

Vanessa Dutra Silva

**BIORREDUÇÃO DE OLEFINAS ATIVADAS CATALISADA
POR LEVEDURAS E FUNGOS EM MEIO AQUOSO OU
SISTEMA BIFÁSICO**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a Obtenção do Grau de Doutor em
Química

Orientador: Profa. Dra. Maria da Graça
Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Boris Ugarte
Stambuk

Florianópolis
2013

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

A ficha catalográfica é confeccionada pela Biblioteca Central.

Tamanho: 7cm x 12 cm

Fonte: Times New Roman 9,5

Maiores informações em:

<http://www.bu.ufsc.br/design/Catalogacao.html>

Vanessa Dutra Silva

**BIORREDUÇÃO DE OLEFINAS ATIVADAS CATALISADA
POR LEVEDURAS E FUNGOS EM MEIO AQUOSO OU
SISTEMA BIFÁSICO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “doutor”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de pós-graduação em química

Florianópolis, 21 de Fevereiro de 2013.

Prof. Almir Spinelli, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Maria da Graça Nascimento, Dr.^a

Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.

Prof. Paulo José Samenho Moran, Dr.

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.

Prof.^a Regina A.C. Gonçalves, Dr.^a

Prof. Luiz Augusto dos Santos
Madureira, Dr.

Prof. Ricardo José Nunes, Dr.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos familiares.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas que de algum modo me ajudaram em minha vida acadêmica, e minhas desculpas aqueles que por ventura minha memória não puder lembrar.

A Deus, que está sempre presente em minha vida;

À minha família por todo o amor e compreensão que recebi durante toda a minha vida;

À professora Maria da Graça Nascimento pela amizade, paciência e orientação na realização deste trabalho;

Ao professor Boris U. Stambuk pela orientação e contribuições indispensáveis para a realização deste trabalho;

Aos colegas e amigos do laboratório 301/306, Aline, Damianni, Marcelo, Patrícia, Thiago, Cristiane, Giselle, Carina, Fernanda, Alexandre, Isabel, Rosana, Flávia, Tiago Augustinho, Geovanni, Daniel, André, Simone, Kamila, Flávia, Jaqueline, César, Fabíola, Daiane, Julyetty, Mayara e Fernanda;

Aos meus amigos do curso e principalmente ao meu namorado Jeferson, por estar sempre ao meu lado apoiando e colaborando com amor e paciência;

Aos professores do Departamento de Química que colaboraram para minha formação acadêmica;

Ao professor Miguel Balparda Caro e aos funcionários da central de análise pela realização das análises de RMN de ^1H ;

Aos Professores Eduardo Carasek da Rocha e Luiz Augusto dos Santos Madureira e ao doutorando Jeferson Schneider Carletto pela colaboração;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Catálise em Sistemas Moleculares e Nanoestruturados (INCT-CMN) pelo apoio financeiro;

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte na realização deste trabalho;

Aos Professores Sandra Zanotto, Luciana Boer e Luciano da Silva do grupo de pesquisa do laboratório de Bio-orgânica da Universidade Estadual do Amazonas (UEA) pela doação dos fungos isolados de plantas da floresta amazônica, e pela doação das fotos dos fungos;

À Alice Heidrich Prompt do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelo crescimento das leveduras *Cryptococcus flavescens* (*Cryptococcus laurentii*, Pal) e *Spathaspora xylofermentans* (Spat).

"Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso."

(Albert Einstein)

RESUMO

Neste trabalho as olefinas eletronicamente ativadas com grupos retiradores de elétrons, (4*R*)-carvona (**7**), (4*S*)-carvona (**8**), (6*E*)-2-metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona (**22**), (3*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona (**23**), (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (**24**) e 3-metil-ciclo-hexen-2-ona (**25**), foram utilizadas como substratos nas reações de biorredução mediadas por leveduras ou fungos em meio aquoso ou em sistema bifásico. Primeiramente, realizou-se a otimização das condições reacionais para a biorredução do substrato **7** com fermento de pão comercial (FP, *Saccharomyces cerevisiae*), onde avaliou-se o efeito do sistema biocatalítico, concentração de levedura e substrato, temperatura, pH, adição de aditivos e porcentagem volumétrica do aditivo. As condições ótimas obtidas na redução da (4*R*)-carvona mediada por FP foram, quando a reação foi realizada em meio aquoso, concentração de substrato e levedura de 16,6 mmol L⁻¹ e 100,0 g L⁻¹, temperatura de 25 °C, pH 7,5, e com os aditivos DMSO, trealose e sacarose. Após ter obtido as melhores condições na biotransformação de **7**, realizou-se a biorredução das demais olefinas. A biotransformação de **7**, **22**, **23**, **24**, **25** e **8** originou as cetonas saturadas (1*R*,4*R*)-di-hidrocarvona (**10**) (conv. 70% e *e.d.* de 97%), 2-metil-6-(4-nitrofenilmetil)-ciclo-hexanona (**33**) (conv. 59% e *e.d.* de 38%), (3*S*)-3-metil-4-fenil-2-butanona (**34**) (conv. 33% e *e.e.* de 64%), 3-difenil-2-propen-1-ona (**35**) (conv. >99%) e 3-metil-ciclo-hexanona (**36**) (conv. 4% com *e.e.* de 56%) pela redução da ligação dupla C=C e do álcool saturado (1*R*,2*R*,4*S*)-di-hidrocarveol (**12**) (conv. 4% e *e.d.* de >99%) pela redução das ligações duplas C=C e C=O, respectivamente. Como foram obtidas conversões baixas em **12** e em **34**, optou-se por otimizar também as condições reacionais para os substratos **8** e **22**, a fim de obter esses produtos com altas conversões e *e.d.* ou *e.e.*. Todos os parâmetros reacionais influenciaram na formação de **10**, **12** e **34**, porém a temperatura e concentração de substrato foram os mais importantes. Na biotransformação de **8**, além de utilizar a levedura *S. cerevisiae* como biocatalisador, os fungos isolados da *Aspidosperma excelsum* Benth (carapanaúba) (CG 0504 e CF 0305) e as leveduras *Cryptococcus flavescens* e *Spathaspora xylofermentans* também foram utilizadas. Pelos resultados obtidos, estes fungos e leveduras apresentaram um grande potencial para serem utilizados como biocatalisadores. Neste trabalho, foi também desenvolvido um novo método de extração dos reagentes e produtos do meio aquoso e/ou do

sistema bifásico baseado em microextração em fase líquida com fibras ocas de polipropileno (HF-LLLME). As vantagens deste método em relação à extração líquido-líquido convencional são a menor geração de resíduos (solvente orgânico) e tempo necessário para extração. Concluindo, o uso de micro-organismos como biocatalisadores na biotransformação de olefinas ativadas em meio aquoso mostrou-se uma alternativa viável para a obtenção de compostos com alta pureza ótica, sendo utilizadas condições brandas de reação e reagentes de custo relativamente baixo, além de ser um método menos poluente para o meio ambiente.

Palavras-chave: Biorredução. Olefinas ativadas. Leveduras. Fungos. Aditivos.

ABSTRACT

In this study, the electronically activated alkenes with electron-withdrawing groups, such as (4*R*)-carvone (**7**), (4*S*)-carvone (**8**), (6*E*)-2-methyl-6-[(4-nitrophenyl)methylene]-cyclohexanone (**22**), (3*E*)-3-methyl-4-phenyl-3-buten-2-one (**23**), (2*E*)-1,3-diphenyl-2-propen-1-one (**24**) and 3-methyl-cyclohexen-2-one (**25**) were used as substrates in the bioreduction reaction mediated by yeasts and fungi in aqueous media or in biphasic systems. Firstly, the optimization of experimental condition on the bioreduction of **7** catalyzed by commercial baker's yeast (BY, *Saccharomyces cerevisiae*) was carried out, where the effect of biocatalyst system, yeast and substrate concentration, temperature, pH, addition of additives and volumetric percentage of additives were evaluated. The optimum conditions obtained in the reduction of (4*R*)-carvone mediated FP were when the reaction was carried out in aqueous medium, substrate concentration and yeast of 16.6 mmol L⁻¹ and 100.0 g L⁻¹, temperature 25 °C, pH 7.5, and with the additives DMSO, trehalose and sucrose. Then, and using the best reaction conditions obtained on the biotransformation of **7**, the bioreduction of the other electronically activated alkenes was performed. The biotransformation of **7**, **23**, **24**, **25** e **8** formed the corresponding saturated ketones (1*R*,4*R*)-dihydrocarvone (**10**) (conv. 70% and *d.e.* of 97%), 2-methyl-6-(4-nitrophenylmethyl)-cyclohexanone (**33**) (conv. 59% and *d.e.* of 38%), (3*S*)-3-methyl-4-phenyl-2-butanone (**34**) (conv. 33% and *e.e.* of 64%), 3-diphenyl-2-propen-1-one (**35**) (conv. >99%) by the reduction of C–C double bond, and the saturated alcohol (1*R*,2*R*,4*S*)-dihydrocarveol (**12**) (conv. 4% and of >99%) by the reduction of C–C and C–O double bond, respectively. As low conversions into **12** and **34** were obtained, the optimization of experimental conditions on the bioreduction of **8** and **23**, also was carried out to obtain the product in higher conversions and *d.e.* or *e.e.*. The reaction parameters influenced the formation of **10**, **12** and **34**, however temperature and substrate concentrations were the most outstanding. In the biotransformation of **8**, besides using the yeast *S. cerevisiae* as biocatalyst, the isolated fungus from *Aspidosperma excelsum* Benth (carapanaúba) (CG 0504 e CF 0305) and the yeast *C. flavescens* e *S. xylofermantan* were used. From the obtained results, these fungi and yeasts showed a great potential to be used as biocatalysts. In this study, a new and green methodology for the extraction of reagents and products from the aqueous media or biphasic

system based on a liquid-liquid-liquid micro extraction with porous hollow fiber polypropylene membranes (HF-LLLME) is also reported. The main advantages of this methodology in relation to conventional liquid-liquid extraction are the smallest waste generation (organic solvent) and the time required for extraction. In conclusion, the use of microorganisms as biocatalysts in the biotransformation of electronically activated alkenes compounds in aqueous media is a viable alternative to obtain compounds with high optical purity, under mild reaction conditions, low cost reagents and environmental pollution.

Keywords: Bioreduction. Activated alkenes. Yeast. Fungus. Additives.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática das estruturas primária (A), secundária (α -hélice (B) Folha β (C)), terciária (D) e quartenária (E) das proteínas.3
- Figura 2. Sítio ativo da LADH complexada com álcool pentafluorobenzílico e cofator NAD^+4
- Figura 3. Representação esquemática dos modelos que descrevem a ligação de um substrato em uma enzima. Modelo da chave-fechadura (A) e modelo do encaixe induzido (B).5
- Figura 4. Diagrama de energia de uma reação catalisada e não catalisada. ...6
- Figura 5. Estrutura dos cofatores NAD(H) (1) e NADP(H) (2) na forma oxidada (a) e reduzida (b).9
- Figura 6. Mecanismo de transferência de hidreto das coenzimas NAD(P)H para compostos carbonílicos..... 10
- Figura 7. Regra de Prelog para adição de hidreto na carbonila. 11
- Figura 8. Biotransformações competitivas utilizando células íntegras. 11
- Figura 9. Fotos de fungos de plantas da floresta Amazônica. 12
- Figura 10. Representação esquemática da proposta mecanística da redução de olefinas ativadas mediada por enoato redutases dependentes de FMN... 13
- Figura 11. Biorredução de aldeído α,β -insaturado catalisada por células íntegras. 14
- Figura 12. Redução do 2-fenil-2-propenal (3) mediada por FP em meio orgânico..... 14
- Figura 13. Fórmulas estruturais das carvonas. 15
- Figura 14. Fórmulas estruturais das di-hidrocarvonas. 16
- Figura 15. Fórmulas estruturais dos di-hidrocarveóis..... 16

