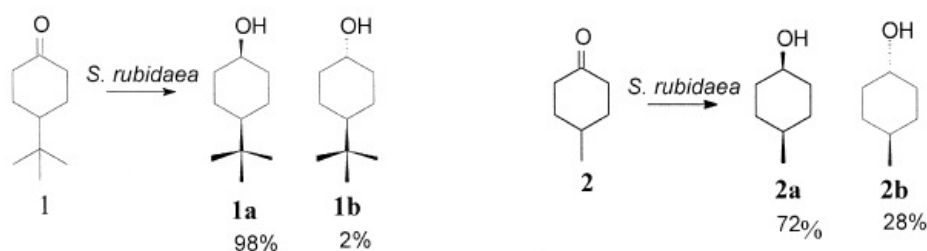
**Figura 9.** Síntese de L-carnitina utilizando a levedura *S. cerevisiae*

**Fonte:** Beatriz, Lima e Marques, 2005.

Segundo Fátima et al (2007) preparações biocatalíticas de álcool quirais usando enzimas presentes em células integras de microrganismos é um dos melhores métodos de preparação de auxiliares quirais a partir de um correspondente pró-quiral.

A redução microbiana de acetofenona pela levedura *Geotrichum candidum* foi descrita por Hage e colaboradores (2001). Em condições reacionais brandas o (*R*)-1-feniletanol foi obtido inicialmente com 52% de rendimento e 28% de excesso enantiomérico (ee), entretanto, alterando-se as condições de cultura e cultivo para otimização do método, obteve-se rendimento de 98% e 95% de ee.

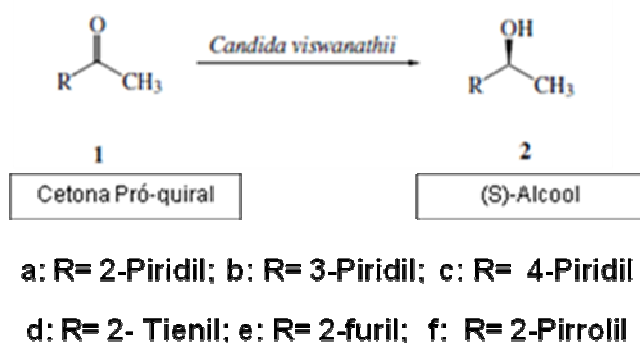
A bactéria *Serratia rubidaea* CCT 5742, estudada por De Conte et al. (2001), reduziu quantitativamente o 4-terc-butilciclo-hexanona (1) e a 4-metilciclohexanona (2) nos respectivos álcoois com predominância dos diastereoisômeros menos estáveis termodinamicamente, e *cis*-4-terc-butilciclo-hexanona (1a) e *cis*-4-metilciclohexanol (2a) com excesso diastereoisomérico (de) de 96% e 44% respectivamente (Figura 10).



**Figura 10.** Bioredução de 4-terc-butilciclohexanona (1) e a 4- metilciclohexanona (2) por *S. rubidaea*.

**Fonte:** DE CONTE et al, 2001.

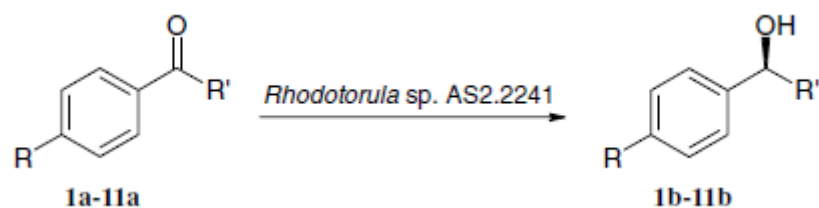
A levedura *Candida viswanathii* MTCC 5158 estudada por Soni, Chakraborti e Banerjee (2005) possui uma potente redutase, capaz de realizar redução estereosseletiva de várias arilcetonas a correspondente álcoois quirais com altos rendimentos (Figura 11).



**Figura 11.** Redução biocatalítica de heteroaril metil cetonas.

**Fonte:** SONI et al, 2005.

A acetofenona e alguns de seus derivados foram testados por Yang e colaboradores (2006). Utilizando células de *Rhodotorula* sp. AS2.2241 obteve-se álcoois aromáticos com excelentes enantiosseletividades, obedecendo a regra de Prelog. A redução de cetonas aromáticas, bem como os valores de tempo, rendimento, excesso enantiomérico e configuração do álcool obtido na redução podem ser visualizados na tabela 3 abaixo.

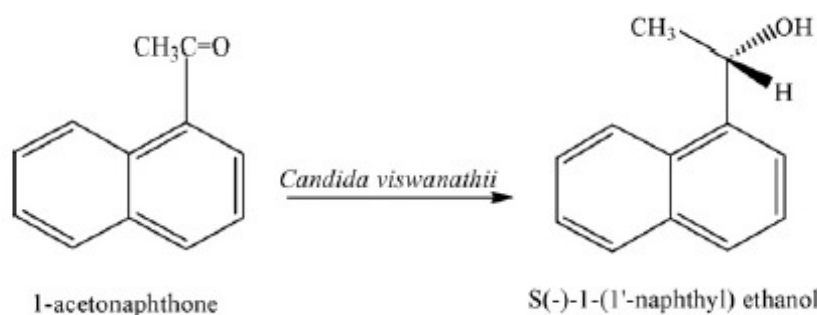
**Tabela 3.** Redução de cetonas aromáticas por *Rhodotorula* sp. AS2.2241

Substrato	R	R'	Tempo (h)	Rendimento (%)	ee (%)	Configuração
1a	H	CH <sub>3</sub>	7	100 (65)	99	S
2a	NO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	3	100 (84)	>99	S
3a	Br	CH <sub>3</sub>	3	100 (63)	>99	S
4a	Cl	CH <sub>3</sub>	4	100 (72)	99	S
5a	MeO	CH <sub>3</sub>	24	50 (35)	>99	S
6a	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	24	ND* (6)	ND*	ND*
7a	H	CH <sub>2</sub> Br	3	100 (69)	>99	R
8a	H	CH <sub>2</sub> Cl	3	100 (52)	>99	R
9a	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	9	100 (62)	>99	S
10a	H	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl	20	100 (50)	>99	S
11a	NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> Br	5	100 (51)	97	R

\* Não Determinado

Fonte: Adaptado de Yang, 2006.

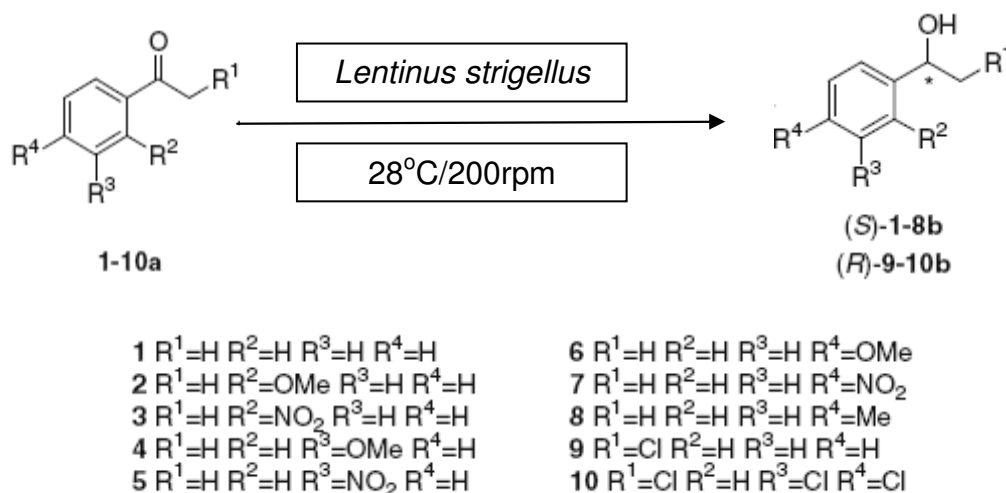
Fatima e colaboradores (2007) utilizaram células imobilizadas (enzimas Carbonil redutase recém-isoladas) da mesma cepa do microrganismo *Candida viswanathii* MTCC 5158 para a redução enantiosseletiva de 1-acetonaftona a (1S)-(-)-naftiletanol, um intermediário chave para a síntese do inibidor HMG Co-A redutase, conhecida popularmente como estatinas, utilizadas no tratamento de hiperlipidemia. A redução da cetona pelo biocatalisador segue a regra de Prelog, envolvendo a conversão de uma estrutura dimensional planar em um álcool tridimensional (Figura 12).



**Figura 12:** Redução biocatalítica de 1-acetonafona em (1S)-(-)-naftiletanol

**Fonte:** FATIMA, 2007.

Barros-Filho *et al* (2009) estudaram a redução de cetonas aromáticas e alifáticas pelo fungo *Lentinus strigellus*. A acetofenona foi utilizada como modelo de substrato obtendo-se excelente excesso enantiomérico ( $\geq 99\%$ ), sendo a conversão de 83% para o (S)-feniletan-1-ol (Figura 13).



**Figura 13:** Bioredução de cetonas proquirais aromáticas utilizando *L. strigellus*.

**Fonte:** BARROS-FILHO *et al*, 2009.

Embora células microbianas (como leveduras, bactérias e fungos endofíticos) sejam utilizadas na redução assimétrica de compostos carbonílicos, dois aspectos relacionados a enzimas estão envolvidos na formação dos produtos. O primeiro aspecto a ser analisado é a presença da enzima capaz de catalisar a redução assimétrica de compostos carbonílicos pró-quirais, ou seja, a ação da carbonil redutase. O outro aspecto é a regeneração do cofator, uma vez que é necessário uma quantidade suficiente de cofator na células microbianas para que ocorram as reações de redução. No entanto, poucos microrganismos possuem ambas as



atividades elevadas (carbonil redutase e sistema de regeneração do cofator), tornando difícil a construção de um eficiente sistema de biorredução para a produção de álcoois quirais usando células de microrganismo como biocatalisadores (KATAOKA, 2003).

O desempenho biocatalítico da enzima pode ser biotecnologicamente melhorada pela utilização de células microbianas recombinantes (BRAUTIGAM; BRINGER-MEYER; WEUSTER-BOTZ, 2007). A tecnologia de DNA recombinante pode ajudar a superar limitações, como por exemplo, a adição de genes que codificam a enzima carbonil redutase e a regeneração do cofator e assim esses microrganismos recombinantes poderiam ser utilizados como biocatalisadores na redução assimétrica de compostos carbonílicos.

Clonagem e super expressão do gene que codifica a enzima de interesse como, por exemplo, células de *Escherichia coli* recombinantes, podem ser usadas para implementar adicionalmente um sistema adequado de regeneração de cofator intracelular, obtendo-se uma melhoria da atividade biocatalítica (KATAOKA, 1999).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 SUBSTRATO

O substrato, acetofenona, da marca Vetec foi adquirido comercialmente.