- Figura 16. Compostos com atividade biológica obtidos a partir das (+)-di-hidrocarvonas..... 17
- Figura 17. Síntese do thujupseno a partir da (+)-di-hidrocarvona. [Reagentes e condições (a) Ref. 6 de ZHANG et al., 2008); (b) MeI, KO-*t*-Bu, *t*-BuOH; (c) *p*-TsOH, C₆H₆, 60 °C; (d) NH₂NH₂, Na, (HOCH₂CH₂)₂O, (e) OsO₄, NaIO₄, CH₃CN; (f) DIBAL-II, -78 °C; (g) CH₂I₂, Zn(Ag), Et₂O; (h) DMSO, (COCl)₂, NEt₃, CH₂Cl₂, -78 °C a t.a.; (i) Refs. 2,3 de ZHANG et al., 2008)] 18
- Figura 18. Produtos da biorredução da (4*R*)- e (4*S*)-carvona (**7** e **8**) mediada por leveduras, plantas e algas. 19
- Figura 19. Estereoquímica da redução das ligações duplas C=C e C=O da (4*R*)-carvona mediada pela *A. longa*..... 20
- Figura 20. Sistema bifásico usado nas reações mediadas por micro-organismos..... 21
- Figura 21. Estrutura da trealose. 22
- Figura 22. Ilustração da biotransformação assimétrica da 2-octanona para (4*R*)-2-octanol mediada por *E. coli* em sistema bifásico com líquido iônico. 25
- Figura 23. Variação do rendimento e *e.e.* na biotransformação assimétrica da 2-octanona para (4*R*)-2-octanol mediada por *E. coli* em sistema bifásico com vários líquidos iônicos. 26
- Figura 24. Estrutura de uma fase estacionária quiral contendo β-ciclo-dextrina (Chirasil-Dex)..... 27
- Figura 25. Configurações da HF-LPME mais empregadas. Sistema em “U” (A) e sistema tipo “haste” (B)..... 29
- Figura 26. Representação esquemática das etapas do procedimento proposto para a extração dos reagentes e produtos do meio aquoso para o monitoramento da biorredução das olefinas ativadas usando HF-LLLME com membrana porosa de polipropileno. 45
- Figura 27. Cromatograma de CG-quiral de uma alíquota da biorredução da (4*R*)-carvona mediada por FP em meio aquoso. Compostos: (1*S*,4*R*)-*cis*-di-hidrocarvona (pico A), (1*R*,4*R*)-*trans*-di-hidrocarvona (pico B), (1*R*,2*S*,4*R*)-

di-hidrocarveol (pico C), (4 <i>R</i>)-carvona (pico D) [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.1.]	46
Figura 28. Redução <i>via</i> química da (4 <i>R</i>)-carvona com zinco metálico.	50
Figura 29. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução da (4 <i>R</i>)-carvona (pico C) com zinco metálico. Compostos: (1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)- 9 (pico A) e (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)- 9 (pico B). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.1.]	51
Figura 30. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação <i>via</i> química da (4 <i>R</i>)-carvona com zinco metálico. Compostos: (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)- 9 (pico A), (1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)- 9 (pico B) e 7 (pico C). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.1.]	52
Figura 31. Propostas de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas das di-hidrocarvonas (picos A e B da Figura 30).	53
Figura 32. Espectro de RMN de ¹ H dos produtos obtidos na reação <i>via</i> química da (4 <i>R</i>)-carvona com zinco metálico. [CDCl ₃ , 400 MHz]	54
Figura 33. Redução <i>via</i> química da (4 <i>R</i>)-carvona com NaBH ₄ para obtenção dos carveóis (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 29 e (1 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 29	55
Figura 34. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na redução <i>via</i> química da (4 <i>R</i>)-carvona com NaBH ₄ . [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.1.]	55
Figura 35. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação <i>via</i> química da (4 <i>R</i>)-carvona com NaBH ₄ . Compostos: Di-hidrocarveóis (pico A) e carveóis (pico B). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.1.]	56
Figura 36. Produtos obtidos na redução <i>via</i> química de 7 com NaBH ₄	57
Figura 37. Propostas de fragmentação para os principais picos obtidos nos espectros de massas dos carveóis (A) e di-hidrocarveóis (B).	58
Figura 38. Espectro de IV dos produtos obtidos na redução <i>via</i> química de 7 com NaBH ₄ . [Filme]	59

Figura 39. Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na redução *via* química de **7** com NaBH_4 . [CDCl_3 , 400 MHz].....59

Figura 40. Prováveis produtos obtidos na biotransformação da (4*R*)-carvona mediada por leveduras.....61

Figura 41. Sobreposição dos cromatogramas dos produtos obtidos na reação de redução *via* química de **7** com zinco metálico (verde), redução *via* química de **7** com NaBH_4 (vermelho) e na biotransformação de **7** mediada por FP (azul). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.1.].....62

Figura 42. Sobreposição dos cromatogramas dos produtos obtidos na redução *via* química de **7** com NaBH_4 (preto) e do padrão (–)-di-hidrocarveol (vermelho). Compostos: (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** (pico A); (1*R*,2*R*,4*R*)-**11** (pico B); (1*S*,2*S*,4*R*)-**11** (pico C); (1*S*,2*R*,4*R*)-**11** (pico D) e **29** (pico E). [Condições de programação de CG-quiral: descritos no item 3.12.1.]63

Figura 43. Valores de conversão em **9** (■) e **11** (●) e excesso diastereoisomérico de (1*R*,4*R*)-**9** (□) e (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** (○) em função da concentração de levedura. [Condições reacionais: FP Fleischmann (2 – 6 g); **7** (0,5 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato (0,2 mol L⁻¹/0,1 mol L⁻¹, pH 5,5); 35 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm)].....66

Figura 44. Valores de conversão em **9** (■) e **11** (●) e excesso diastereoisomérico de (1*R*,4*R*)-**9** (□) e (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** (○) em função da concentração de substrato. [Condições reacionais: FP Fleischmann (3 g); **7** (0,5 mmol – 5,0 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato (0,2 mol L⁻¹/0,1 mol L⁻¹, pH 5,5); 35 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm)].....68

Figura 45. Valores de conversão em **9** (■) e **11** (●) e excesso diastereoisomérico de (1*R*,4*R*)-**9** (□) e (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** (○) em função da temperatura. [Condições reacionais: FP Fleischmann (3 g); **7** (0,5 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato (0,2 mol L⁻¹/0,1 mol L⁻¹, pH 5,5); 22 – 40 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm)].....69

Figura 46. Valores de conversão em **9** (■) e **11**(●) e excesso diastereoisomérico de (1*R*,4*R*)-**9** (□) e (1*R*,2*S*,4*R*)-**11**(○) em função do pH do meio. [Condições reacionais: FP Fleischmann (3 g); **7** (0,5 mmol); 30 mL de tampão (0,1 mol L⁻¹ pH 3,5 – 10,5); 26 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm)].....71

- Figura 47. Produtos obtidos na biotransformação da (4*S*)-carvona mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO (10% v/v). 77
- Figura 48. Produtos obtidos na biotransformação da (6*E*)-2-metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO (10% v/v). 78
- Figura 49. Produtos obtidos na biotransformação da (3*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO (10% v/v). 79
- Figura 50. Produtos obtidos na biotransformação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO (10% v/v). 79
- Figura 51. Produtos obtidos na biotransformação da 3-metil-ciclo-hexen-2-ona mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO (10% v/v). 80
- Figura 52. Curva de calibração de uma solução de FP com diferentes proporções da (4*S*)-carvona **8**, das di-hidrocarvonas **10** e dos di-hidrocarveóis **12**, para verificar a eficiência da HF-LLLME com membrana porosa de polipropileno. 81
- Figura 53. Influência da adição de NaCl e do tempo na microextração de uma mistura reacional contendo a (4*S*)-carvona (A), as (1*R*,4*S*)- e (1*S*,4*S*)-di-hidrocarvonas (B) e a mistura de di-hidrocarveol (C). 82
- Figura 54. Valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função da razão (S/L) e concentração da levedura. [*Condições reacionais*: FP Dona Benta (3 g); **8** (0,2 – 0,8 mmol); 20 – 40 mL tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 26 °C; 24 h; agitação orbital (150 rpm)] 88
- Figura 55. Valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função da temperatura e tempo reacional. [*Condições reacionais*: FP Dona Benta (3 g); **8** (0,2 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 20 – 50 °C; 24 – 72 h; agitação orbital (150 rpm)] 89
- Figura 56. Valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função do pH e da concentração do tampão. [*Condições reacionais*: FP Dona Benta (3 g); **8** (0,2 mmol); 30 mL tampão citrato/fosfato/borato (0,01 – 0,1 mol L⁻¹, pH 3,5 – 11,5); 40 °C; 48 h; agitação orbital (150 rpm)] 91

- Figura 57. Valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função da adição de aditivos usando uma superfície triangular. [*Condições reacionais*: FP Dona Benta (3 g); **8** (0,2 mmol); 27 mL de tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 3 mL aditivo; 40 °C; 48 h; agitação orbital (150 rpm)].....92
- Figura 58. Valores de conversão em **34** em função da concentração de levedura e substrato. [*Condições reacionais*: FP Dona Benta (3 g); **23** (0,5 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 25 °C; 24 h; agitação orbital (150 rpm)]96
- Figura 59. Valores de conversão em **34** (■) e excesso enantiomérico de (3*S*)-**34** (□) em função do pH do meio. [*Condições reacionais*: FP Dona Benta (3 g); **23** (0,25 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 3,5 – 11,5); 25 °C; 24 h; agitação orbital (150 rpm)]97
- Figura 60. Valores de conversão em **34** em função da temperatura e tempo reacional. [*Condições reacionais*: FP Dona Benta (3 g); **23** (0,25 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 20 – 40 °C; 3 – 9 h; agitação orbital (150 rpm)]98
- Figura 61. Espectro de RMN de ¹H de **22**. [CDCl₃, 400 MHz]..... 120
- Figura 62. Espectro de IV de **22**. [Pastilha de KBr] 121
- Figura 63. Cromatograma de CG-quiral de **22**. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.3.] 121
- Figura 64. Cromatograma de íons totais e espectro de massas de **22** (pico A). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.3.].... 122
- Figura 65. Espectro de RMN de ¹H de **23**. [CDCl₃, 400 MHz]..... 123
- Figura 66. Cromatograma de CG-quiral de **23**. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.4.] 123
- Figura 67. Espectro de RMN de ¹H de **24**. [CDCl₃, 400 MHz]..... 124
- Figura 68. Espectro de IV de **24**. [Pastilha de KBr] 125
- Figura 69. Cromatograma de CG-quiral de **24**. Compostos: (*Z*)-**24** (pico A) e (*E*)-**24** (pico B). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.5.]..... 125

- Figura 70. Cromatograma de íons totais e espectro de massas de **24**. Compostos: (*Z*)-**24** (pico A) e (*E*)-**24** (pico B). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.5.]..... 126
- Figura 71. Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com zinco metálico. [CDCl_3 , 400 MHz] 127
- Figura 72. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com zinco metálico. Compostos: (1*S*,4*S*)-**10** (pico A) e (1*R*,4*S*)-**10** (pico B). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.2.]..... 127
- Figura 73. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com zinco metálico. Compostos: (1*S*,4*S*)-**10** (pico A) e (1*R*,4*S*)-**10** (pico B). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.2.] 128
- Figura 74. Espectro de RMN de ^1H de **34**. [CDCl_3 , 400 MHz]..... 129
- Figura 75. Cromatograma de CG-quiral de **34**. Compostos: (3*R*)-**34** (pico A) e (3*S*)-**34** (pico B). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.4.]..... 129
- Figura 76. Espectro de RMN de ^1H de **36**. [CDCl_3 , 400 MHz]..... 130
- Figura 77. Espectro de IV de **36**. [Filme]..... 131
- Figura 78. Cromatograma de CG-quiral de **36**. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.6.] 131
- Figura 79. Cromatograma de íons totais e espectro de massas de **36**. [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.6.]..... 132
- Figura 80. Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com NaBH_4 . [CDCl_3 , 400 MHz]..... 133
- Figura 81. Espectro de IV dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com NaBH_4 . [Filme] 134
- Figura 82. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com NaBH_4 . [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.2.] 134

- Figura 83. Cromatograma de CG-quiral de **12** (mistura de diastereoisômeros). Compostos: (1*S*,2*R*,4*S*)-**12** (pico A), (1*S*,2*S*,4*S*)-**12** (pico B), (1*R*,2*S*,4*S*)-**12** (pico C) e (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** (pico D). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.2.] 135
- Figura 84. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com NaBH₄. Compostos: **12** (pico A) e **30** (pico B). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.2.]..... 136
- Figura 85. Espectro de RMN de ¹H de **26**. [CDCl₃, 400 MHz]..... 137
- Figura 86. Espectro de IV de **26**. [Filme]..... 138
- Figura 87. Cromatograma de CG-quiral de **26**. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.3.] 138
- Figura 88. Espectro de RMN de ¹H de **27**. [CDCl₃, 400 MHz]..... 139
- Figura 89. Cromatograma de CG-quiral de **27**. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.4.] 139
- Figura 90. Espectro de RMN de ¹H de **28**. [CDCl₃, 400 MHz]..... 140
- Figura 91. Espectro de IV de **28**. [Pastilha de KBr] 140
- Figura 92. Espectro de RMN de ¹H dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com NaBH₄. [CDCl₃, 400 MHz]..... 141
- Figura 93. Espectro de IV dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com NaBH₄. [Filme] 142
- Figura 94. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com NaBH₄. Compostos: **37** (picos A e B) e **31** (picos C e D). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.6.] 142
- Figura 95. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com NaBH₄. Compostos: **37** (Pico A) e **31** (pico B). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.6.]..... 143

- Figura 96. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com FP. Compostos: **10** (picos A e B), **8** (pico C) e **12** (pico D). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.2.] 144
- Figura 97. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com FP. Compostos: **10** (picos A e B) e **12** (pico C). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.2.] 145
- Figura 98. Sobreposição dos cromatogramas dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com zinco metálico (azul), reação de redução de **8** com NaBH₄ (lilás), biotransformação de **8** mediada por FP (laranja), mistura dos 4 diastereoisômeros **12** (verde) e substrato **8** (vermelho). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.2.] 146
- Figura 99. Espectro de RMN de ¹H dos produtos obtidos na reação de redução de **22** com FP. [CDCl₃, 400 MHz]..... 147
- Figura 100. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação de redução de **22** com FP. Compostos: **33** (pico A), **32** (pico B) e **22** (pico C). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.3.]..... 148
- Figura 101. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **22** com FP. Compostos: **33** (picos A e B), **32** (pico C) e **22** (pico D). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.3.] 149
- Figura 102. Espectro de RMN de ¹H dos produtos obtidos na reação de redução de **23** com FP. [CDCl₃, 400 MHz]..... 150
- Figura 103. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **23** com FP. Composto: **34** (picos A e B). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.4.] 150
- Figura 104. Sobreposição dos cromatogramas dos produtos obtidos na reação de redução de **23** com zinco metálico (A), biotransformação de **23** mediada por FP (B), substrato **23** (C) e reação de redução de **23** com NaBH₄ (D). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.4.] 151
- Figura 105. Espectro de RMN de ¹H do produto obtido na reação de redução de **24** com FP. [CDCl₃, 400MHz]..... 152

Figura 106. Espectro de IV do produto obtido na reação de redução de **24** com FP. [pastilha de KBr] 152

Figura 107. Sobreposição dos cromatogramas de **24** (pico B), do álcool **28** (pico C) e do produto da reação biocatalisada **35** (pico A). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.5.] 153

Figura 108. Cromatograma e espectro de massas do produto obtido na reação de redução de **24** com FP. Compostos: (*Z*)-**24** (pico A), **35** (pico B) e (*E*)-**24** (pico C). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.5.] 154

Figura 109. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com FP. Compostos: **36** (picos A e B) e **25** (pico C). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.6.] 155

Figura 110. Sobreposição dos cromatogramas dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com H₂, Pd/C (verde), reação de redução de **25** com NaBH₄ (azul) e substrato **25** (vermelho). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.6.] 155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do cossustrato na redução da 2-hidroxi-1-feniletanona. . .	23
Tabela 2. Exemplos dos LIs mais utilizados em biocatálise.	24
Tabela 3. Dados referentes à superfície apresentada na Figura 55.	49
Tabela 4. Influência do meio reacional na biorredução da (4 <i>R</i>)-carvona mediada por FP, CAT-1 e PE-2. ^a	65
Tabela 5. Influência da adição de aditivos na biorredução da (4 <i>R</i>)-carvona mediada por FP em meio aquoso. ^a	72
Tabela 6. Influência da porcentagem de DMSO na biorredução da (4 <i>R</i>)-carvona mediada por FP em meio aquoso. ^a	74
Tabela 7. Biorredução de olefinas ativadas mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO. ^a	76
Tabela 8. Influência do meio reacional na biorredução da (4 <i>S</i>)-carvona mediada por FP. ^a	84
Tabela 9. Influência da velocidade de agitação na biorredução da (4 <i>S</i>)-carvona mediada por FP em meio aquoso. ^a	85
Tabela 10. Biorredução da (4 <i>S</i>)-carvona em meio aquoso com diferentes leveduras de <i>S. cerevisiae</i> . ^a	86
Tabela 11. Influência do tipo de tampão na biorredução da (4 <i>S</i>)-carvona mediada por FP em meio aquoso. ^a	87
Tabela 12. Biorredução da (4 <i>S</i>)-carvona com diferentes leveduras e fungos em meio aquoso. ^a	94
Tabela 13. Influência da adição de aditivos na biorredução da olefina ativada 23 mediada por FP em meio aquoso. ^a	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[BMIm][BF ₄]	Tetrafluorborato de 1-butil-3-metil imidazólio
[BMIm][PF ₆]	Hexafluorfosfato de 1-butil-3-metil imidazólio
[BMPy][BF ₄]	Tetrafluorborato de 1-butil-4-metil piridínio
[α] _D	Rotação ótica específica
BDA	batata-dextrose-ágar
<i>c</i>	Conversão
CAT-1	Levedura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> industrial
CBD	canabidiol
CB-FDH	Formato desidrogenase de <i>Candida boidinii</i>
CBN	canabinol
CCD	Cromatografia de camada delgada
CD	Ciclo-dextrina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia em fase gasosa
CG/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG-quiral	Cromatografia em fase gasosa com fase estacionária quiral
<i>d</i>	Dupleto
Da	Dalton
dd	Duplo-dupleto
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.C.1.1.1.1.	Classificação das desidrogenases e redutases
<i>e.d.</i>	Excesso diastereoisomérico
<i>e.e.</i>	Excesso enantiomérico
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FID	Detector por ionização em chama
FMN	Flavina mononucleotídeo
FP –	Fermento de pão comercial
G	Glicerol
GC/EM/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas sequencial
HF-LLME	Microextração líquido-líquido-líquido com membrana porosa
HF-LPME	Microextração em fase líquida com fibras ocas
HPR	2-Hidroxi-feniletanona
IV	Infravermelho

L	Levedura
LB-ADH	Álcool desidrogenase de <i>Lactobacillus brevis</i>
LLE	Extração líquido-líquido
m	Múltiplo
MHz	Mega Hertz (10 ⁶ Hertz)
NAD ⁺	Forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP ⁺	Forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
p.f.	Ponto de fusão
Pal	<i>Cryptococcus flavescens</i>
PDB	Banco de Dados de Proteínas
PE-2	Levedura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> industrial
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ² D	Ressonância magnética nuclear de deutério
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta
s	Simpleto
S	Substrato
S/L	Substrato/Levedura
Sac	Sacarose
Spat	<i>Spathaspora xylofermentans</i>
SPE	Extração em fase sólida
T	Trealose
THF	Tetra-hidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
t _R	Tempo de retenção
UIBBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
Δ ⁹ -THC	Δ ⁹ -tetraidrocannabinol
α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento químico
γ	Gama

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
SUMÁRIO	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2. ENZIMAS	2
1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS	7
1.4. BIOTRANSFORMAÇÕES DE OLEFINAS ATIVADAS MEDIADAS POR MICRO-ORGANISMOS.....	12
1.5. MEIO REACIONAL	20
1.6. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL.....	27

1.7. EXTRAÇÃO DOS REAGENTES E PRODUTOS DO MEIO AQUOSO PARA MONITORAMENTO DAS CONVERSÕES EM CG-QUIRAL	28
1.8. METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	30
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. PARTE EXPERIMENTAL	33
3.1. EQUIPAMENTOS	33
3.2. REAGENTES, SOLVENTES E BIOCATALISADORES	33
3.2.1. Reagentes, solventes e membrana	33
3.2.2. Biocatalisadores	34
3.3. CRESCIMENTO DOS FUNGOS.....	35
3.4. PREPARAÇÃO DAS OLEFINAS ATIVADAS 22 , 23 E 24	35
3.4.1. Preparação das olefinas ativadas 22 e 24 <i>via</i> condensação aldólica básica	35
3.4.1. Preparação da olefina ativada 23 <i>via</i> condensação aldólica ácida	37
3.5. PREPARAÇÃO DAS DI-HIDROCARVONAS A PARTIR DE 7 E 8	37
3.6. PREPARAÇÃO DA (<i>R,S</i>)-3-METIL-4-FENIL-2-BUTANONA 34	39
3.7. PREPARAÇÃO DA (<i>R,S</i>)-3-METIL-CICLO-HEXANONA 36	39

3.8. REDUÇÃO VIA QUÍMICA DAS OLEFINAS ATIVADAS	40
3.9. REDUÇÃO VIA ENZIMÁTICA DAS OLEFINAS ATIVADAS	43
3.10. REDUÇÃO EM MICROESCALA DA (4S)-CARVONA MEDIADAS POR LEVEDURAS E FUNGOS.....	44
3.11. MICROEXTRAÇÃO COM MEMBRANA (HF-LLLME).....	44
3.12. DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS	45
3.12.1. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a (4R)- carvona 7	47
3.12.2. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a (4S)- carvona 8	47
3.12.3. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a (6E)- 2-metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona 22	48
3.12.4. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a (3E)- 3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona 23	48
3.12.5. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a (2E)- 1,3-difenil-2-propen-1-ona 24	48
3.12.6. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a 3- metil-ciclo-hexen-2-ona 25	48
3.13. ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. REDUÇÃO VIA QUÍMICA E ENZIMÁTICA DA (4R)-CARVONA	50
4.1.1. Preparação das di-hidrocarvonas com zinco metálico	50
4.1.2. Preparação dos álcoois com NaBH ₄	54

4.1.3. Redução <i>via</i> enzimática da (4 <i>R</i>)-carvona com leveduras <i>S. cerevisiae</i>	60
4.1.3.1. Efeito do meio reacional.....	64
4.1.3.2. Efeito da concentração de levedura	66
4.1.3.3. Efeito da concentração de substrato	67
4.1.3.4. Efeito da temperatura	69
4.1.3.5. Efeito do pH do meio	70
4.1.3.6. Efeito da adição de aditivos.....	71
4.1.3.7. Efeito da porcentagem volumétrica de aditivos.....	73
4.2. REDUÇÃO VIA ENZIMÁTICA DE VÁRIAS OLEFINAS ATIVADAS COM LEVEDURAS DE <i>S. CEREVISIAE</i>	74
4.3. TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO.....	80
4.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS NA REDUÇÃO VIA ENZIMÁTICA DA (4 <i>S</i>)-CARVONA COM LEVEDURAS <i>S. CEREVISIAE</i>	83
4.4.2. Efeito do meio reacional	83
4.4.3. Efeito da velocidade de agitação (rpm).....	84
4.4.4. Efeito do uso de diferentes marcas de fermentos	85
4.4.5. Efeito do uso de diferentes tampões	86
4.4.6. Efeito da razão Substrato/Levedura (S/L) <i>versus</i> concentração de levedura.....	87
4.4.7. Efeito da temperatura e do tempo	89
4.4.8. Efeito do pH e da concentração do tampão	90
4.4.9. Efeito da adição de aditivos.....	91

4.4.10. Biorredução da (4 <i>S</i>)-carvona com diferentes leveduras e fungos em micro escala	93
4.5. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS DA REDUÇÃO VIA ENZIMÁTICA DA (3 <i>E</i>)-3-METIL-4-FENIL-3-BUTEN-2-ONA COM FP	95
4.5.1. Efeito da concentração de levedura e de substrato	95
4.5.4. Efeito do pH do meio aquoso	97
4.5.2. Efeito da temperatura e do tempo reacional	97
4.5.3. Efeito da adição de aditivos	98
5. CONCLUSÕES	101
6. PERSPECTIVAS	104
REFERÊNCIAS	105
APÊNDICE A – ESPECTROS E CROMATOGRAMAS	120
A.1. PREPARAÇÃO DAS OLEFINAS ATIVADAS 22 , 23 E 24	120
A.1.1. (6 <i>E</i>)-2-Metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona 22	120
A.1.2. (3 <i>E</i>)-3-Metil-4-fenil-3-buten-2-ona 23	123
A.1.3. (2 <i>E</i>)-1,3-Difenil-2-propen-1-ona 24	124
A.2. PREPARAÇÃO DA (1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)- E (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-DI-HIDROCARVONA 10	127
A.3. PREPARAÇÃO DA (3 <i>R</i> , <i>S</i>)-3-METIL-4-FENIL-2-BUTANONA 34	129

A.4. PREPARAÇÃO DA 3-METIL-CICLO-HEXANONA 36	130
A.5. PREPARAÇÃO DOS ÁLCOOIS 30, 26, 27, 28 E 31	133
A.5.1. (1 <i>R,S</i>)-2-Metil-5-(1-metiletenil)-2-ciclo-hexen-1-ol 30	133
A.5.2. (1 <i>R,S</i>)-(6 <i>E</i>)-2-Metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanol 26	137
A.5.3. (1 <i>R,S</i>)-(3 <i>E</i>)-3-Metil-4-fenil-3-buten-2-ol 27	139
A.5.4. (1 <i>R,S</i>)-(2 <i>E</i>)-1,3-Difenil-2-propen-1-ol 28	140
A.5.5. (1 <i>R,S</i>)-3-Metil-2-ciclo-hexen-1-ol 31	141
A.6. REDUÇÃO VIA ENZIMÁTICA DE 8, 22, 23, 24 E 25	144
A.6.1 Redução de 8 com FP	144
A.6.2 Redução de 22 com FP	147
A.6.3. Redução de 23 com FP	150
A.6.4. Redução de 24 com FP	152
A.6.5. Redução de 25 com FP	155
APÊNDICE B – PRODUÇÃO ACADÊMICA DURANTE O PERÍODO DE 2009 - 2013	156

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A biocatálise tem se tornado uma ferramenta valiosa para a produção de compostos enantiomericamente puros, que são de fundamental importância para a síntese de produtos naturais e de substâncias biologicamente ativas (FABER, 2011) (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009). Esta metodologia vem sendo muito utilizada na síntese de produtos farmacêuticos, onde é amplamente reconhecido que estes não devem ser empregados como racematos, devido às grandes diferenças observadas na atividade biológica dos estereoisômeros (enantiômeros e diastereoisômeros) (RODRIGUES; MORAN, 2001). Além disso, é necessário o desenvolvimento de reagentes e processos ambientalmente compatíveis, uma das razões pelas quais os biocatalisadores tiveram este notável desenvolvimento nos últimos anos (RAN et al., 2008) (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011).

As reações enzimáticas mediadas por micro-organismos têm sido largamente empregadas desde os primórdios da humanidade para a produção de pão, laticínios e bebidas alcoólicas. Todas as aplicações desde o início usavam culturas de micro-organismos mistos, e dirigidas para processos biotecnológicos em áreas da agricultura e da nutrição humana. Foi Louis Pasteur em 1862 quem estabeleceu a base científica destas antigas aplicações, principalmente com relação à oxidação do álcool etílico ao ácido acético usando uma cultura pura de *Bacterium xylinum*. A redução do furfural ao álcool furfurílico em condições anaeróbicas de fermentação na presença de fermento vivo foi a primeira “redução fitoquímica” de uma molécula orgânica. A condensação aciloínica envolvendo o benzaldeído e realizada na década de 1910 – 1920 teve aplicação na síntese da (-)-efedrina, constituindo-se no primeiro processo industrial combinando síntese microbiológica e química (RODRIGUES; MORAN, 2001).