#### 3.2 MICRORGANISMOS

As cepas microbianas de leveduras (10 cepas), bactérias (10 cepas) e fungos filamentosos (8 cepas) utilizadas no presente trabalho estão listadas na Tabela 4 e foram gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB/UEFS). Os microrganismos foram crescidos em meio de cultura adequado sob diferentes tempo e temperaturas de acordo com o grupo microbiano: leveduras - meio de cultura *ágar Sabouraud*, 36 h a 28°C; bactérias - meio de cultura YMA (*Yeast Mannitol Agar*), 24 h a 28°C e fungos filamentosos - meio de cultura *ágar nutriente*, 7 dias a 28°C.

As leveduras foram isoladas de destilarias do estado da Bahia (Tabela 4) previamente identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* por métodos bioquímicos por Silva (2009).

**Tabela 4:** Leveduras utilizadas nos testes de biorredução

<b>Código dos isolados</b>	<b>Espécie</b>	<b>Destilarias</b>
<b>P15</b>	<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>Poço da Pedra (Caculé-BA)</b>
<b>P35</b>	<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>Poço da Pedra (Caculé-BA)</b>
<b>T1</b>	<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>Tombad'ouro (Rio de contas- BA)</b>
<b>T5</b>	<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>Tombad'ouro (Rio de contas- BA)</b>
<b>T10</b>	<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>Tombad'ouro (Rio de contas- BA)</b>
<b>E1-5</b>	<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>Engenho Bahia (Ibirataia-BA)</b>

As cepas foram coletadas de diferentes, dornas, tempos e colônias, conforme a Tabela 5:

**Tabela 5:** Características das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

<b>Código dos isolados</b>	<b>Dorna de coleta</b>	<b>Tempo de coleta (Brix)</b>	<b>Colônia</b>
<b>P15</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>10</b>
<b>P35</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>2</b>
<b>T1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>14</b>
<b>T5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>
<b>T10</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>E1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>E2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>E3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
<b>E4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>E5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

As colônias de bactérias foram isoladas, caracterizadas e identificadas por Rocha, G. (2007), sendo rizobactérias, bactérias do solo que apresentam relação associativas e simbióticas com o amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Gregory), coletadas na região Sul da Bahia na Estação de Zootecnia do extremo Sul da CEPLAC em Itabela, e nas Fazendas Ubirajara e São Francisco em Belmonte, localizadas região Sul da Bahia (Tabela 6).

**Tabela 6:** Bactérias utilizadas nos testes de biorredução

<b>Código dos isolados</b>	<b>Gêneros</b>
<b>I67</b>	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>
<b>I30</b>	<b><i>Pseudomonas</i> sp.</b>
<b>I116</b>	<b><i>Ochrobactrum</i> sp.</b>
<b>I07</b>	<b><i>Agrobacterium</i> sp. ou <i>Rhizobium</i> sp.</b>
<b>O21</b>	<b><i>Brevibacillus</i> sp.</b>
<b>B34</b>	<b><i>Enterobacter</i> sp.</b>
<b>B08</b>	<b><i>Pandorea</i> sp.</b>
<b>I68</b>	<b><i>Paenibacillus</i> sp.</b>
<b>I85</b>	<b><i>Paenibacillus</i> sp.</b>
<b>B18</b>	<b><i>Bacillus</i> sp.</b>

**Fonte:** Adaptado de Rocha, G. (2007).

Os fungos, utilizados nesse estudo, foram isolados a partir de ramos laterais da copa de árvores seringueira (*Hevea brasiliensis*) por Rocha, A. (2007), pertencentes a diferentes cultivares (Tabela 7), no município de Igrapiúna, na região sudoeste da Bahia. Foram considerados microrganismos endofíticos, por habitarem pelo menos um período de seu ciclo de vida, no interior de uma planta em associação simbiótica.

**Tabela 7:** Fungos endofíticos e identificação das variedades de *H. brasiliensis* de onde foram isolados.

<b>Código dos isolados</b>	<b>Variedade de <i>H. brasiliensis</i></b>
<b>FX045</b>	<b><i>H. brasiliensis</i> FX3864</b>
<b>FX090</b>	<b><i>H. brasiliensis</i> FX3864</b>
<b>FX127</b>	<b><i>H. brasiliensis</i> FX3864</b>
<b>CDC026</b>	<b><i>H. brasiliensis</i> CDC312</b>
<b>CDC086</b>	<b><i>H. brasiliensis</i> CDC312</b>
<b>MDF036</b>	<b><i>H. brasiliensis</i> MDF180</b>
<b>MDF077</b>	<b><i>H. brasiliensis</i> MDF180</b>
<b>MDF092</b>	<b><i>H. brasiliensis</i> MDF180</b>

**Fonte:** Adaptado de Rocha, A. (2007).

### 3.3 REATIVAÇÃO E CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

O meio de repique e de manutenção dos microrganismos Ágar-YPD (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicose 20 g/L e 20 g/L de ágar) foram esterelizados por autoclave (121°C por 15 min) e vertidos em placas de Petri (15 x 100 mm).

As placas foram incubadas a 28°C por 24 horas, 36 horas e 7 dias para as bactérias, leveduras e, e fungos filamentosos, respectivamente e, em seguida, foram mantidas na geladeira para o prosseguimento do trabalho.

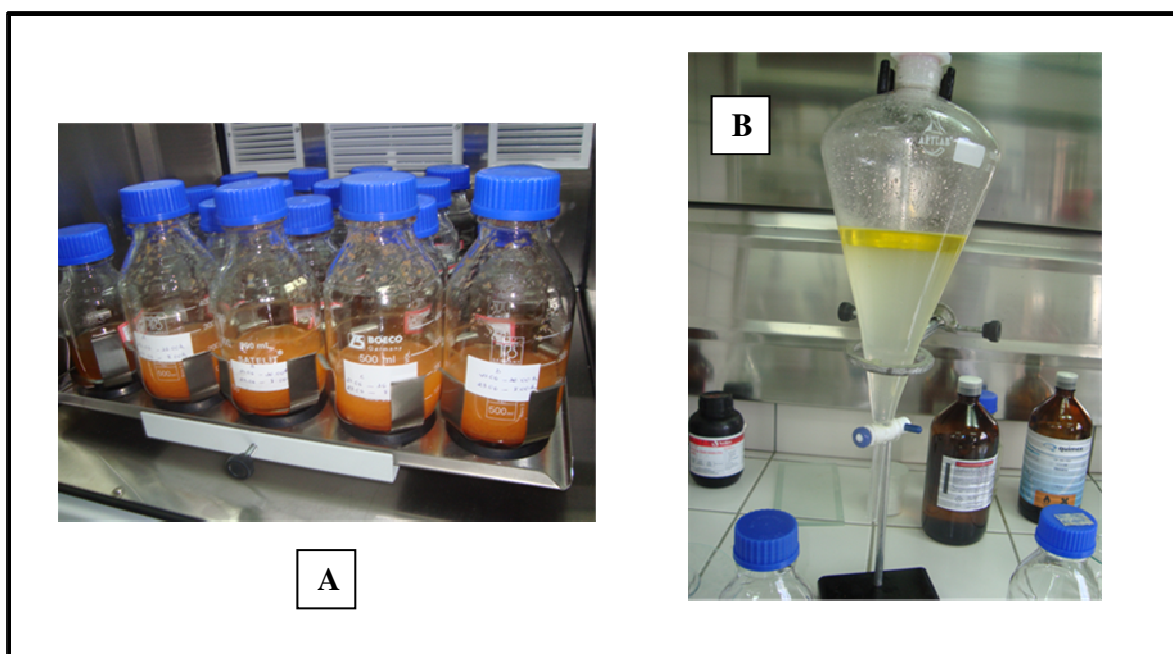
### 3.4 REDUÇÃO VIA QUÍMICA DO SUBSTRATO REAGENTE: ACETOFENONA

Foi dissolvido 0,53g de acetofenona em 20 mL de metanol, conforme metodologia descrita por Vieira (2006). Sob agitação foi adicionado 0,042g de borohidreto de sódio e aos poucos foi colocado 10mL de solução supersaturada de cloreto de amônio. A reação foi acompanhada a cada meia hora por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), até formação do produto (aproximadamente 4 horas). O produto da reação foi extraído com três porções de 50 mL de acetato de etila e

seco com sulfato de magnésio anidro. Após filtração e evaporação, o produto foi purificado através de cromatografia em coluna, com sílica gel 60 (70-230 mesh) da marca Merck, como fase estacionária e cujo eluente foi 80% de hexano e 20% de acetona.

### 3.5 REDUÇÃO DA ACETOFENONA POR *DAUCUS CAROTA L.* (CENOURA)

Em Erlenmeyer de 250 mL contendo 155 mL de água destilada autoclavada foi adicionada 25 g de cenoura cortada em cubos e sem casca e 0,25 g de acetofenona. A reação foi deixada sob agitação em Shaker por 40 horas conforme metodologia de Yadav (2002). Em seguida o conteúdo do Erlenmeyer foi filtrado a vácuo e a cenoura lavada três vezes com água destilada (200 mL). O produto (álcool) formado foi extraído com acetato de etila (três vezes de 200 mL) e secado com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Após filtração e evaporação o produto foi purificado em coluna cromatográfica, empregando-se sílica gel 60 (70-230 mesh) da marca Merck como fase estacionária e hexano como eluente (Figura 14).



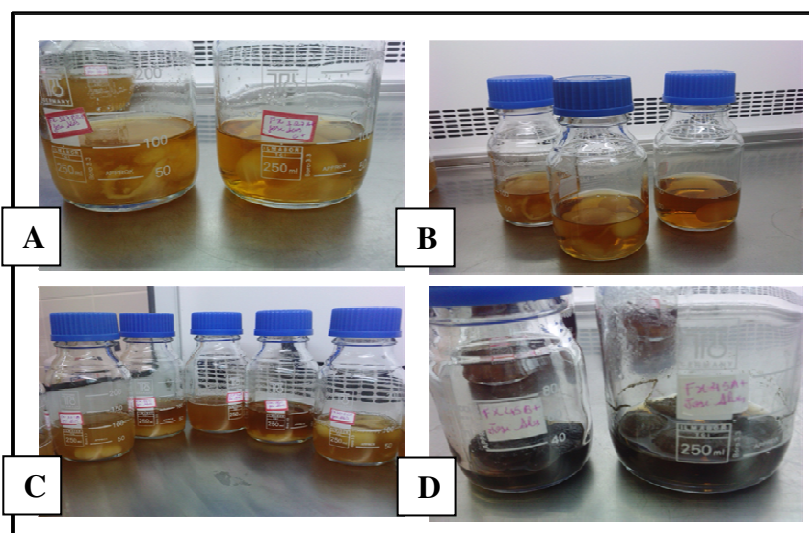
(A) Reação da *Daucus carota* ( cenoura); (B) Extração do produto (álcool)

**Figura 14:** Testes de redução da acetofenona por *Daucus carota L.*

### 3.6 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA AS BIOTRANSFORMAÇÕES

Em Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 100 mL do meio líquido YPD (Broth Yeast Extract Peptone Dextrose – extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicose 20 g/L) e esterilizados na autoclave a 121°C por 20 minutos. Esperou-se até que o meio chegasse à temperatura ambiente e, em seguida, foram transferidos 500 µL (de leveduras) e 100 µL (de bactérias) da suspensão de microrganismo, preparada em solução salina 0,45% com concentrações definidas para leveduras ( $5 \times 10^5$  UFC/mL) e para bactérias ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Para os fungos foram realizados testes variando a quantidade de discos com crescimento superficial do microrganismo (de 1 a 5 discos) adicionados ao meio de cultura contendo o substrato acetofenona, para verificação da concentração adequada do fungo. A quantidade de plugues escolhida foram de 5 unidades para cada meio reacional.