A biocatálise envolve transformações químicas usando tanto enzimas isoladas como células íntegras (MAUGARD; LAMARE; LEGOY, 2001) de organismos vivos (plantas, pequenos animais, etc) (MACHADO et al., 2008) (CORDELL et al., 2007) ou micro-organismo (leveduras, bactérias e fungos) (NESTL et al., 2007) (CARBALLEIRA et al., 2004). Entretanto as enzimas isoladas que realizam as reações de oxido-redução necessitam de cofatores que muitas vezes são de alto custo e de difícil recuperação. Desse modo, a utilização destas enzimas torna estas reações menos atrativas do ponto de vista econômico (MONTI et al., 2011). As reações com células íntegras de micro-organismos representam uma alternativa mais acessível, uma vez que o sistema

enzimático na célula contém tanto os cofatores necessários, como os caminhos metabólicos para a sua regeneração (ORDEN et al., 2009) (LOU et al., 2004).

O fermento biológico de padaria, que é um micro-organismo vivo cujo nome científico é *Saccharomyces cerevisiae*, é o biocatalisador mais utilizado pelos químicos orgânicos em sínteses assimétricas nos últimos anos. Vários são os motivos para este sucesso destacando a alta seletividade, bons rendimentos químicos, ampla disponibilidade, baixo custo, não requer adição de cofatores dispendiosos, pois estão disponíveis nas células, e a facilidade de manuseio que não exige conhecimento de microbiologia, que tanto amedronta os químicos e os afastam na escolha entre um reagente químico e um biocatalisador (BARKAKATY; TAKAGUCHI; TSUBOI, 2007) (PERLES; MORAN; VOLPE, 2008).

Dentro deste contexto, este trabalho visa o desenvolvimento de metodologias que utilizam leveduras ou fungos em reações de redução de olefinas ativadas, onde foram avaliadas algumas estratégias experimentais para o aumento da conversão e diastereosseletividade e/ou enantioseletividade. Será também apresentada uma nova técnica de extração dos produtos e reagentes do meio reacional para o monitoramento da conversão por cromatografia em fase gasosa com fase estacionária quiral (CG-quiral) baseada em microextração líquido-líquido-líquido com membrana porosa de polipropileno (HF-LLLME).

1.2. ENZIMAS

De todas as funções das proteínas, a catálise é provavelmente a mais importante. Na ausência do catalisador a maioria das reações nos sistemas biológicos ocorreria muito lentamente para formar os produtos a uma velocidade adequada para um organismo metabolizante. Os catalisadores que desempenham essa função nos organismos vivos são chamados de enzimas. Com exceção de alguns RNAs (ribozimas) que têm atividade catalítica, todas as enzimas são proteínas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores químicos produzidos pelo homem (CAMPBELL et al., 2007) (NELSON; COX; LEHNINGER, 2000) (SOLOMONS, 1996) (VOET; VOET, 1995) (WOLFENDEN; SNIDER, 2001).

As enzimas são polímeros de alta massa molar formadas por longas cadeias de aminoácidos ligados por meio de ligações peptídicas. A estrutura dessas proteínas pode ser descrita em quatro níveis organizacionais: primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária é a sequência exata de

aminoácidos da cadeia peptídica e é específica para cada proteína (Figura 1A). A estrutura secundária consiste em um primeiro nível de enovelamento helicoidal da proteína, devido às interações, geralmente do tipo ligações de hidrogênio. Duas organizações são particularmente estáveis, a α -hélice e a folha β . A α -hélice é mantida por ligações de hidrogênio intramoleculares entre o oxigênio do grupo $-C=O$ de uma unidade peptídica e o hidrogênio do grupo NH da quarta unidade peptídica subsequente (Figura 1B). A folha β também é uma estrutura mantida por ligações de hidrogênio intramoleculares, entretanto as ligações são estabelecidas entre cadeias polipeptídicas diferentes e paralelas, ou entre segmentos distantes e distendidos de uma mesma cadeia (Figura 1C). A estrutura terciária inclui o arranjo tridimensional de todos os átomos da proteína (Figura 1D). A associação de uma ou mais cadeias polipeptídicas (subunidades) unidas por ligações não covalentes para compor uma unidade funcional, é denominada de estrutura quaternária (Figura 1E) (CAMPBELL et al., 2007) (NELSON; COX; LEHNINGER, 2000).

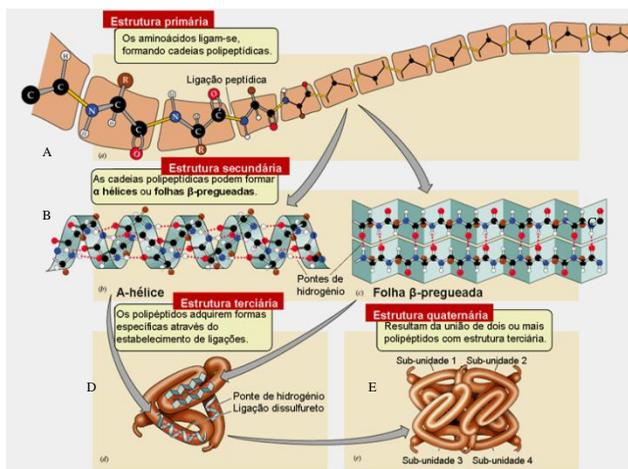


Figura 1. Representação esquemática das estruturas primária (A), secundária (α -hélice (B) Folha β (C)), terciária (D) e quaternária (E) das proteínas.

Fonte: ("Netxplica", 2012)

Toda a enzima possui um sítio ativo, o qual constitui somente uma pequena porção do volume total e que está usualmente próximo ou na superfície, de forma que está acessível às moléculas de substratos. O sítio ativo contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície

tridimensional complementar ao substrato. Em certos casos, estudos de difração de raios X têm revelado na enzima uma pequena área ou fissura claramente definida, na qual o substrato, ou mesmo parte dele pode se fixar (NELSON; COX; LEHNINGER, 2000) (WOLFENDEN; SNIDER, 2001) (CYGLER; SCHRAG, 1999).

A Figura 2 mostra o sítio ativo de uma álcool desidrogenase do fígado de cavalo (LADH, "horse-liver form of alcohol dehydrogenase") complexada com NAD^+ e álcool pentafluorobenzílico (DOŁĘGA, 2010).

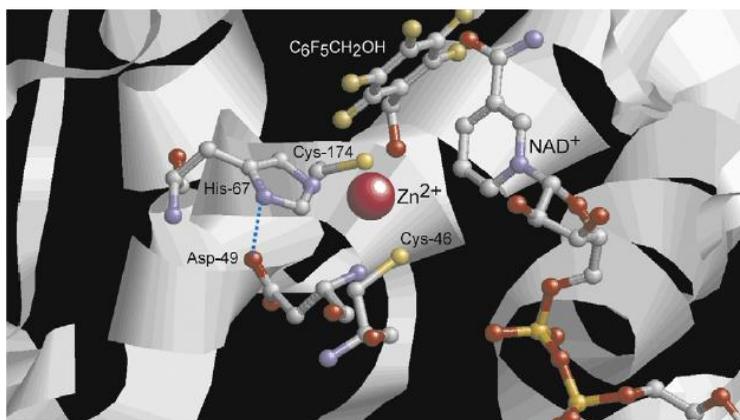
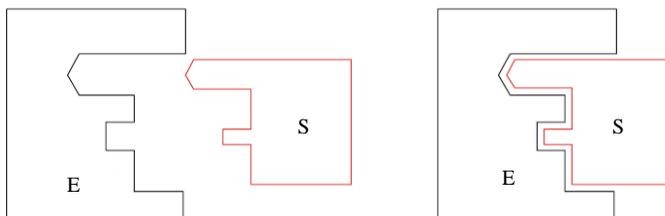


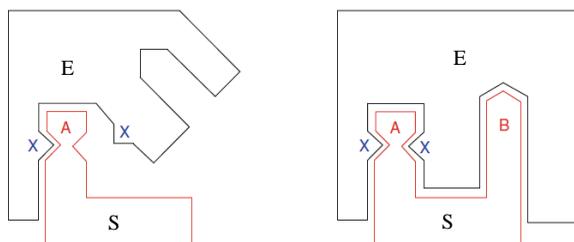
Figura 2. Sítio ativo da LADH complexada com álcool pentafluorobenzílico e cofator NAD^+ .

Fonte: (DOŁĘGA, 2010)

Os dois modelos mais importantes que descrevem a ligação do substrato com a enzima são, o modelo da chave-fechadura e o do encaixe induzido. No modelo da chave-fechadura, o substrato liga-se ao sítio ativo cujo formato complementa o seu, como uma chave em uma fechadura. Este modelo não considera uma propriedade importante das proteínas, sua flexibilidade conformacional (Figura 3A). O modelo do encaixe induzido considera esta propriedade, onde a ligação do substrato irá induzir uma mudança conformacional na enzima que resulta em um encaixe complementar depois que o substrato é ligado (Figura 3B) (CAMPBELL et al., 2007) (NELSON; COX; LEHNINGER, 2000).



A) Modelo da chave-fechadura



Encaixe não induzido → enzima inativa

Encaixe induzido → enzima ativa

B) Modelo do encaixe induzido

Figura 3. Representação esquemática dos modelos que descrevem a ligação de um substrato em uma enzima. Modelo da chave-fechadura (A) e modelo do encaixe induzido (B).

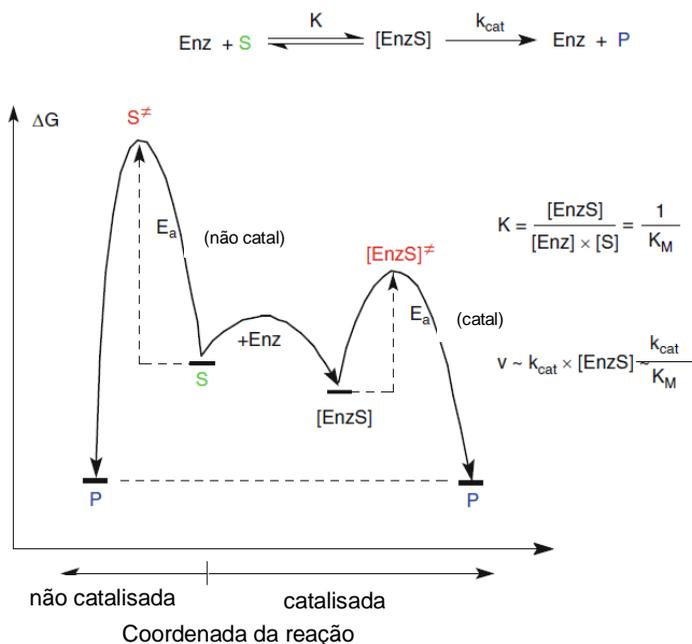
Fonte: Adaptada da referência: (FABER, 2011)

Como citado anteriormente, as enzimas possuem atividade catalítica. Isso significa que na sua presença, e sem serem consumidas durante o processo, elas conseguem acelerar os processos químicos que de outra maneira ocorreriam muito lentamente ou não totalmente, sem alterar o equilíbrio químico das reações que participam. Além disso, ao contrário dos catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais e óxidos metálicos, as enzimas são muito específicas (CABRAL, 2003) (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006) (GHANEM, 2007).

As reações biocatalisadas acontecem normalmente em duas etapas. Na primeira, forma a ligação do substrato à enzima que é devido às interações altamente específicas do substrato com as cadeias laterais dos aminoácidos que constituem o sítio ativo, formando um complexo “enzima-substrato”. Na segunda etapa, ocorre a formação do produto e a enzima é regenerada para uma

próxima reação (CAMPBELL et al., 2007) (NELSON; COX; LEHNINGER, 2000).

Como em todas as reações catalisadas, as enzimas aceleram as reações devido a diminuição da barreira energética (energia de ativação) entre o substrato e produto, como pode ser observado no diagrama de energia de uma reação catalisada e uma não catalisada (Figura 4). A origem da propriedade do poder catalítico (velocidade de aceleração) tem sido geralmente atribuída à estabilização do estado de transição da reação pela enzima (FABER, 2011) (CABRAL, 2003).



Enz = enzima, S = substrato, [EnzS] = complexo enzima-substrato, P = produto, K = constante de equilíbrio para a formação do complexo enzima-substrato, k_{cat} = constante velocidade da reação para $[\text{EnzS}] \rightarrow \text{Enz} + \text{P}$, E_a = energia de ativação, \neq denota o estado de transição, K_M = constante de Michaelis-Menten, v = velocidade da reação

Figura 4. Diagrama de energia de uma reação catalisada e não catalisada.

Fonte: Adaptada da referência: (FABER, 2011)

As vantagens de se utilizar as enzimas como catalisadores em reações orgânicas são:

- As condições da catálise enzimática, ao contrário da catálise química, são pressão atmosférica, temperaturas abaixo de 100 °C e pH neutro (CAMPBELL et al., 2007) (VOET; VOET, 1995).

- As velocidades das reações catalisadas por enzimas são maiores por fatores de 10^6 a 10^{23} vezes do que as correspondentes não catalisadas. Para organismos vivos, aumentos de velocidade desta ordem de grandeza são importantes, pois permitem que as reações ocorram com velocidades razoáveis mesmo nas condições normais que existem nas células vivas (isto é, pH aproximadamente neutro e temperatura na ordem de 20 – 35 °C) (CAMPBELL et al., 2007) (NELSON; COX; LEHNINGER, 2000).