As quantidades da suspensão de microrganismos e plugues (para fungos, figura 15) bem como a concentração dessas suspensões podem ser visualizadas na Tabela 8.



(A, B e C) Reações dos fungos endofíticos; (D) Reações dos fungos endofíticos com contaminação

**Figura 15:** Testes de biorredução para fungos endofíticos.

Nos testes de biorredução, realizados em triplicata, as culturas das leveduras foram incubadas a 28°C em Erlenmeyer contendo 100 mL do meio de cultura YPD, 116 µL de substrato orgânico e 500 µL da suspensão microbiana. Para as bactérias e fungos, o volume de substrato adicionado ao meio de cultura foi de 80 µL. A

suspensão resultante foi mantida em agitador rotatório (Shaker) a 28°C e 120 rpm e alíquotas de 2 mL foram retiradas do meio reacional em diferentes tempos que são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Quantidades trabalhadas nos testes de biorredução.

MICROORGANISMO	QUANTIDADE ADICIONADA*	CONCENTRAÇÃO**	TEMPO REACIONAL PARA RETIRADA DE ALÍQUOTAS
<b>Leveduras</b>	500 µL	$2,5 \times 10^5$ UFC/mL	7º e 14º dia
<b>Bactérias</b>	100 µ L	$1,5 \times 10^8$ UFC/mL	7º e 14º dia
<b>Fungos</b>	5 discos	–	10º dia

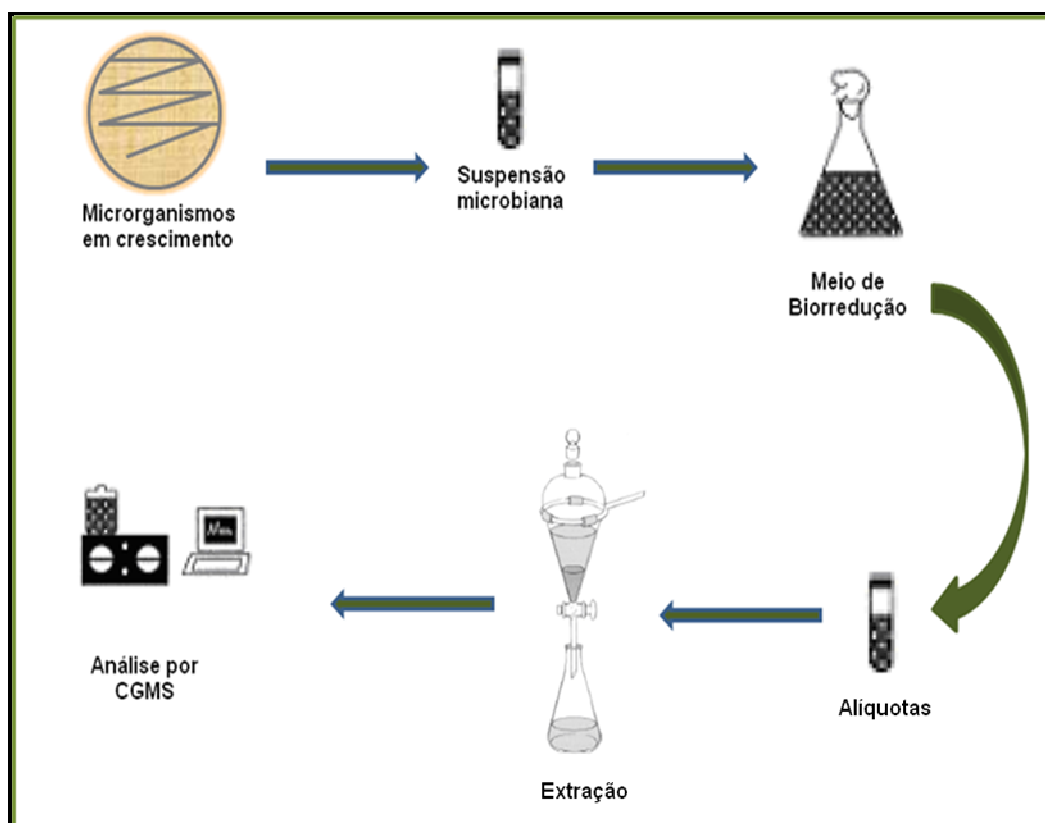
\*Quantidade adicionada de microrganismo

\*\*Concentração do microrganismo

O meio de cultivo contendo os microrganismos foi separado por filtração a vácuo e o produto foi extraído com solvente orgânico (acetato de etila) através de funil de separação. As extrações foram repetidas em três porções de acetato de etila, a fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro.

A fase orgânica da separação foi analisada em cromatografo a gás Shimadzu CG-2010 acoplada ao espectrômetro de massas Shimadzu CGMS-QP2010 equipado por coluna capilar CP-Sil-5CB-MS, WCOT de sílica fundida, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm, marca Varian. As condições de análise foram:  $t_i=170^\circ\text{C}$ ,  $r= 5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $t_f= 300^\circ\text{C}$  (permanecendo 15 min). A figura 16 apresenta o fluxograma, dos testes de biorredução, aplicado nesse estudo.





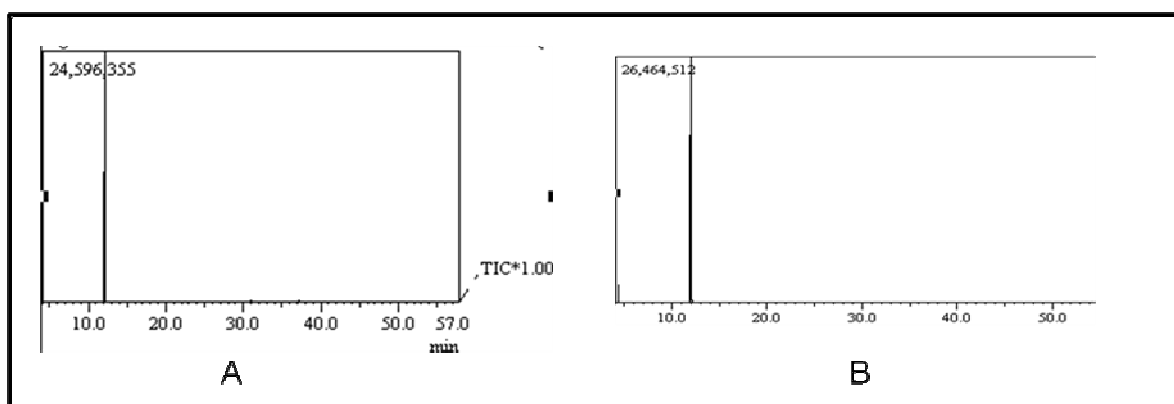
**Figura 16:** Fluxograma de biorredução.

O excesso enantiomérico foi determinado analisando a fase orgânica em Cromatógrafo a gás Modelo: Varian CP-3380 com detector de ionização por chama (DIC) equipado com coluna de separação de fase quiral Modelo: SGE de 25m x 0,22mm com filme de 0,25mm e programação:  $T_i=100^{\circ}\text{C}$ ,  $r= 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $t_f=170^{\circ}\text{C}$  permanecendo por 25 minutos.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 REDUÇÃO VIA QUÍMICA DO SUBSTRATO ACETOFENONA

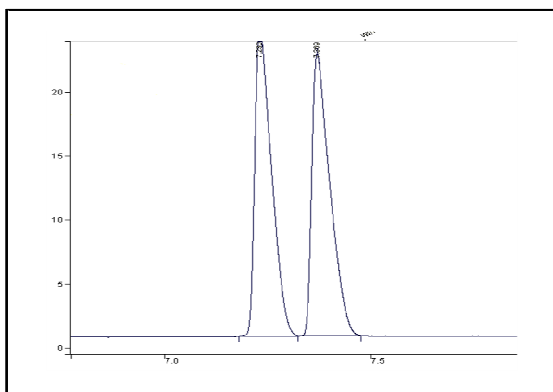
Realizou-se a redução via química utilizando boro-hidreto de sódio com o substrato acetofenona. Essa redução forneceu o álcool racêmico que serviu como referência para as análises das biorreduções com os microrganismos analisados (Figura 17).



**Figura 17:** Cromatogramas obtidos por CGMS, para reações de redução química da acetofenona: (A) acetofenona; (B) álcool racêmico.

Condições de análises no CGMS:  $t_i=70^{\circ}\text{C}$ ;  $r=3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;  $t_f=130^{\circ}\text{C}$ ; 20 min

O álcool racêmico foi analisado em CG equipado com coluna quiral, observando-se que os isômeros foram produzidos com 50% de excesso enantiomérico, como pode ser observado na Figura 18.