- São quirais e podem, em geral, apresentar alta seletividade (GHANEM, 2007) (FABER, 2011) (JACOBSEN et al., 2003).

Porém, o uso destes biocatalisadores ainda apresenta algumas desvantagens, tais como são encontradas na natureza somente em apenas uma forma enantiomérica, requerem controle dos parâmetros reacionais, tais como de temperatura e pH, apresentam uma maior atividade catalítica em água, são propensos a sofrerem inibição por agentes químicos e físicos e podem causar alergias (FABER, 2011).

Nos últimos anos tais desvantagens têm sido bastante contornadas pelo aperfeiçoamento e desenvolvimento de diversas técnicas para manter a estabilidade das enzimas em meio não-aquoso (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008) (VILLENEUVE, 2007) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). As modificações mais comuns envolvem o uso de solventes orgânicos (LAANE et al., 1987) (DUMANSKI et al., 2001), sistema bifásico (LEÓN et al., 1998), adição de inibidores (FABER, 2011), técnicas de imobilização (MATEO et al., 2007) e/ou proteção celular (ALBUQUERQUE et al., 2007), utilização de enzimas mais resistentes (extremoenzimas) (HAKI; RAKSHIT, 2003) ou geneticamente modificadas (CARBALLEIRA et al., 2009) e uso de líquidos iônicos (SHELDON et al., 2002) (PILISSÃO; CARVALHO; NASCIMENTO, 2009) (SILVA et al., 2011) (MILNER; MAGUIRE, 2012).

1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

No Banco de Dados de Proteínas (“Protein Data Bank” PDB), encontram-se catalogados 86008 tipos de macromoléculas (entre proteínas, peptídeos, vírus, carboidratos, ácidos nucléicos e complexos proteína/ácidos nucléicos) (RCSB Protein Data Bank, 2012). Várias enzimas têm sua sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional determinada através de cristalografia

de raios X e RMN de ^2D (NELSON; COX; LEHNINGER, 2000) (CYGLER; SCHRAG, 1999).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (“International Union of Biochemistry and Molecular Biology” IUBMB) divide as enzimas em seis grandes classes, de acordo com o tipo de reação que catalisa, sendo as oxidorredutases, transferases, hidrolases, isomerases, liases e ligases (NELSON; COX; LEHNINGER, 2000) (FABER, 2011).

Neste trabalho, serão utilizadas as oxidorredutases como biocatalisadores na biotransformação de olefinas ativadas. A seguir serão apresentadas algumas das propriedades destas enzimas e os tipos de reações que catalisam.

As oxidorredutases são classificadas dentro de três categorias: desidrogenases (ou redutases), oxigenases e oxidases (FABER, 2011) (MUNRO; TAYLOR; WALKINSHAW, 2000). As desidrogenases e redutases, classificadas como E.C.1.1.1., são muito usadas na redução de grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas ($\text{C}=\text{O}$) (BARROS-FILHO et al., 2010) (OU et al., 2011), das ligações duplas $\text{C}-\text{C}$ eletronicamente ativadas com grupos retiradores de elétrons que são denominadas de olefinas ativadas (SORTINO; ZACCHINO, 2010) (ZAMPIERI et al., 2011) (MIYAZAWA; SHIMIZU, 2012) e mais recentemente na redução assimétrica de iminas ($\text{C}=\text{N}$) (VAIJAYANTHI; CHADHA, 2008). Devido a capacidade de converter substratos pró-quirais em produtos quirais opticamente enriquecido, estas enzimas são ferramentas valiosas para a síntese orgânica (NAKAMURA et al., 2003).

Entretanto, para exercer a atividade catalítica, algumas enzimas, incluindo as oxidorredutases, necessitam de componentes químicos adicionais denominados cofatores ou coenzimas (JURČEK; WIMMEROVÁ; WIMMER, 2008) (PERLES; MORAN; VOLPE, 2008). Estes são substâncias não protéicas que participam das reações enzimáticas, podendo ser regeneradas para reações futuras. O cofator pode ser um íon metálico (ex. Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) que pode agir como catalisador ácido-base de Lewis ou então formar compostos de coordenação ao se comportarem como ácido de Lewis, enquanto os grupos aos quais se ligam atuam como bases de Lewis. Os compostos de coordenação formados por íons metálicos tendem a ter geometria bastante específica, que auxilia no posicionamento dos grupos envolvidos na reação, produzindo uma catálise ideal. A outra classe importante de cofatores é uma mistura de compostos orgânicos denominados de coenzimas, podendo ser vitaminas ou metabolicamente relacionados a vitaminas, por exemplo, flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), e a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), entre outras. As

coenzimas são encontradas nas células de todos os seres vivos e funcionam usualmente como transportadores intermediários dos grupos funcionais, de átomos específicos, ou de elétrons que são transferidos na reação enzimática global tendo um papel preponderante na produção de energia para a célula (CAMPBELL et al., 2007). As enzimas e coenzimas atuam conjuntamente para catalisar as reações, onde a coenzima e o substrato se ligam à enzima e, após, o substrato é reduzido enquanto que a coenzima é oxidada. Ao final do processo, a coenzima e o produto se dissociam da enzima (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009).

Na Figura 5 estão apresentadas as estruturas químicas dos cofatores NAD(H) e NADP(H) na forma oxidada e reduzida.

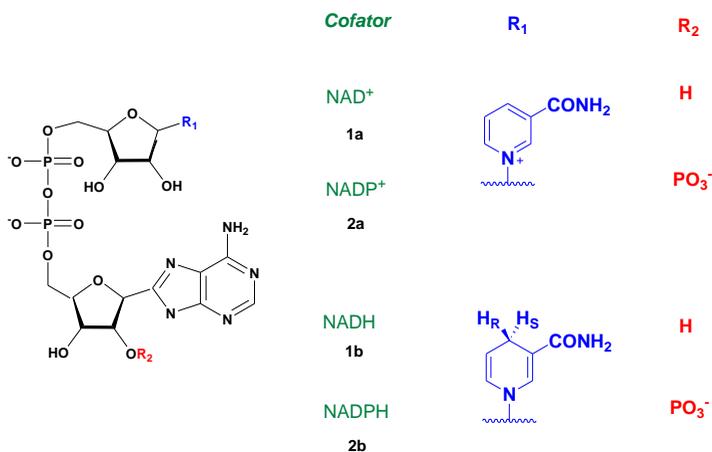


Figura 5. Estrutura dos cofatores NAD(H) (1) e NADP(H) (2) na forma oxidada (a) e reduzida (b).

O mecanismo da transferência de hidreto da coenzima NAD(P)H para os compostos carbonílicos está apresentado na Figura 6. O hidreto ataca a face *si* ou a face *re* do grupo carbonila dependendo da orientação da ligação da enzima com o substrato, resultando na formação do (*R*)- e (*S*)-álcool, respectivamente. Dependendo do tipo de enzima utilizada o hidreto transferido é o pró-(*R*) ou pró-(*S*) (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009).

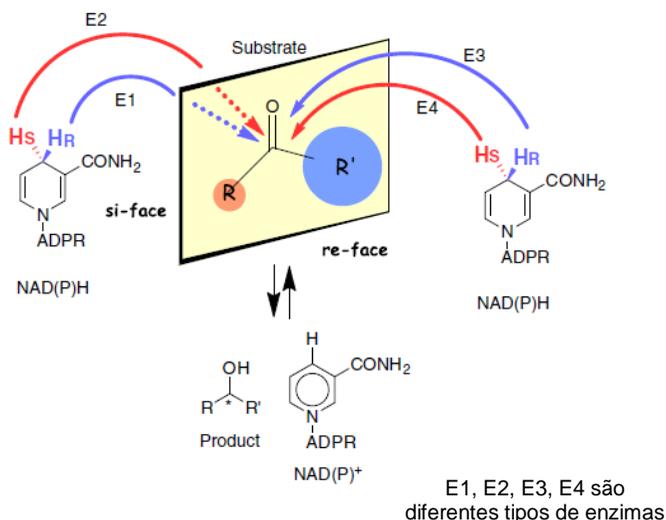


Figura 6. Mecanismo de transferência de hidreto das coenzimas NAD(P)H para compostos carbonílicos.

Fonte: Adaptada da referência: (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009)

A estereoquímica da reação, que é principalmente dependente dos requisitos estéreo do substrato, pode ser prevista para a maioria das desidrogenases a partir de um modelo simples que é geralmente referido como regra de Prelog. Esta regra, postulada por Prelog, prediz por qual face da carbonila ocorre a transferência do hidreto, e está fundamentada no tamanho (volume) dos grupos substituintes ligados ao carbono carbonílico. As duas faces de um centro trigonal plano, por exemplo, de um grupo carbonílico, tem as designações face *re* e face *si*, estabelecidas de acordo com as prioridades por número atômico para grupos ligados a este, conforme proposto por Cahn-Ingold-Prelog. Se a transferência ocorrer pela face *re* da carbonila obtém-se (*S*)-álcoois e se ocorrer pela face *si* obtém-se (*R*)-álcoois (Figura 7) (FABER, 2011) (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009).

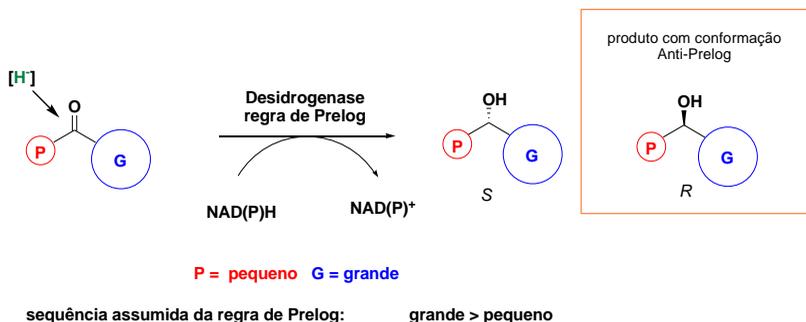


Figura 7. Regra de Prelog para adição de hidreto na carbonila.

Fonte: Adaptada da referência: (FABER, 2011)

As reações enzimáticas dependentes de cofatores são frequentemente realizadas com células íntegras, pois os organismos vivos ou os microorganismos fornecem um sistema de reciclagem natural e eficiente das coenzimas intracelulares. Além disso, os processos de biotransformações realizados com células íntegras são os mais simples e econômicos, e as enzimas encontram-se protegidas do meio externo pelas membranas e paredes celulares (LOU et al., 2004) (JURČEK; WIMMEROVÁ; WIMMER, 2008). Porém, devido à presença de várias enzimas nas células, há uma maior probabilidade de ocorrer reações laterais, pois tanto o substrato quanto o produto podem ser aceitos por outras enzimas presentes nas células (enzimas B e C na Figura 8). Tais processos competitivos podem diminuir o rendimento da biotransformação desejada (HOLLMANN; ARENDS; HOLTSMANN, 2011).

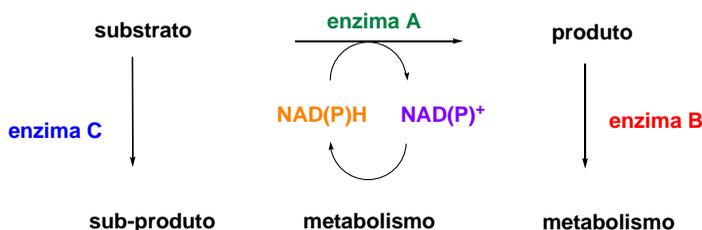


Figura 8. Biotransformações competitivas utilizando células íntegras.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão) é um microorganismo amplamente utilizada na indústria na produção de biomassa, bebidas alcoólicas e etanol, alimentos, proteínas recombinantes, fármacos, feromônios e

vacinas, entre outros produtos de interesse comercial (BARALDI; CORRÊA, 2004) (BEHERA et al., 2010). O uso de *S. cerevisiae* para catalisar reações orgânicas tem sido explorado há aproximadamente um século e suas células íntegras têm sido o biocatalisador mais comumente utilizado na redução de compostos carbonílicos (STEWART, 2000) (ŻYMAŃCZYK-DUDA et al., 2005) (ZAMPIERI et al., 2013).

Outros micro-organismos também vêm sendo amplamente utilizados como biocatalisadores em síntese orgânica. Como exemplo, pode-se citar as leveduras *Aspergillus niger* (RIBEIRO et al., 2009), *Cryptococcus* (GORETTI et al., 2009), *Pichia stipitis* (ZAMPIERI et al., 2011), *Rhodotorula* sp (WANG; ZONG; LOU, 2009) e *Candida glabrata* (MÜLLER; HAUER; ROSCHE, 2006). Além de leveduras, bactérias (CRAMAROSSA et al., 2005), microalgas (HOOK; RYAN; SHERIDAN, 2003) e vários fungos (BORGES et al., 2009) também vêm sendo muito utilizados para mediar reações orgânicas. Por exemplo fungos isolados de plantas da floresta Amazônica (Figura 9) foram recentemente usados na resolução (*R,S*)-2-octanol (ZANOTTO et al., 2009), na acilação regioselectiva da D-ribono-1,4-lactona (SEBRÃO; SÁ; NASCIMENTO, 2011), e na epoxidação químio-enzimática do β -carofileno (DA SILVA; NASCIMENTO, 2012).



Figura 9. Fotos de fungos de plantas da floresta Amazônica.

Fonte: Zanoto S. P. (UEA, AM, coleção particular)

1.4. BIOTRANSFORMAÇÕES DE OLEFINAS ATIVADAS MEDIADAS POR MICRO-ORGANISMOS

Está bem documentado na literatura que além das reações de redução de carbonilas, que são várias, as redutases no interior dos micro-organismos podem reduzir ligações duplas ativadas com grupos retiradores de elétrons tais como nitro, carbonilas ou hidroxilas (FABER, 2011) (HUANG; ZHANG; GONG, 2005). As enzimas responsáveis por essas reações são as enoato

redutases dependentes de FMN, que são membros da família das “old yellow enzymes” (OYEs), que podem ser encontradas em muitos micro-organismos tais como *Clostridia* sp., *Proteus* sp. e *S. cerevisiae* (fermento de pão, FP) (FABER, 2011) (BRENNAN et al., 2011). A capacidade do FP em reduzir assimetricamente ligações duplas carbono-carbono eletronicamente ativadas foi descoberta em 1934, e desde esta data vários estudos vêm sendo desenvolvidos visando melhorar a seletividade destas reações (FABER, 2011).

O mecanismo catalítico para a redução de olefinas ativadas catalisadas pelas enoato redutases tem sido bem estudado. Por exemplo, para elucidar o mecanismo da transferência de hidrogênio, nas reações de redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados mediadas por FP, CHU et al., (2006) realizaram estudos utilizando traços de isótopos quantitativos com abundância próxima ao natural e determinaram a conversão por RMN de ^2D . Segundo os autores o hidrogênio incorporado no carbono β à carbonila é derivado do cofator NAD(P)H e o hidrogênio incorporado no carbono α à carbonila é derivado do meio aquoso. A Figura 10 mostra uma representação esquemática da proposta mecanística da redução de olefinas ativadas (FABER, 2011).

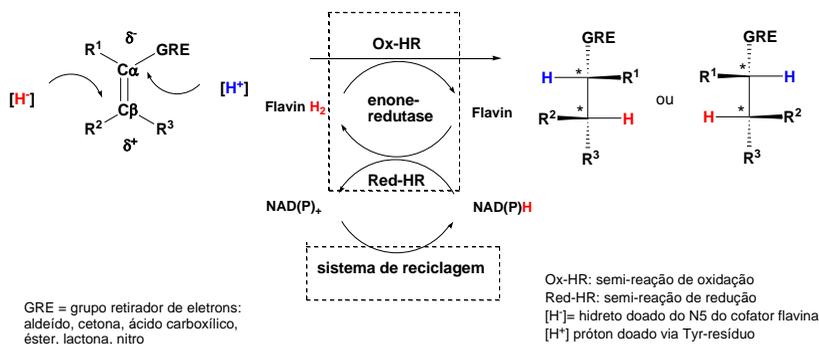


Figura 10. Representação esquemática da proposta mecanística da redução de olefinas ativadas mediada por enoato redutases dependentes de FMN.

Fonte: Adaptada da referência: (FABER, 2011)

A biotransformação de compostos carbonílicos α,β -insaturados mediada por células íntegras, em muitos casos, pode resultar em uma mistura de cetona ou aldeído saturado, álcool saturado ou álcool alílico, devido ao fato de que diferentes enzimas estão presentes nas células (Figura 11) (LUO; WANG; GONG, 2010).

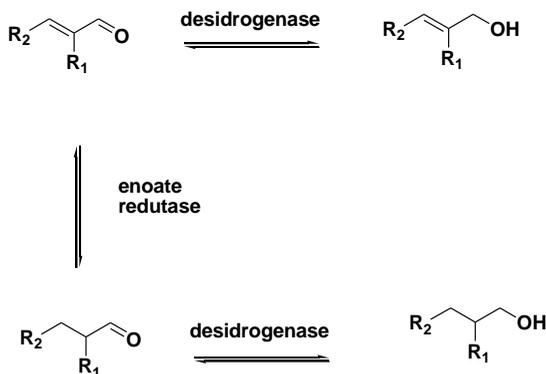


Figura 11. Biorredução de aldeído α,β -insaturado catalisada por células íntegras.
 Fonte: Adaptada da referência: (LUO; WANG; GONG, 2010)

DUMANSKI et al. (2001) estudaram a redução do 2-fenil-2-propenal (**3**) mediada por FP em meio orgânico. Eles observaram que foi obtida uma mistura 1:1 do álcool insaturado 2-fenil-2-propen-1-ol (**4**) e do álcool saturado (*R*)-2-fenil-1-propanol (**5**) com bom rendimento (52%). Nas análises de CG não foi observado o sinal referente ao reagente de partida e do aldeído saturado (*R*)-2-fenilpropanal (**6**). Estes resultados indicam que o álcool insaturado foi formado pela redução do grupo aldeído enquanto que o álcool saturado resultou da redução de ambos os grupos carbonila e ligação dupla carbono-carbono (Figura 12).

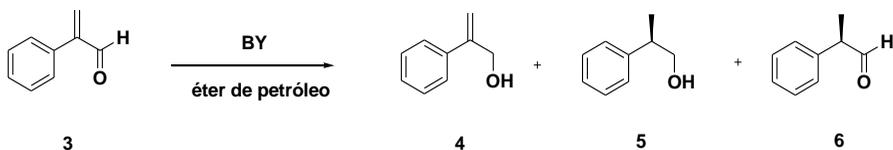


Figura 12. Redução do 2-fenil-2-propenal (**3**) mediada por FP em meio orgânico.
 Fonte: Adaptada da referência: (DUMANSKI et al., 2001)

Outro grupo de olefinas ativadas que vêm sendo biotransformadas por bactérias (CRAMAROSSA et al., 2005) (CHEN et al., 2012), microalgas (HOOK; RYAN; SHERIDAN, 2003), leveduras (VAN DYK et al., 1998) (GORETTI et al., 2012), fungos filamentosos (CARBALLEIRA et al., 2004) e culturas de células e tecidos de plantas (HAMADA et al., 1997) são os monoterpênos, devido ao fato destes serem intermediários sintéticos para vários

outros compostos com grande aplicação, tanto na área farmacêutica como em perfumes, cosméticos e alimentos (HUA; VENKATARAMAN, 1988).

A 2-metil-5-(1-metiletenil)-2-ciclo-hexen-1-ona (carvona) é um monoterpeno monocíclico que é produzido por mais de 70 plantas diferentes. Ela existe em duas formas estereoisoméricas, a (4*R*)-(-)-carvona (**7**) que é o componente principal do óleo essencial do hortelã (*Mentha spicata*), e a (4*S*)-(+)-carvona (**8**), que é o componente principal da óleo essencial da alcarávia (*Carum carvi*) e endro (*Anethum graveolens*) (Figura 13). As várias aplicações da carvona como aromatizante, inibidor de brotação, antimicrobiana, antifúngica, na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos justificam o interesse no uso deste monoterpeno. Além disso, os produtos da redução da ligação dupla C–C α,β -insaturada tanto da (4*R*)-carvona quanto da (4*S*)-carvona, as 2-metil-5-(1-metiletenil)-ciclo-hexanona (di-hidrocarvona) (**9-12**), são também intermediários sintéticos importantes de um grande número de produtos naturais e de compostos com propriedades biológicas diferentes (OHBA et al., 1997) (JIANG; BHATTACHARYYA; SHA, 2007) (ZHANG et al., 2008) (BLAY et al., 2005) (MACÍAS et al., 2000) (Figura 14). Os álcoois, 2-metil-5-(1-metiletenil)-ciclo-hexanol (di-hidrocarveóis) também podem ser obtidos nas reações mediadas por micro-organismos através da redução da ligação dupla C–C seguida da redução da ligação dupla C–O. Estes compostos são utilizados como fragrâncias em cosméticos tais como xampus e sabonetes, em produtos de higiene e em não cosméticos tais como produtos de limpeza e detergentes (BHATIA et al., 2008) (Figura 15).

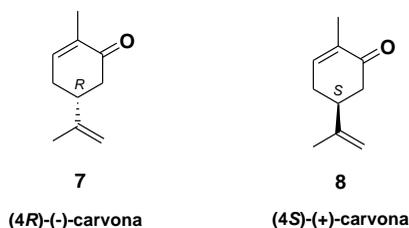


Figura 13. Fórmulas estruturais das carvonas.

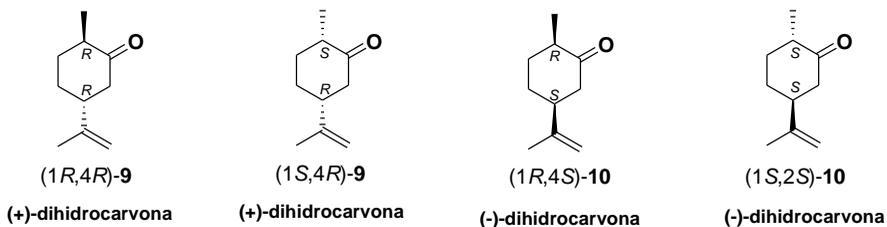


Figura 14. Fórmulas estruturais das di-hidrocarvonas.

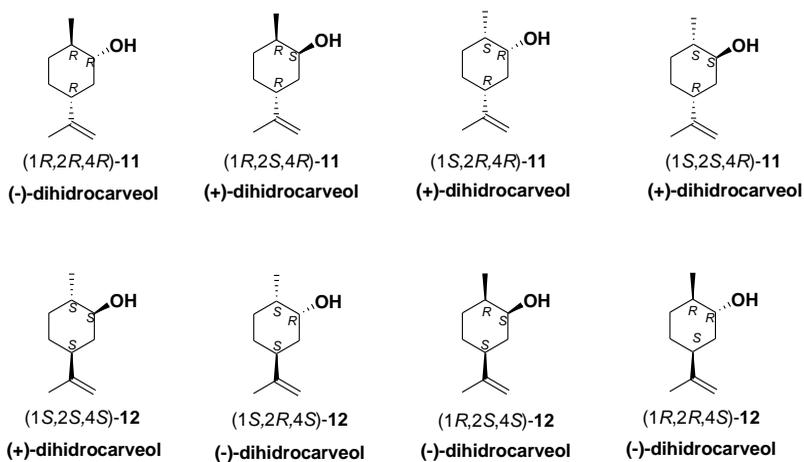


Figura 15. Fórmulas estruturais dos di-hidrocarveóis.

Na Figura 16 estão apresentados alguns compostos de interesse sintético obtidos a partir da (+)-di-hidrocarvona.

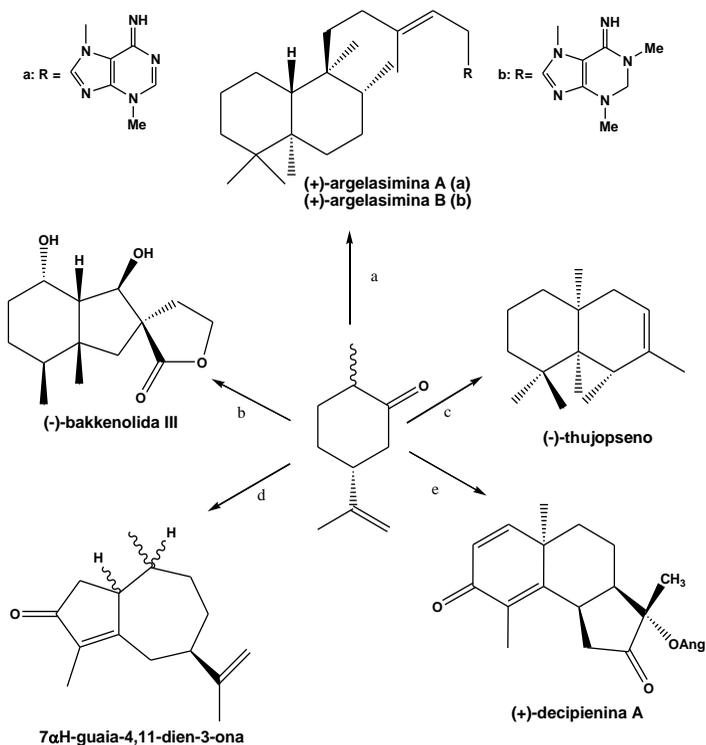


Figura 16. Compostos com atividade biológica obtidos a partir das (+)-di-hidrocarvonas.

Fontes: Adaptada das referências: a (OHBA et al., 1997)

b (JIANG; BHATTACHARYYA; SHA, 2007)

c (ZHANG et al., 2008)

d (BLAY et al., 2005)

e (MACÍAS et al., 2000)

Como exemplo de compostos com atividade biológica, pode-se citar o (-)-thujopseno (**21**) que é um sesquiterpeno tricíclico que foi obtido a partir da (+)-di-hidrocarvona (ZHANG et al., 2008) (Figura 17).