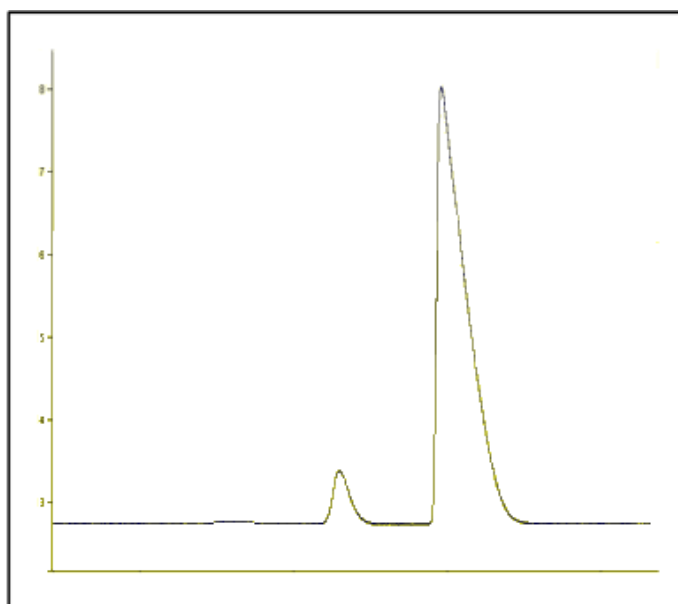
**Figura 18:** Cromatograma obtido por CG equipado com coluna quiral, para reação de redução química da acetofenona com borohidreto de sódio

Condições de análises no CGMS:  $t_i=100^{\circ}\text{C}$ ;  $r=5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;  $t_f=170^{\circ}\text{C}$ ; 25 min

## 4.2 REDUÇÃO DA ACETOFENONA POR *DAUCUS CAROTA L.* (CENOURA)

Reduções estereosseletivas de cetonas (por exemplo, acetofenona) a álcoois secundários podem ser realizados utilizando-se o vegetal *Daucus carota L.*, popularmente conhecido como cenoura. Biorreduções também podem ser mediadas por células inteiras de vegetais, legumes e frutas cortados (YADAV, 2002). A estereosseletividade nesse caso se deve a presença da álcool desidrogenase encontrada em raízes como a cenoura, que é capaz de reduzir acetofenona ao álcool de configuração *S*, com rendimento de 73 – 100% e excessos enantioméricos, entre 92 - 100% (BLANCHARD; WEGHE, 2006).

O álcool secundário produzido foi obtido com 98,9% de conversão, e após purificação, foi analisado por cromatografia quiral, obtendo-se o isômero (*S*) com 87% de excesso enantiomérico (ee), estando de acordo com a metodologia de YADAV (2002), conforme cromatograma na Figura 19.

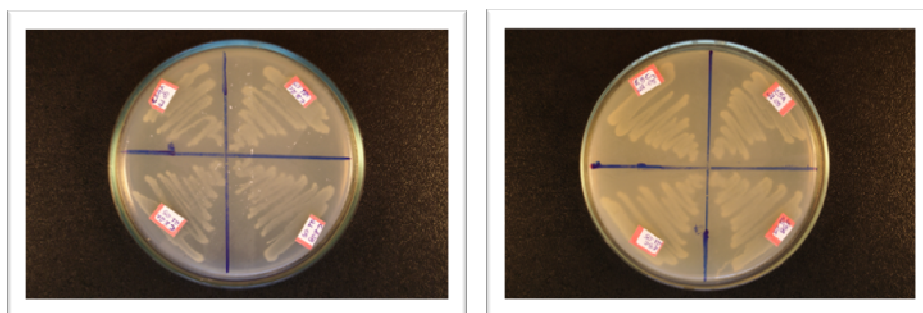


**Figura 19:** Cromatograma obtido por CG equipado com coluna quiral, para reações de redução da acetofenona obtendo álcool quiral com configuração (*S*) por síntese com *Daucus carota L.*

Condições de análises no CGMS:  $t_i=100^{\circ}\text{C}$ ;  $r=5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;  $t_f=170^{\circ}\text{C}$ ; 25 min

### 4.3 LEVEDURAS

A suspensão microbiana juntamente com o substrato e o meio de cultura foram colocadas em incubadora rotativa por um período de 14 dias. A cada sete dias foram retiradas alíquotas que, após extração com acetato de etila, foram analisadas por cromatografia a gás para determinação da conversão e do excesso enantiomérico. Possíveis contaminações foram verificadas através de controle microbiológico realizado a cada retirada de alíquota, não se observando a presença de microrganismos contaminantes no meio de biorredução (Figura 20).

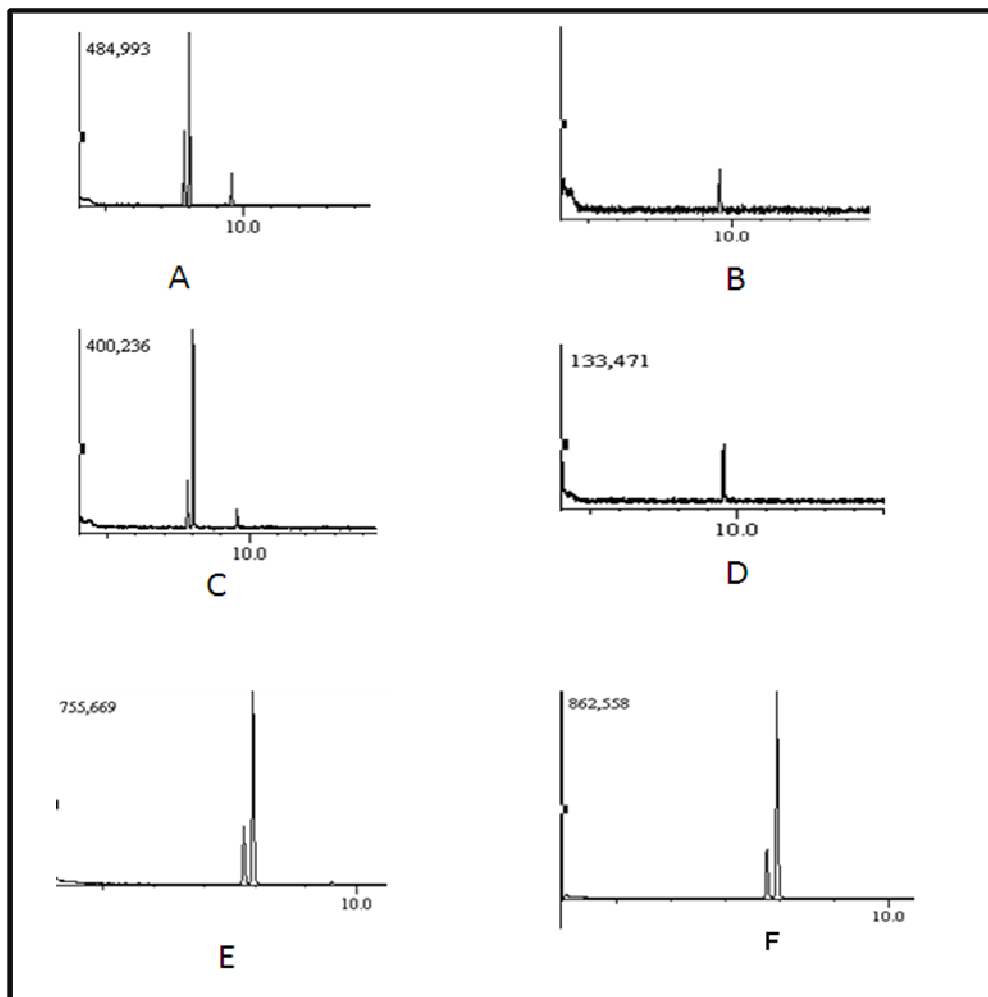


**Figura 20:** Controles de contaminantes dos testes de biorredução.

As alíquotas extraídas dos testes de biorredução com leveduras foram analisadas por cromatografia a gás para determinação da taxa de conversão (Figura 20) e os resultados são apresentados na tabela 08. A identificação dos componentes foi com base na comparação dos espectros de massas da biblioteca CLASS-VP software NIST-107 library registry of mass spectral data (através de busca automática e manual) e comparação dos tempos de retenção com amostras dos padrões de acetofenona e 1-feniletanol. Conforme dados apresentados na Tabela 8 e na Figura 21, verifica-se que a acetofenona foi biotransformada independente da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada.

Os álcoois foram obtidos com rendimentos entre 12 e 25%, após 7 dias e entre 18 a 29%, após 14 dias, exceto para a cepa E4, com rendimento químico após 7 e 14 dias de 6 a 15%, respectivamente. Ocorreu pouca variação na conversão da acetofenona a álcool de configuração S entre 7 e 14 dias. Entretanto, Rodrigues e Moran (2001) afirmam que as reduções de cicloalcanonas fornecem em geral rendimentos abaixo de 50%, após alguns dias de reação. Assim, os rendimentos obtidos nesse estudo reafirmam os resultados encontrados por MacLeod et al.

(1964) apud Rodrigues e Moran (2001) que obtiveram rendimentos químicos entre 15-23% para a redução da acetofenona pela levedura *S. cerevisiae*.



**Figura 21:** Cromatogramas obtidos por CG-EM, para reações de biorredução utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. (A) *S. cerevisiae* P35; (B) Controle positivo<sup>a</sup> *S. cerevisiae* P35; (C) *S. cerevisiae* T5; (D) Controle positivo *S. cerevisiae* T5; (E) *S. cerevisiae* E4; (F) *S. cerevisiae* E5.

Condições de análises no CGMS:  $t_i=70^{\circ}\text{C}$ ;  $r=3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;  $t_f=130^{\circ}\text{C}$ ; 20 min.

<sup>a</sup> Controle positivo – meio sem o reagente acetofenona

**Tabela 8:** Redução de Acetofenona por isolados de *Saccharomyces cerevisiae*.

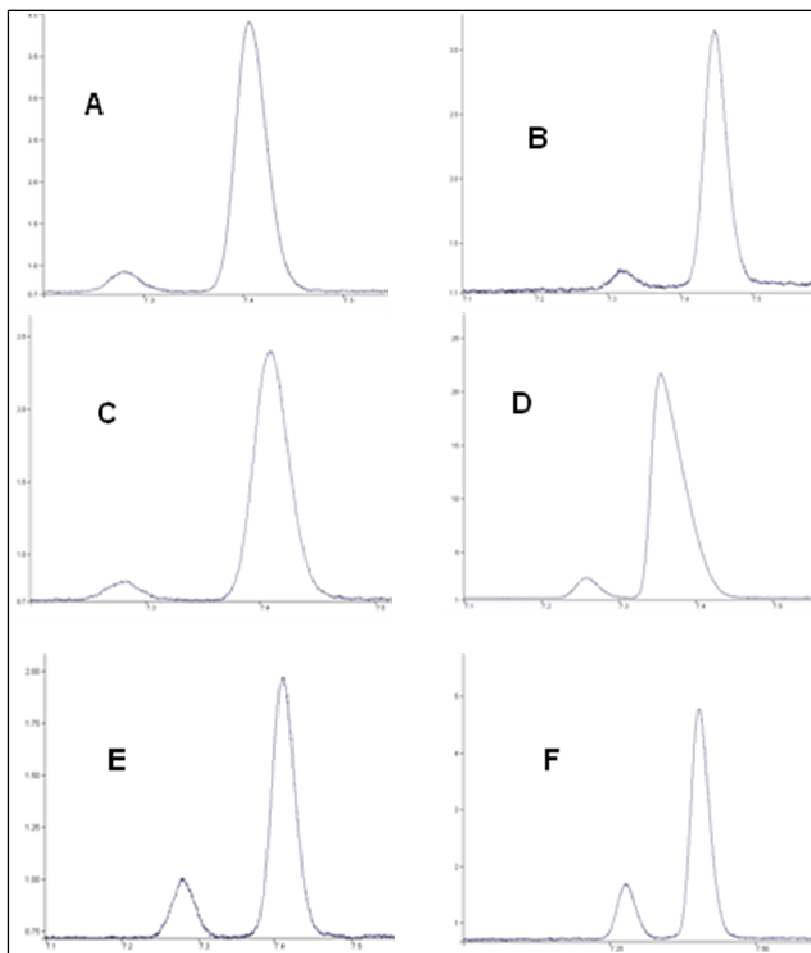
Microrganismo <sup>a</sup>	Tempo reacional (dias)	C <sup>b,d</sup> (%)	ee <sup>c,d</sup> (%)
T1	7	23	78 (S)
	14	27	83 (S)
T5	7	18	78 (S)
	14	29	82 (S)
T10	7	20	81 (S)
	14	29	83 (S)
P15	7	21	67 (S)
	14	27	80 (S)
P35	7	25	87(S)
	14	27	88(S)
E1	7	24	87(S)
	14	28	89 (S)
E2	7	17	64 (S)
	14	28	61 (S)
E3	7	12	63 (S)
	14	26	55 (S)
E4	7	6	45 (S)
	14	15	48 (S)
E5	7	12	62 (S)
	14	26	57 (S)

<sup>a</sup> Maiores detalhes estão na Tabela 6;

<sup>b</sup> Conversão (C) e <sup>c</sup> excesso enantiomérico (ee) calculados por CG-EM e CG, respectivamente.

<sup>d</sup> Média da triplicata

Quanto a enantiosseletividade das conversões, pode-se observar que a acetofenona em 7 dias de reação com as leveduras produziu o 1-feniletanol de configuração *S* com um excesso enantiomérico entre 61 e 88%, com exceção da reação com a cepa E4, para a qual o ee foi de 45%. O excesso enantiomérico foi maior em 14 dias de reação com as cepas T1, T5, T10, P15, P35, E1 e E4 (ee acima de 80%, exceto para a cepa E4 com 48 % de ee). Quando as cepas E2, E3 e E5 foram utilizadas a percentagem de ee sofreu redução, obtendo-se valores de 62 e 57%, respectivamente.



**Figura 22:** Cromatogramas obtidos por CG equipado com coluna quiral, para reações de redução da acetofenona realizadas por leveduras (A) *S. cerevisiae* P35 1 extração; (B) *S. cerevisiae* P35 2 extração; (C) *S. cerevisiae* E1 1 extração; (D) *S. cerevisiae* E1 2 extração; (E) *S. cerevisiae* E3 1 extração; (F) *S. cerevisiae* E3 2 extração.

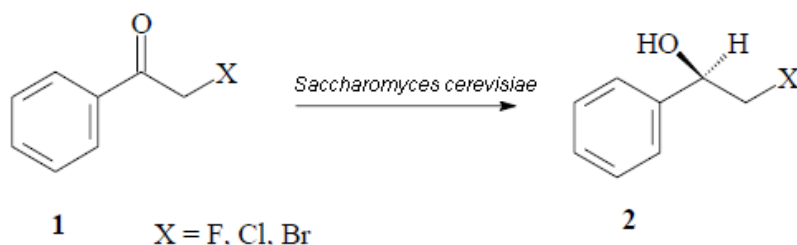
Condições de análises no CGMS:  $t_i=100^{\circ}\text{C}$ ;  $r=5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;  $t_f=170^{\circ}\text{C}$ ; 25 min

Os resultados (visualizados na Tabela 8 e na Figura 22) indicam que as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em cachaçarias baianas apresentam a enzima álcool desidrogenase e foram capazes de reduzir a acetofenona ao álcool 1-feniletanol de configuração *S*, embora com baixas taxas de conversão; sendo as cepas P35 e E1 as mais promissoras para aplicação, uma vez que foram capazes de levar aos maiores excessos enantioméricos. Um dos fatores que pode ter afetado o rendimento baixo de conversão da acetofenona em álcool quiral pode estar relacionado a baixa solubilidade do substrato orgânico em água, embora a acetofenona seja líquida em temperatura ambiente o que aumenta a sua disponibilidade para a ação dos microrganismos (VIERA, 2006).

Como as reações em biocatálise são realizadas normalmente em meio aquoso, uma alternativa segundo Andrade, Piovan e Pasquini (2009) seria a

utilização de compostos orgânicos como solvente ou co-solvente nesses processos; a presença do solvente pode melhorar a solubilidade de compostos orgânicos e facilitar a interação solvente-enzima-substrato. A alternativa estudado pelos pesquisadores foi a utilização de glicerol, um subproduto da produção de biodiesel, que melhorou o desempenho enzimático do microrganismo estudado, chegando a uma melhora na conversão (até > 99%) e de enantiosseletividade (até > 99%), quando comparado com reações em solução aquosa ou outros modelos aquosos-orgânicos (THF, éter etílico, tolueno, DMSO e acetonitrila).

O rendimento químico e ótico também pode ser melhorado com a introdução de um halogênio (F, Cl ou Br) no carbono  $\alpha$  da acetofenona, a Figura 23 demonstra a reação (RODRIGUES; MORAN, 2001). Grupos substituintes retiradores de elétrons localizados em *para* no anel aromático da acetofenona, aumentam a velocidade da reação de redução mediada por fermento de pão (BRENELLI et al., 1992). Rodrigues e Moran (2001) afirmam que os grupos retiradores de elétrons posicionados tanto no anel, quanto na parte alifática das acetofenonas melhoram levemente o rendimento e provocam um importante incremento no ee, atingindo valores superiores a 90%.



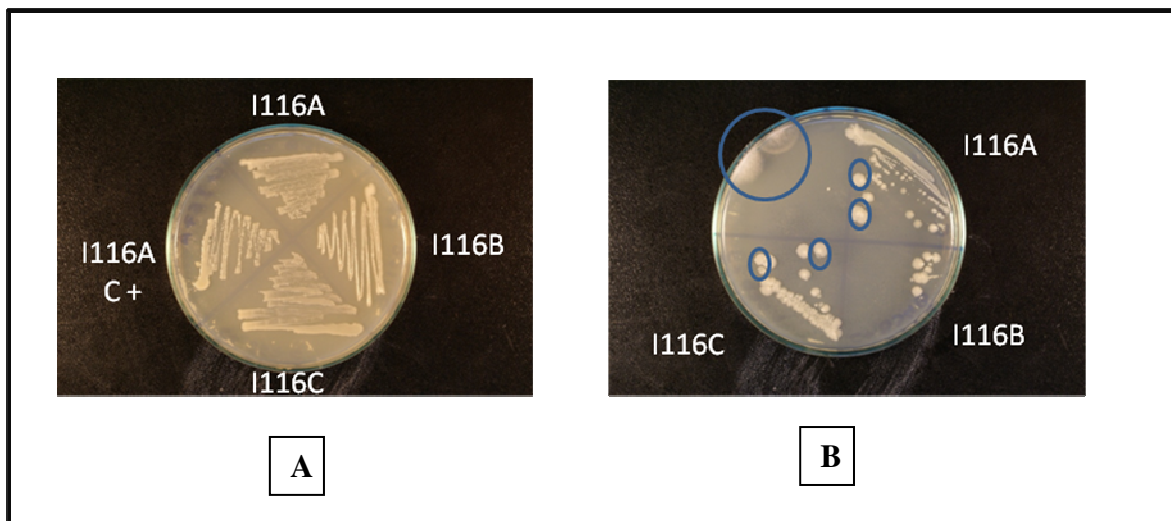
**Figura 23:** Biorreduções de cetonas em presença de grupos retiradores de elétrons.  
**Fonte:** Adaptado de Rodrigues e Moran, 2001

#### 4.4 BACTÉRIAS

As biorreduções com as rizobactérias foram realizadas com 80 $\mu$ L de acetofenona em 100mL do meio de cultura YPD e alíquotas foram retiradas para análise da formação dos produtos a cada 7 dias. Foram realizados testes de coloração de Gram e repiques em placas de petri com os microrganismos reativados a cada retirada de alíquota para verificar possíveis contaminações, quando



observada alguma contaminação eram feitos novos repiques para obter colônias isoladas e os testes de biorredução eram refeitos (Figura 24).



**Figura 24:** Controles de contaminantes dos testes de biorredução para bactérias. (A) Testes não contaminados; (B) Testes contaminados assinalados pelos círculos em azul.

A conversão química foi verificada por cromatografia em fase gasosa e calculada a partir da relação entre as áreas dos picos da acetofenona e do 1-feniletanol nos cromatogramas obtidos (Figura 25), os resultados estão expressos na tabela 9.

**Tabela 9:** Redução de Acetofenona por isolados de bactérias.

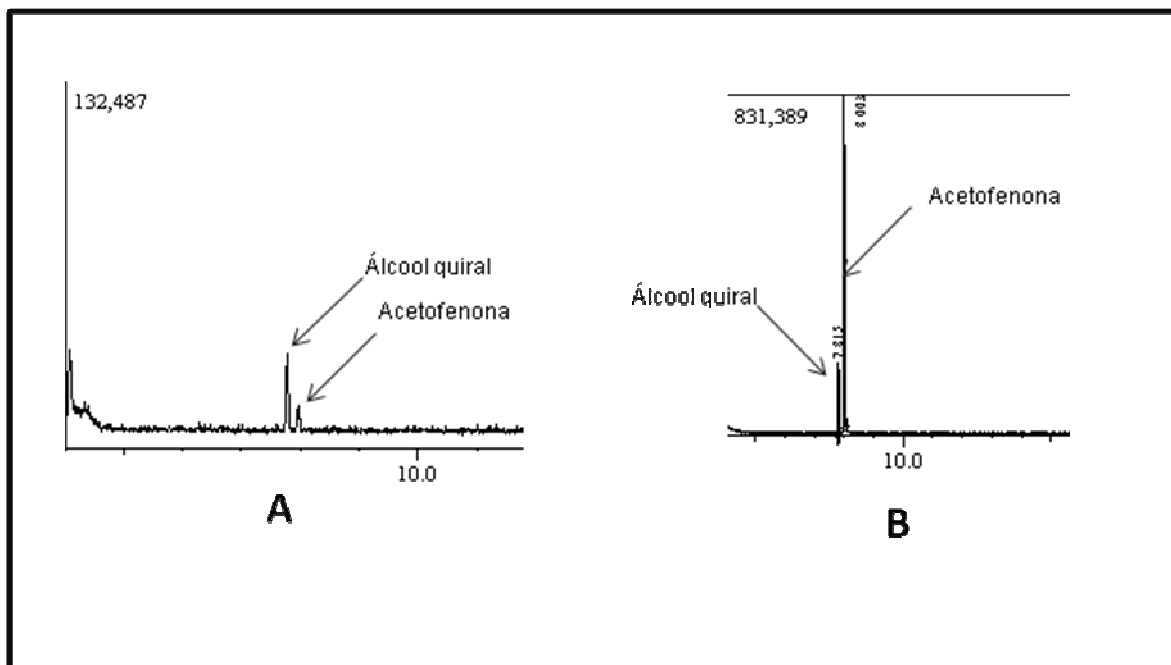
Microrganismo <sup>a</sup>	Tempo (dias)	C <sup>b</sup> (%)	ee <sup>c</sup> (%)
I68	7	16	94(S)
	14	29	>99 (S)
I116	7	72	72(S)
	14	79	77 (S)
I30	7	ND	ND
	14	3	95 (S)

<sup>a</sup> Maiores detalhes estão na Tabela 5;

<sup>b</sup> Conversão (C) e <sup>c</sup> excesso enantiômérico (ee) calculados por CGMS e CG, respectivamente; ND Não detectado.