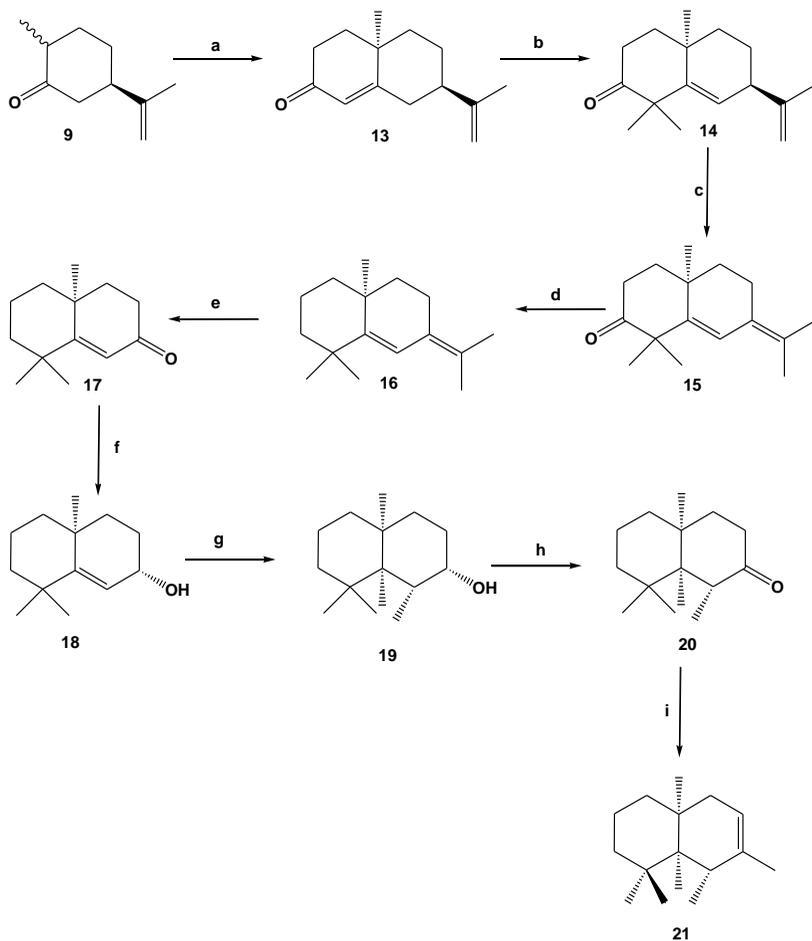


Figura 17. Síntese do thujupeno a partir da (+)-di-hidrocarvona. [Reagentes e condições (a) Ref. 6 de ZHANG et al., 2008); (b) MeI, KO-*t*-Bu, *t*-BuOH; (c) *p*-TsOH, C₆H₆, 60 °C; (d) NH₂NH₂, Na, (HOCH₂CH₂)₂O, (e) OsO₄, NaIO₄, CH₃CN; (f) DIBAL-II, -78 °C; (g) CH₂I₂, Zn(Ag), Et₂O; (h) DMSO, (COCl)₂, NEt₃, CH₂Cl₂, -78 °C a t.a.; (i) Refs. 2,3 de ZHANG et al., 2008)]

Fonte: Adaptada da referência: (ZHANG et al., 2008)

Várias metodologias são propostas para a hidrogenação seletiva da ligação dupla C-C conjugada à carbonila das carvonas, para a obtenção das respectivas di-hidrocarvonas. Uma das mais utilizadas é a hidrogenação com zinco metálico em solução alcoólica de hidróxido de potássio sob refluxo. As di-hidrocarvonas são obtidas em bons rendimentos, sendo de ~87%. Entretanto,

foi verificada a formação de uma mistura dos diastereoisômeros (1*S*,4*R*)-*cis* e (1*R*,4*R*)-*trans*-di-hidrocarvonas na razão de 1:3 (FAIRLIE; HODGSON; MONEY, 1973).

Outra metodologia que também vem sendo muito utilizada nos últimos anos é a biotransformação mediada por micro-organismos. Por exemplo, VAN DYK et al. (1998) estudaram a biotransformação das carvonas (4*R*)-**7** e (4*S*)-**8** catalisada por várias leveduras, tais como *S. cerevisiae* CBS 3093, *G. candidum* G 400 e *Y. lipolytica* KBP 3364, entre outras. Eles observaram que algumas leveduras utilizadas apresentaram a capacidade de reduzir apenas a ligação dupla C–C endocíclica das carvonas, formando as di-hidrocarvonas (1*R*,4*R*)-**9** e (1*R*,4*S*)-**10**. Outras, além de reduzir a ligação dupla C–C, também apresentaram a capacidade de reduzir a ligação dupla C=O, formando os correspondentes di-hidrocarveóis (1*R*,2*S*,4*R*)-**11**, (1*R*,2*S*,4*S*)-**12** e (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** (Figura 18).

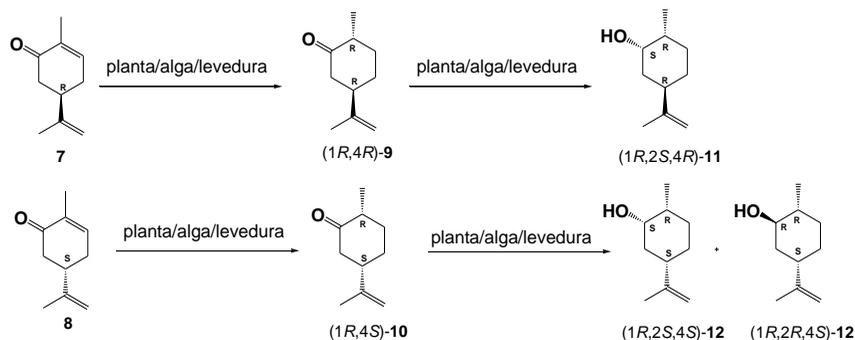


Figura 18. Produtos da biorredução da (4*R*)- e (4*S*)-carvona (**7** e **8**) mediada por leveduras, plantas e algas.

Fonte: Adaptada da referência: (VAN DYK et al., 1998)

SHIMODA; HIRATA, (2000) obtiveram resultados similares aos de VAN DYK et al. (1998) em relação aos produtos obtidos na redução da (4*R*)- e (4*S*)-carvona catalisada por culturas de células de *Astasia longa*. A redução de **7** formou a (1*R*,4*R*)-di-hidrocarvona e o (1*R*,2*S*,4*R*)-di-hidrocarveol, e a redução de **8** formou a (1*R*,4*S*)-di-hidrocarvona e o (1*R*,2*S*,4*S*)-di-hidrocarveol. Segundo esses autores, a formação preferencial destes produtos indicou que a adição de hidrogênio ocorreu estereoespecificamente resultando em produtos com configuração *R* no carbono-1 e *S* no carbono-2. Foi proposto que o mecanismo de adição de hidrogênio ocorreu pela adição *anti* dos átomos de hidrogênio pela face *si* no carbono-1 e pela face *re* no carbono-6, e os

hidrogênios participantes na redução de C-1 e C-6 são originados do meio e do NADH, respectivamente. Além disso, o ataque na ligação dupla C=O no C-2 ocorreu pela fase *re*, conforme mostrado na Figura 19.

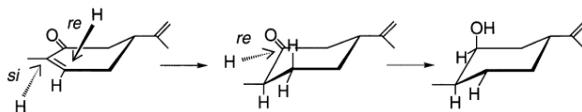


Figura 19. Estereoquímica da redução das ligações duplas C=C e C=O da (4*R*)-carvona mediada pela *A. longa*.

Fonte: (SHIMODA; HIRATA, 2000)

A seguir será apresentada uma breve revisão sobre os principais meios reacionais utilizados em biocatálise.

1.5. MEIO REACIONAL

O meio aquoso é o mais frequentemente utilizado nas reações biocatalisadas por células íntegras de micro-organismos, pois além de ser considerado um solvente verde (HOLLMANN; ARENDS; HOLTSMANN, 2011), mantém as condições ideais para a sobrevivência dos micro-organismos, diferentemente dos solventes orgânicos que podem ser incorporados na membrana lipídica, resultando no rompimento das suas funções, inativação ou desnaturação das enzimas ligadas a esta membrana, colapso no mecanismo de transporte e quebra celular (BIE et al., 2008). Entretanto, muitos compostos orgânicos de interesse comercial e industrial com potencial para serem biotransformados por células íntegras são insolúveis em água, e para contornar estes problemas, o sistema bifásico surgiu como uma alternativa para realizar a biotransformação destes substratos (LEÓN et al., 1998) (PFRUENDER; JONES; WEUSTER-BOTZ, 2006) (LI et al., 2007).

O sistema bifásico é formado por uma fase aquosa, onde as células são suspensas, e por uma orgânica, onde o substrato e o produto são solúveis, necessitando de agitação mecânica contínua para que ocorra a reação (Figura 20). As principais vantagens deste método incluem a facilidade na separação do biocatalisador do reagente e ou produto, minimização da inibição da atividade biocatalítica causada pelo substrato, e a presença da fase aquosa, mais favorável ao biocatalisador do que o meio orgânico. Os critérios mais importantes para a seleção do solvente orgânico em reações catalisadas por enzimas e/ou células íntegras em sistema bifásico, são a alta capacidade de

solubilizar tanto o produto e o substrato, bem como a biocompatibilidade que é expressa pelo $\log P$, que é definido como logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água. Entretanto, outras características são desejáveis tais como estabilidade química e térmica, baixa tendência de formar emulsão com a água, não biodegradabilidade, baixa periculosidade no manuseio e preços baixos (LEÓN et al., 1998) (HE et al., 2006) (CAPELLO; FISCHER; HUNGERBÜHLER, 2007) (FERNANDES et al., 2002) (CRUZ et al., 2004).

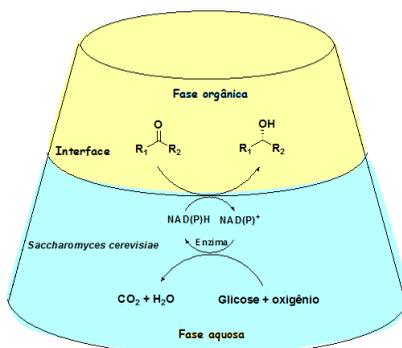


Figura 20. Sistema bifásico usado nas reações mediadas por micro-organismos.

HE et al. (2006), a fim de determinar o melhor meio reacional em relação a menor inibição do substrato, realizaram a redução assimétrica do 4-cloro-3-oxobutanoato de etila catalisada por *Aureobasidium pullulans* CGMCC em meio aquoso contendo somente tampão fosfato (0.1 mol L^{-1} , pH 7,0), e em sistema bifásico contendo tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) e ftalato de *n*-butila. As maiores conversões em (*S*)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de etila foram obtidas quando o sistema bifásico foi utilizado, variando de 0 – 94,5% em 8 h de reação. Quando o meio aquoso foi utilizado, as conversões em produto variaram de 0 – 27,5% neste mesmo intervalo de tempo. A diminuição nas conversões em produto em meio aquoso pode ter sido ocasionada devido a sérios problemas de inibição do substrato. Além disso, quando o ftalato de *n*-butila foi utilizado como transportador do substrato, eliminou-se o efeito de inibição neste sistema bifásico.

A adição de aditivos e/ou cossolventes, tais como açúcares, álcoois, compostos sulfurados e líquidos iônicos, no meio aquoso ou no sistema bifásico também vem sendo muito utilizada nas reações mediadas por células íntegras de micro-organismos, a fim de manter a estabilidade e atividade das enzimas no meio reacional. Além disso, em muitos casos o aditivo e/ou

cossolvente aumenta a conversão e seletividade das transformações enzimáticas (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009). Uma breve revisão das várias classes de aditivos está apresentada abaixo.

Como mencionado anteriormente, o uso de solvente orgânico frequentemente acarreta danos à membrana hidrofóbica das células dos microorganismos. Para contornar este problema uma técnica que vem sendo muito utilizada é a adição de açúcares e polióis no meio reacional (HU; XU; NIE, 2010) (ZHANG et al., 2009). Os açúcares, especialmente a trealose e outros polióis, são conhecidos como estabilizadores das membranas plasmáticas. A trealose (α -D-glicopiranosil- α -D-glicopiranosídeo) é um dissacarídeo não redutor composto por duas moléculas de glicose unidas por ligações α - α -1,1-glicosídicas, amplamente encontrado em bactérias, fungos, plantas e insetos mas aparentemente ausente em vertebrados (DONG et al., 2007) (LUO; LI; WANG, 2008) (SINGER; LINDQUIST, 1998) (Figura 21).

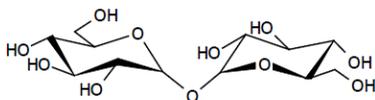


Figura 21. Estrutura da trealose.

Durante muito tempo acreditou-se que a trealose era um carboidrato de reserva. Entretanto, o papel mais importante que este açúcar desempenha nas células de levedura é de estabilizar a membrana celular e as proteínas em condições de estresse. Os grupos OH equatoriais nas moléculas do açúcar são responsáveis por ordenar a água, aumentando a estruturação, protegendo as membranas e as proteínas quando expostas a altas temperaturas, desidratação e/ou aos solventes orgânicos (DONG et al., 2007) (LUO; LI; WANG, 2008) (SINGER; LINDQUIST, 1998) (STAMBUK et al., 1993).

ALBUQUERQUE et al. (2007) verificaram o efeito de proteção da trealose e sacarose na redução do acetoacetato de etila catalisada pela levedura *S. cerevisiae* W303-1A em *n*-hexano. Neste estudo eles observaram que a trealose atuou como protetor celular, onde esta não foi consumida pelas células, enquanto que a sacarose foi utilizada como fonte de carbono, uma vez que esta foi consumida durante a reação. É importante salientar também que boas conversões em produto (31 – 50%) e excelentes *e.e.* (> 99%) foram obtidos quando a trealose foi adicionada ao meio reacional contendo a levedura crescida em lactato ou glicerol-etanol. Quando a sacarose foi adicionada ao meio reacional com a levedura crescida em glicose, observou-se uma diminuição da seletividade da reação, onde o *e.e.* variou de 30 – 50 %.