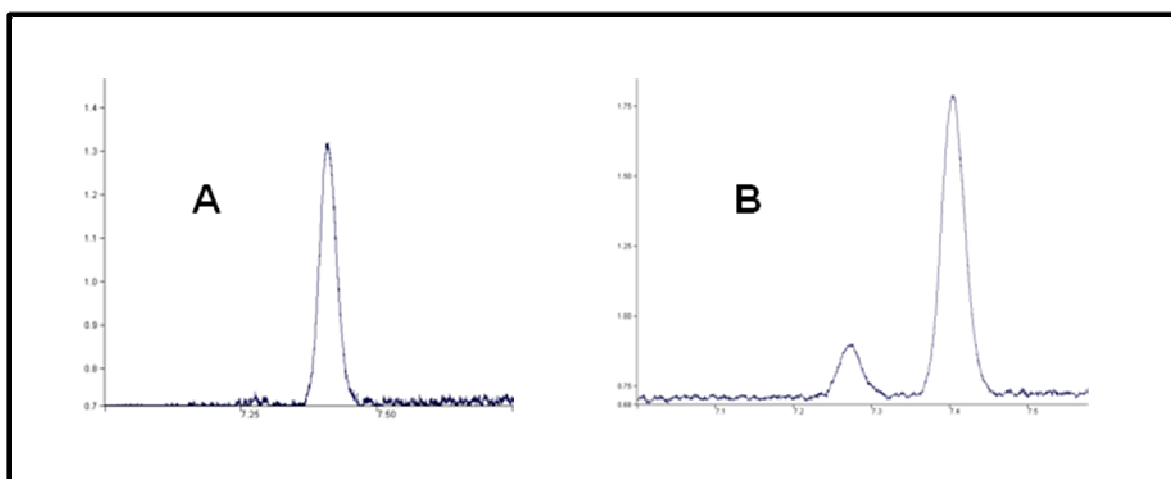
Das bactérias testadas a I116 (gênero *Ochrobactrum*) foi o microrganismo que melhor reduziu o substrato acetofenona, conversão média de 72 e 79% para as alíquotas retiradas no sétimo e décimo quarto dia, respectivamente. A rizobactéria

168 (gênero *Paenibacillus*) converteu em 16 e 29% , a acetofenona até o sétimo e décimo quarto dias, respectivamente.



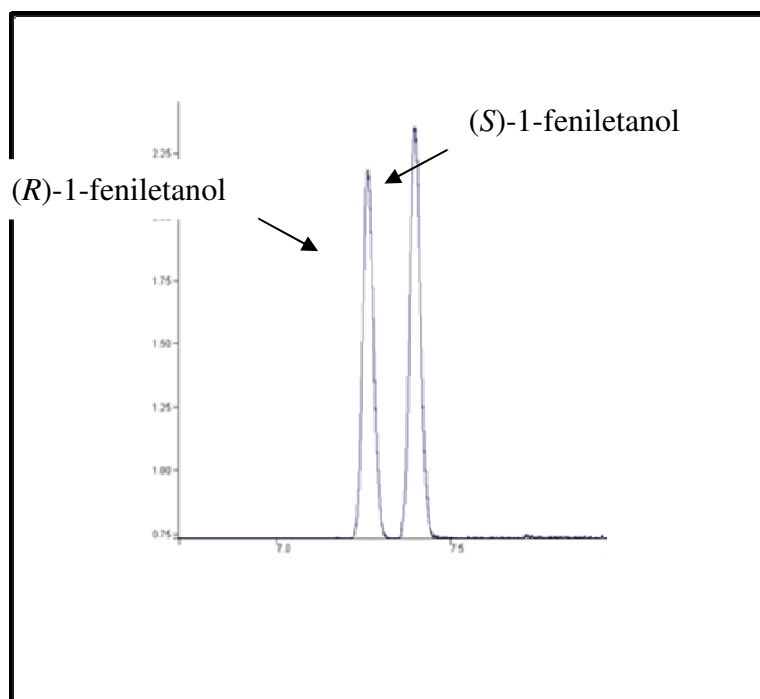
**Figura 25:** Cromatogramas obtidos por CG-EM, para reações de biorredução utilizando bactérias (A) *Ochrobactrum* I116; (B) *Paenibacillus* I68.  
Condições de análises no CG-EM:  $t_i=70^{\circ}\text{C}$ ;  $r=3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;  $t_f=130^{\circ}\text{C}$ ; 20 min

Com relação a enantiosseletividade a cepa I68 reduziu a acetofenona ao álcool quiral com excesso enantiomérico >99%, Figura 26.



**Figura 26:** Cromatogramas obtidos por CG equipado com coluna quiral, para reações de redução da acetofenona realizadas por bactérias (A) I68 2<sup>a</sup> extração; (B) I116 2<sup>a</sup> extração.  
Condições de análises no CGMS:  $t_i=100^{\circ}\text{C}$ ;  $r=5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;  $t_f=170^{\circ}\text{C}$ ; 25 min

Para confirmação do enantiômero produzido realizou-se então uma co-injeção de 2µl de solução contendo 40µl da amostra da biorredução por I68 e 20µl da amostra do álcool racêmico obtido na síntese química com borohidreto de sódio. Da co-injeção obteve-se o cromatograma (Figura 27) indicando assim que o álcool formado foi de configuração *S*, pelo aumento da área do pico correspondente ao álcool *S* na mistura racêmica.



**Figura 27** Cromatograma da co-injeção da amostra de biorredução de I68 e álcool racêmico sintetizado.

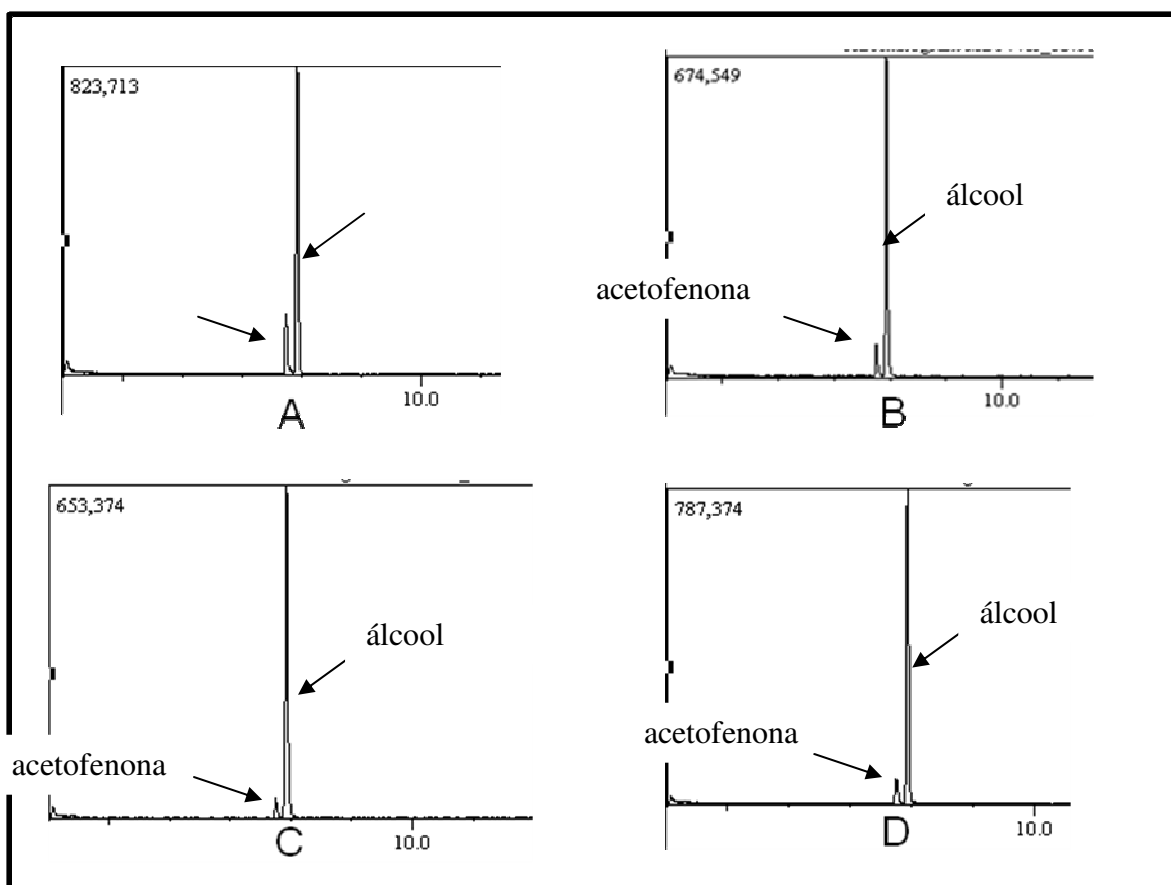
Para as bactérias I68 e I116 os valores do excesso enantiomérico foram >99% e 77%; respectivamente; sugerindo-se a partir da comparação entre os cromatogramas do álcool racêmico sintetizado com boro-hidreto de sódio com o álcool quiral sintetizado com cenoura, que os álcoois produzidos em ambos os experimentos são de configuração *S*.

As demais cepas bacterianas (I67, I07, O21, B34, B08 e I85) não apresentaram resultados positivos para o substrato acetofenona. Entretanto, Lima e Angnes (1999) ressaltam que embora algumas enzimas presentes nos microrganismos consigam catalisar reações em meio aquoso, este apresenta limitações relacionadas com a estabilidade enzimática e a pouca solubilidade de alguns substratos. A acetofenona é um substrato pouco solúvel em água (presente

no meio de cultura YPD) e o uso exclusivo de água como solvente pode restringir uma gama de aplicações da biocatálise (AIRES-BARROS, 2002).

#### 4.5 FUNGOS

Assim como nos testes de biorredução com as leveduras e as bactérias, foi calculado a porcentagem de conversão do substrato acetofenona considerando as áreas dos picos demonstrados no cromatogramas da figura 29.



**Figura 29:** Cromatogramas obtidos por CG-EM, para reações de biorredução utilizando fungos endofíticos (A) FX127; (B) MDF077; (C)CD026; (D)CDC086. Condições de análises no CGMS:  $t_i=70^{\circ}\text{C}$ ;  $r=3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;  $t_f=130^{\circ}\text{C}$ ; 20 min

Foram selecionados para os testes de biorredução 8 fungos endofíticos recuperados de diferentes cultivos da planta *H. brasiliensis*. Os microrganismos CDC086, CDC026, FX127, MDF077 e MDF092 apresentaram potencial biorredutor frente ao composto acetofenona (Tabela 10). A cepa FX127 foi a que melhor

converteu a acetofenona em álcool quiral, com conversão de 22%; seguido da cepa MDF077 com conversão de 19%.

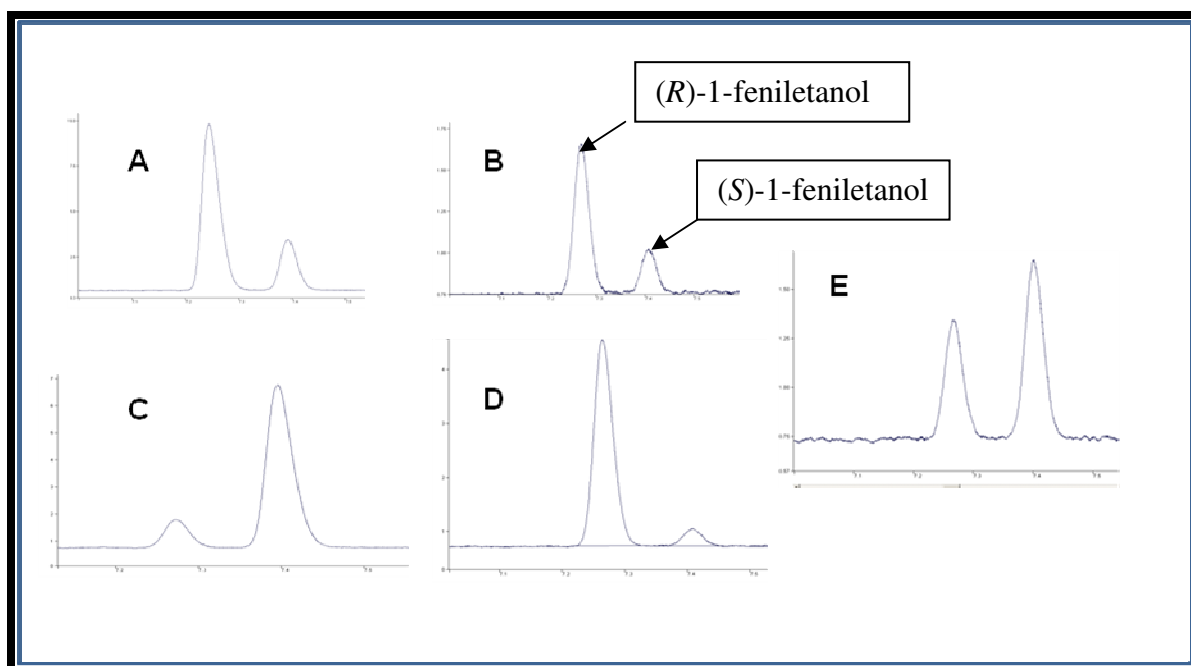
**Tabela 10:** Redução de Acetofenona por fungos endofíticos.

Microrganismo <sup>a</sup>	Tempo (dias)	C <sup>b</sup> (%)	ee <sup>c</sup> (%)
CDC086	10	11	56 ( <i>R</i> )
CDC026	10	6	54 ( <i>R</i> )
MDF077	10	19	84 ( <i>R</i> )
MDF092	10	4	41( <i>S</i> )
FX127	10	22	71 ( <i>S</i> )

<sup>a</sup> Maiores detalhes estão na Tabela 6;

<sup>b</sup> Conversão (C) e <sup>c</sup> excesso enantiomérico (ee) calculados por CG-EM e CG, respectivamente.

Quanto à formação de enantiômeros os microrganismos CDC086 e CDC026 e MDF077 produziram álcool quiral com 56, 54 e 84% de ee, a análise dos cromatogramas, Figura 30, indica que o álcool quiral produzido seja o anti-prelog de configuração *R* (Tabela 10). As cepas FX127 e MDF092 produziram álcool quiral com 71 e 41% de excesso enantiomérico, a análise de seus cromatogramas indica que o álcool de configuração *S* foi o principal produto da biocatálise .



**Figura 30** Cromatogramas obtidos por CG equipado com coluna quiral, para reações de redução da acetofenona realizadas por fungos endofíticos (A) CDC026; (B) CDC086; (C) FX127 (D)MDF077; (E) MDF092.

Condições de análises no CGMS:  $t_i=100^{\circ}\text{C}$ ;  $r=5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;  $t_f=170^{\circ}\text{C}$ ; 25 min

Esse estudo evidencia o relato de Faber (2004) ao afirmar que os fungos são capazes de catalisar um amplo espectro de reações químicas; exibindo, alta tolerância a uma diversidade de substâncias químicas. Distinguindo entre grupos funcionais que estão quimicamente situados em regiões diferentes da molécula, podendo realizar reações em regiões que dificilmente se obteriam por síntese química, isto é, funcionalização de posições não ativadas em moléculas orgânicas, tal como hidroxilações em cadeias alifáticas (FABER, 2004).

Homann et al. (2004) demonstraram que cerca de 60 culturas de diferentes tipos de microrganismos formam capazes de reduzir seletivamente várias cetonas, entre elas a acetofenona, fornecendo enantiômeros *R* e *S* dos álcoois correspondentes. Nesse estudo os microrganismos *Rhodotorula glutinis* ATCC 16740, *R. mucilaginosa* ATCC 4056, *R. mucilaginosa* ATCC 64684 e *Pichia subpelliculosa* ATCC 16766 geraram o correspondente álcool com configuração *S*; enquanto os microrganismos *Geotrichum klebahnii* ATCC 20001 e *G. candidum* ATCC 34614 reduziram a acetofenona ao álcool de configuração *R*.

Comasseto e colaboradores (2004) estudaram biotransformações realizadas por células dos fungos *Aspergillus terreus* CCT 4083, *A. terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT 4964 frente ao substrato acetofenona e outras acetofenonas para substituídas. Com relação ao substrato acetofenona os álcoois obtidos nas biotransformações foram sempre de configuração *S*. Entretanto, com a mudança de substrato ocorreram formação de produto álcool com configuração *R*.

Borges et al. (2009) demonstrou que os fungos endofíticos associados a *T. diversifolia* estudados (*Phoma sorghina*, por exemplo) biotransformaram os substratos naftoquinônicos e 1-tetralona, através de reações de oxidação, redução e metilação. O fungo *Chaetomium globosum*, isolado da *Vigueira robusta*, também mostrou-se promissor, produzindo oito novas estruturas de derivados azaphilônicos.

Entretanto, apesar disso os fungos endofíticos são uma fonte praticamente inexplorada em estudos de biotransformação, visto que existem poucos relatos na literatura sobre a aplicação destes microrganismos como biocatalisadores (BORGES et al., 2009).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leveduras, bactérias e os fungos endofíticos biotransformaram o substrato acetofenona através de reação de redução. Dos 28 microrganismos que tiveram o seu potencial redutor avaliados 18 atuaram como biocatalisadores. E os excessos enantioméricos (ee) obtidos foram expressivos, com valores acima dos encontrados na literatura consultada e configuração do álcool obtido apresentando as duas isoformas (*S*)-1-feniletanol e (*R*)-1-feniletanol.

Todas as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas foram capazes de converter o substrato acetofenona a (*S*)-1-feniletanol com taxas de conversão entre 6 e 29%, e excessos enantioméricos de 45 a 89%. Das 10 bactérias analisadas, 3 foram capazes de reduzir a acetofenona, com destaque para as cepas I68 e I30, que levaram ao (1*S*)-feniletanol com altos excessos enantioméricos, >99% e 95%, respectivamente. Dos 8 fungos endofíticos, 5 atuaram como biocatalisadores, dos quais 2 levaram ao álcool de configuração *S* e 3 ao álcool de configuração *R*.

O presente estudo abre perspectivas para a utilização destes microrganismos em experimentos de biorredução com outros substratos para se verificar o espectro de sua aplicabilidade. Contribuindo para conhecimento de espécies biológicas com potencial biocatalisador, importantes para o conhecimento da biodiversidade dos microrganismos em processos de bioprospecção.

## REFERÊNCIAS

- AIRES-BARROS, M. R. **Biocatálise em solventes orgânicos**. Boletim de Biotecnologia. Instituto Superior Técnico: Lisboa, p. 1049-001, 2002.
- ANDRADE, H. L.; 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, p. 1521-1525, 2009.
- BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. O Emprego de Fermento de Pão, *Saccharomyces cerevisiae*, na Síntese de Feromônios. **Química Nova**. v. 27. n. 3, p. 421-431, 2004.
- BARBIERI, C.; BOSSI, L.; D'ARRIGO, P. FANTONI, G. P.; SERVI, S. Bioreduction of aromatic ketones: preparation of chiral benzyl alcohols in both enantiomeric forms. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 11, p. 415-421, 2001.
- BARRETT, A.G.M.; CARR, R. A. E.; ATTWOOD, S. V.; RICHARDSON, G.; WALSH, N.D.A. Total synthesis of (+)-milbemycin .beta.3. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 51, p. 4840-485, 1986.
- BARROS Filho, B. A.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L.G.; MATTOS, M. C.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNANDEZ, V. GOTOR, V. *Lentinus strigellus*: a new versatile stereoselective biocatalyst for the bioreduction of prochiral ketones. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 20, p. 1057–1061, 2009.
- BEATRIZ, A. , LIMA, D. P. ; MARQUES, M. R. Biotransformações com Microrganismos em Mato Grosso do Sul: Histórico e Perspectivas. **Revista Ágora**. v. 1, n. 4, 2005.
- BLANCHARD, N.; WEGHE, P. V. *Daucus carota L.* mediated bioreduction of Prochiral ketones. **Organic Biomolecular Chemistry**. v. 4, p. 2348 – 2353, 2006.
- BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**. v. 13. p. 1137-1163, 2009.
- BRAUTIGAM, S.; BRINGER-MEYER, S.; WEUSTER-BOTZ, D. Asymmetric whole cell biotransformations in biphasic ionic liquid/water-systems by use of recombinant *Escherichia coli* with intracellular cofactor regeneration. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 18, p. 1883–1887, 2007.
- BRENELLI, E. C. S.; CARVALHO, M.; OKUBO, M. T.; MARQUES, M.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; SORRILHA, A. E. P. M. Enantioselective Synthesis of (-)-(R)-1-Phenylethanolamines Using Baker's Yeast Reduction of Some  $\alpha$ -Substituted Methyl Phenyl Ketones. **Indian Journal Of Chemistry**. v. 31B, p. 821-823, 1992.



BUTLER, M. S. The role of Natural Product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural products**. v. 67, p. 2142-2153, 2004.

CABRAL, J.M.S. AIRES-BARROS, M.R. GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. Lisboa: LIDEL Edições Técnicas, 2003, p.121-140.

CHARTRAIN, M.; GREASHAM, R.; MOORE, J.; REIDER, P.; ROBINSON, D.; BUCKLAND, B. Asymmetric Bioreductions: application To The Synthesis Of Pharmaceuticals. **Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic**. v. 11, p. 503–512, 2001.

CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **AAPS Journal**. v. 8, p. 239-253, 2006.

COMASSETO, J. V.; ANDRADE, L. H.; OMORI, A. T.; ASSIS, L. F.; PORTO, A. L. M. 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, p. 55–61, 2004.

DE CONTI, R. M.; PORTO, A. L. M.; AUGUSTO, J. RODRIGUES, R. MORAN, P. J. S.; MANFIO, G. P.; MARSAIOLI, A. J. Microbial reduction of cyclohexanones. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 11, p. 233-236, 2001.

DEMAIN, A. L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 33. P. 486-495.

DESANTIS, G.; JONES, J. B. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 10, n. 4, p. 324-330, 1999.

ELIEL, E.L.; WILEN, S.H.; MANDER, L.N. **Stereochemistry of Organic Compounds**. Wiley Interscience: New York, 1994.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3. ed., Berlin: Springer-Verlag, 2004.

FATIMA, Y.; KANSAL, H. SONI, P.; BANERJEE, U. C. Enantioselective reduction of aryl ketones using immobilized cells of *Candida viswanathii*. **Process Biochemistry**. v. 42, p. 1412–1418, 2007.

GALM, U.; SHEN, B. Natural product drug discovery: the times have never been better. **Chemistry & Biology**. v. 14, p. 1098-1104, 2007.

HAGE, A.; PETRA, D. G. I.; FIELD, J. A.; SCHIPPER, D.; WIJNBERG, J. B. P. A.; KAMER, P. C. J.; REEK, J. N. H. Asymmetric reduction of ketones via whole cell bioconversions and transfer hydrogenation: complementary approaches. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 12, p. 1025–1034, 2001.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**. v. 5. p. 294-300, 2000.

HOMANN, M. J.; VALL, R. B.; PREVITE, E.; TAMAREZ, M.; MORGAN, B.; DODDS, D. R.; ZAKS, A. Rapid identification of enantioselective ketone reductions using targeted microbial libraries. **Tetrahedron**. v. 60, p. 789–797, 2004.

KATAOKA, M.; YAMAMOTO, K., KAWABATA, H.; WADA, W.; KITA, M.; YANASE, H.; SHIMIZU, S. Stereoselective reduction of ethyl 4- chloro-3-oxobutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the aldehyde reductase and glucose dehydrogenase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 51, p. 486–490, 1999.

KATAOKA, M.; KITA, K.; WADA, M.; YASOHARA, Y.; HASEGAWA, J.; SHIMIZO, S. Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 62, p. 437–445, 2003.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**. v. 15, p. 279-289, 2007.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Traduzido por: Simões, A.A. e Lodi, W.R.N, São Paulo: Savier, 2000, p. 273-293.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: Fundamentos e aplicações em Química Analítica. **Química Nova**. v.22, p. 229- 245, 1999.

MILAGRE, H. M. S. **Síntese biocatalítica de  $\beta$ -amino- $\alpha$ -hidroxiácidos. Aplicações na síntese de heterociclos quirais**. 2005. 279 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química, Campinas, 2005.

MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**. v. 24, n. 6, p. 893-897, 2001.

NAKAMURA, K., NAKAJIMA, N., KAWAI, Y., OHNO, A. Method for controlling the enantioselectivity of reduction with bakers' yeast. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 56, p. 4778-4783, 1991.

NAKAMURA, K.; KAWAI, Y.; NAKAJIMA, N.; OHNO, A. Method for controlling the enantioselectivity of reduction with baker s yeast. **Journal of Organic Chemistry**. v.56, n. 15,1991.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*. v. 17, p. 215-234, 2000.

PEREIRA, R. S. Projeto e Construção de um Bioreator para Síntese Orgânica Assimétrica Catalisada por *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Biológico de Padaria). **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 551-554, 1997.

PERLES, C. E. **Bioenergética do processo de biorredução da cetona próquiral acetoacetato de etila. Um estudo calorimétrico**. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química, Campinas, 2006.

PINHEIRO, S.; FERREIRA, V. F. Abordagens em síntese assimétrica. **Química Nova**. v. 21, n. 3, p. 312-318, 1998.

PIOVAN, L. **Biotransformação de compostos funcionalizados por fungos dasidiomicetos e desmetilação/desalquilação de aminas terciárias por fungos *Aspergillus terreus***. 2007. 143 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de São Paulo – Instituto de Química, São Paulo, 2007.

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

ROCHA, A. C. S. **Antagonismo in vitro de fungos endofíticos, isolados de *Hevea brasiliensis*, contra o *Microcyclus ulei* (fungo causador do malhas-folhas na serigueira)**. 2007. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.

ROCHA, G. P. **Bactérias associativas e simbiontes dos nódulos de *Arachis pinto* (Leguminosae)**. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.

RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**. v. 24, n. 6, p. 893-897, 2001.

SILVA, M. A.; MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. 13. ed. Lisboa: Fundação Gulbenkian, 1996.

SILVA, A. F. **Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de cachaça da Bahia**. 2009. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

SOLOMON, A. L.; WENDHAUSEN Jr., R. Estudo da biorredução de cetonas pró-quirais conduzida em sistemas bifásicos em biorreatores. **Dynamis revista tecnocientífica**. v. 13. n. 1. p. 39-45, 2007.

SONI, P.; KAUR, G.; CHAKRABORTI, A. K.; BANERJEE, U. C. Candida viswanathii as a novel biocatalyst for stereoselective reduction of heteroaryl methyl ketones: a highly efficient enantioselective synthesis of (S)- $\alpha$ -(3-pyridyl)ethanol. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 16, p. 2425–2428, 2005.

SOTAMAYOR, M.D. P; KUBOTA, L.T. **Enzymeless Biosensors: Uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos**. Química Nova, n. 1, Campinas, SP, 2002.

STINSON, S.C. Chiral Drugs. **Chemical & Engineering News**. v. 72. p. 38-72, 1994.

STRAATHORF, A. J. J., PANKE, S., SCHIMID, A. The Production of Fine Chemical by Biotransformation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 548-556, 2002.

TAPOLCZAY D. J. ; THOMAS E. J. ; WHITEHEAD J. W. F. ; Total synthesis of proxiphomin, a naturally occurring [13]cytochalasan. **Journal of the Chemical Society. Chemical communications**. n. 3, p. 143-145, 1985.

TEMBA, E.S, OLIVEIRA, I.M; DONICCI, C.L. **Álcoois Quirais : Métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica**. Química Nova, v. 26, n. 1, 2003.

TRAMPER, J. Chemical versus biochemical conversion: when and how to use biocatalysts. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 52, p. 345-376, 1996.

VIEIRA, M. R. **Estudo da Biorredução de Compostos Carbonílicos por Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp.** Dissertação de Mestrado, Blumenau, SC, 2006.

WENDHAUSEN, R. J., MORAN, P. J. S., JOÉKES, I., RODRIGUES, J. A. R. Continuous Process for Large-Scale Preparation Of Chiral Alcohols With Baker's Yeast. **Journal of Molecular Catalysis B – Enzymatic**. v. 5, p. 69-73, 1998.

WONG, C. H.; WHITESIDES,G. M. **Enzymes in synthetic organic chemistry**. New York: Elsevier Science,1994.

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

YANG, W.; XU, J. H.; XIE, Y. XU, Y.; ZHAO, G.; LIN, G. Q. Asymmetric reduction of ketones by employing *Rhodotorula* sp. AS2.2241 and synthesis of the b-blocker (R)-nifenalol. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 17, p. 1769–1774, 2006.

ZIKMUNDOVA, M.; DRANDAROV, K.; BIGLER, L.; HESSE, M.; WERNER, C. Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-one by fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 4863-4870, 2002.

**APÊNDICE A – Tabela x:** Relação dos reagentes e solventes utilizados com os respectivos fabricantes

<b>REAGENTE</b>	<b>FABRICANTE</b>
Acetato de Etila	Vetec
Acetona	Vetec
Acetofenona	Vetec
Agar-Ágar	Himedia
Borohidreto de sódio	Reagen
Cloreto de Amônio	Nuclear
Cloreto de sódio	Vetec
Etanol absoluto	Vetec
Extrato de Levedura	Himedia
Glucose anidra	Quimex
Hexano	Quimex
Metanol	Vetec
Peptona	Himedia
Sílica	Merck
Sulfato de Magnésio	Synth

---

**APÊNDICE B – Tabela** : Relação dos equipamentos utilizados com as respectivas marcas e modelos.

<b>EQUIPAMENTO</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>
Agitador magnético	Quimis	Q-261-22
Autoclave Vertical	Phoenix	AV 75
Balança semi-analítica	Bel	Mark 160
Balança Analítica	Shimadzu	AY 220
Coluna de separação quiral	SGE	-
Estufa de Secagem	Nova Ética	410/5
Evaporador Rotatório	Fisaton	-
Shaker (incubadora com agitação orbital)	Marconi	MA-420
Vortex (agitador de tubos)	Biomixer	QL-901

---

**ANEXO A – Protocolo para preparo de meios de cultura e soluções****MEIO DE CULTURA EXTRATO DE MALTE/LEVEDURA – PARA FUNGOS**

- Extrato de malte\_\_\_\_\_20g
- Extrato de Levedura\_\_\_\_\_2g
- Agar\_\_\_\_\_17g
- Água Destilada\_\_\_\_\_1000mL

**MEIO 79**

(FRED; WASKMAN, 1928)

- 10g de açúcar
  - 1mL  $k_2HPO_4/L$  solução 10%
  - 4mL  $KH_2PO_4/L$  solução 10%
  - 2mL  $MgSO_4 \cdot 7H_2O/L$  solução 10%
  - 1mL  $NaCl/L$  solução 10%
  - 0,4g de extrato de levedura em pó/ L de meio
  - 5mL de solução alcoólica 0,5% de azul de bromotimol
  - 15g de ágar bacteriológico
- 
- Completar para 1000mL com água destilada e ajustar o pH com NaOH 10% para 6,8 - 7,0.
  - Dissolver os reagentes em água destilada fervente.
  - Esterilizar

**Solução Salina**

100mL de água destilada  
0,45g de NaCl (450mg de NaCl)