Os açúcares e álcoois, tais como glicose, sacarose, D-xilose, 2-propanol, etanol e glicerol também podem ser utilizados como cossustratos de sacrifício para fornecer os equivalentes redox para os processos biossintéticos (HU; XU; NIE, 2010). Eles funcionam como doador de elétrons, onde desempenham um papel importante no mecanismo de reciclagem dos cofatores (NAD(P)H/NAD(P)⁺) e conseqüentemente é essencial para o processo contínuo da redução biocatalisada, uma vez que as células contêm apenas quantidades catalíticas dos cofatores (ZHANG et al., 2009) (WANG; ZONG; LOU, 2009).

HU; XU; NIE, (2010) verificaram o efeito de vários cossustratos (glicose, frutose, sacarose, 2-propanol e D-xilose) na redução assimétrica da 2-hidroxi-1-feniletanona (HPR) mediada por *S. cerevisiae* JUC15. Eles observaram que quando esses aditivos foram adicionados ao meio reacional, as conversões em produto foram maiores (70,4 – 92,5), exceto quando a D-xilose (12,9%) foi utilizada em comparação com os valores obtidos quando a reação foi realizada sem a adição de aditivo (controle) (13,3%). Além disso, não foi observado um aumento significativo na atividade da redutase com a adição desses cossustratos, e nem da massa celular durante a biorredução. Esses resultados sugerem que os aditivos não agiram como protetor celular ou como fonte de carbono e sim como cossustratos de sacrifício para promover a regeneração de coenzimas (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do cossustrato na redução da 2-hidroxi-1-feniletanona.

Cossustrato	Rendimento (%)	<i>e.e.</i> (%)	Viabilidade da célula (%)	Atividade relativa da HPE redutase (%)
Controle	13,3	>99	96,2	92,5
Glicose	80,2	>99	98,9	91,8
Frutose	78,4	>99	98,1	92,2
Sacarose	92,5	>99	99,3	91,3
2-Propanol	70,4	>99	96,8	90,4
D-xilose	12,9	>99	95,7	91,7

Condições reacionais: célula úmida (0,2 g), 2 mL tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 6,5), HPE (8 g L⁻¹), cossustrato (55,5 mmol L⁻¹), 30 °C, 150 rpm. As atividade da HPE redutase, pureza ótica e rendimento do produto foram determinados após 48 h de reação.

Fonte: Adaptada da referência: (HU; XU; NIE, 2010)

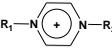
Outro aditivo que tem recebido bastante atenção é o glicerol, especialmente por ele estabilizar a estrutura nativa da proteína e conseqüentemente evitar a desnaturação, e por ser um subproduto da produção do biodiesel, que é obtido de fontes renováveis. ANDRADE; PIOVAN; PASQUINI (2009) estudaram o efeito do glicerol como cossolvente na

biorredução de halo-acetofenonas mediadas por células íntegras de *Aspergillus terreus* SSP 1498 e *Rizopus oryzae* CCT 4964 em meio aquoso contendo tampão fosfato (pH 7,0). Em geral, foi observado que o glicerol demonstrou um grande potencial para aumentar o desempenho enzimático das células utilizadas em termos de conversão (44 – 72%) e enantiosseletividade (92 – >99%) em comparação aos demais aditivos utilizados (conv. <1 – 51% *e.e.* >99%).

Os compostos sulfurados, tais como o DMSO e a L-cisteína, podem interagir com o sítio ativo das enzimas presentes nas células íntegras alterando a cavidade destas redutases, ou então a L-cisteína pode atuar como fonte de hidreto para regenerar os cofatores, e assim aumentar a conversão e seletividade das reações biocatalisadas (HAYAKAWA; SHIMIZU; FUJISAWA, 1997) (HAYAKAWA et al., 1998). Por exemplo, na redução de acenaftenoquinona catalisada por FP em meio aquoso, WANG et al., (2007) obtiveram um aumento na conversão no mono-álcool, 2-hidroxicenaftenonas, de 72 % para 98% e no *e.e.* de 15 para 25% com a adição do DMSO (10% v/v) no meio reacional.

Os líquidos iônicos (LIs), que são sais orgânicos formados por um cátion e um ânion, têm recentemente surgido como um novo solvente verde para uma grande variedade de transformações enzimáticas, devido ao fato de não serem voláteis e inflamáveis e serem quimicamente e termicamente estáveis, moderadamente hidrofílicos, possuem alta condutividade térmica, alta viscosidade e também habilidade de dissolver uma grande variedade de compostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos (HE et al., 2009) (LOU; ZONG; SMITH, 2006) (MILNER; MAGUIRE, 2012) (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplos dos LIs mais utilizados em biocatálise.

Cátion	Ânion	Nome	Abreviatura
tetraalquilâmonio	BF_4^-	Tetrafluoroborato	$[\text{BF}_4]$
	PF_6^-	Hexafluorofosfato	$[\text{PF}_6]$
	NO_3^-	Nitrato	$[\text{NO}_3]$
	CH_3CO_2^-	Acetato	$[\text{Ac}]$
1,3-dialquilimidazólio (Im)	CF_3CO_2^-	Trifluoroacetato	$[\text{Tfa}]$
	$\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$	Metil sulfato	$[\text{MeSO}_4]$
	CF_3SO_3^-	Trifluormetanossulfonato	$[\text{TfO}]$
1,4-dialquilpiridínio (Py)	$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$	Bis(trifluorometil)-sulfonamida	$[\text{Tf}_2\text{N}]$
			

Fonte: Adaptada da referência: (MILNER; MAGUIRE, 2012)

Geralmente, os LIs podem ser utilizados em biocatálise de 3 modos, como solvente puro, como cossolvente no meio aquoso ou em sistema bifásico (KRAGL; ECKSTEIN; KAFTZIK, 2002). Eles atuam como reservatório para substratos e produtos pouco solúveis em água, diminuindo assim a inibição da reação pelo substrato e produto, que às vezes é observada em meio aquoso (LOU; ZONG; SMITH, 2006).

Muitos LIs mostraram ser biocompatíveis com várias células íntegras de micro-organismos, tais como *S. cerevisiae*, *Escherichia coli* e *Geotrichum candidum*, entre outras. Por exemplo, BRÄUTIGAM et al. (2009) realizaram o estudo da aplicabilidade de 21 LIs, para serem utilizados como fase orgânica na redução assimétrica de várias cetonas catalisada por uma *E. coli* recombinante sobre-expressando os genes de uma álcool desidrogenase de *Lactobacillus brevis* (“*Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase” LB-ADH) e uma formato desidrogenase de *Candida boidinii* (“*Candida boidinii*formate dehydrogenase” CB-FDH) para regeneração das coenzimas (Figuras 22 e 23).

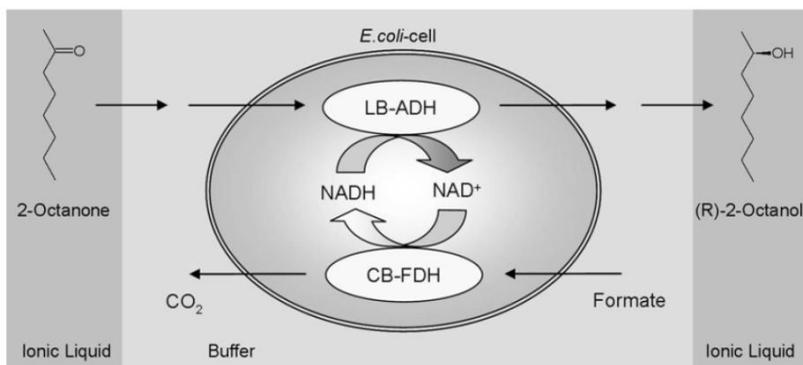


Figura 22. Ilustração da biotransformação assimétrica da 2-octanona para (R)-2-octanol mediada por *E. coli* em sistema bifásico com líquido iônico.

Fonte: (BRÄUTIGAM et al., 2009)

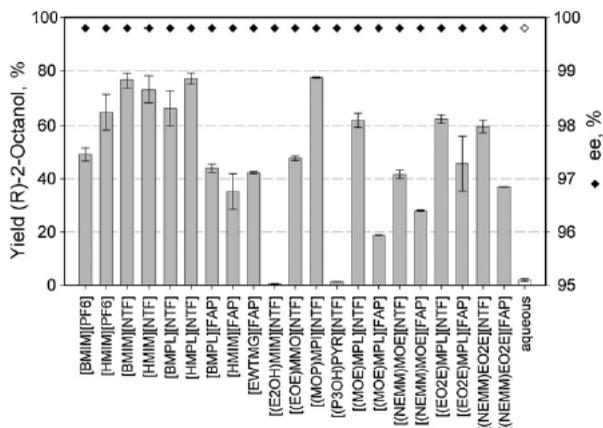


Figura 23. Variação do rendimento e *e.e.* na biotransformação assimétrica da 2-octanona para (*R*)-2-octanol mediada por *E. coli* em sistema bifásico com vários líquidos iônicos.

Fonte: (BRÄUTIGAM et al., 2009)

Dos 21 LIs utilizados na redução da 2-octanona para a formação do (*R*)-2-octanol, 9 foram os mais eficientes, tais como o [BMIM][NTF], [HMPL][NTF] e [(MOP)MPI][NTF], formando o produto com rendimentos variando de 60 – 80% após 1 h de reação. Os LIs [(E2OH)MIM][NTF] e o [(P3OH)PYR][NTF] não foram eficientes na redução da 2-octanona, onde os produtos foram formados com baixos rendimento, sendo <2%. Com os outros 10 líquidos iônicos, as conversões em produto variaram de 20 – 60 %. É importante salientar que os *e.e.* dos produtos com todos os LIs utilizados foram sempre >99%. A partir destes resultados, pode-se concluir que os LIs apresentaram boa biocompatibilidade com as células íntegras utilizadas, onde o produto foi formado com bons rendimentos e excesso enantiomérico.

A seguir será apresentada uma breve revisão sobre cromatografia em fase gasosa com fase estacionária quiral que é a técnica de monitoramento das conversões em produto utilizada neste trabalho.

1.6. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL

A formação dos produtos obtidos nas reações biocatalisadas pelas leveduras e fungos, pode ser monitorada por várias técnicas de análises, tais como ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), cromatografia em fase gasosa (CG), cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e polarimetria. Uma das mais utilizadas é a cromatografia em fase gasosa com fase estacionária quiral (CG-quiral) devido à facilidade com que se efetua a separação, identificação e quantificação das espécies químicas envolvidas nos processos biocatalíticos (WARD; WARD, 2010).

A CG-quiral está baseada em associações moleculares que podem levar a um reconhecimento quiral suficiente que resulte em uma resolução enantiomérica. A razão dos picos fornece uma medida da composição enantiomérica da amostra precisa e quantitativa. Tais medidas podem ser realizadas com um alto grau de precisão (COLLINS, 2006) (STALCUP, 2010).

As ciclo-dextrinas (CDs) ou seus derivados (α , β , γ) têm sido amplamente aplicadas com muita eficiência na separação de enantiômeros pela cromatografia líquida ou gasosa, através do desenvolvimento de colunas com fases estacionárias quirais (COLLINS, 2006) (SCHURIG, 2010). Na Figura 24 está apresentada a estrutura de fase estacionária quiral formada de β -CD.

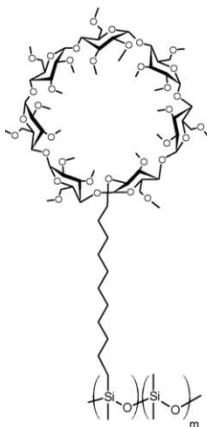


Figura 24. Estrutura de uma fase estacionária quiral contendo β -ciclo-dextrina (Chirasil-Dex).

Fonte: (SCHURIG, 2010)

O enantiômero a ser analisado é submetido a interações diastereoisoméricas rápidas e reversíveis com a fase estacionária e, portanto, pode ser eluído em diferentes velocidades. A resolução dos enantiômeros pela cromatografia baseia-se na diferença entre energias livres de formação dos intermediários diastereoisoméricos transitórios formados durante a eluição. A designação da configuração absoluta, portanto, envolverá a correlação da configuração molecular com a ordem da eluição do enantiômero. Outro fator importante no parâmetro de CG é o da separação do pico, chamado de seletividade (STALCUP, 2010) (COLLINS, 2006).

Existem certamente limitações para este método, algumas das quais são características para a cromatografia em fase gasosa. As amostras deverão ser suficientemente voláteis e termicamente estáveis e, é claro, deverão ser quantitativamente resolvida na fase quiral da cromatografia gasosa (SCHURIG, 2010).

1.7. EXTRAÇÃO DOS REAGENTES E PRODUTOS DO MEIO AQUOSO PARA MONITORAMENTO DAS CONVERSÕES EM CG-QUIRAL

Como mencionado anteriormente, o meio aquoso é o mais adequado para realizar as reações catalisadas por enzimas e células íntegras, pois dessa forma as condições ideais para a sua sobrevivência são mantidas. Entretanto, a determinação das conversões das reações são normalmente realizadas por CG, e assim faz-se necessário uma etapa de extração para a separação dos reagentes e produtos do meio aquoso. A extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid extraction* LLE) é uma das técnicas mais empregadas, porém alguns inconvenientes, tais como a formação de emulsão, utilização de grandes volumes de solvente tóxico e a geração de grande quantidade de resíduos, tornam essa técnica muito trabalhosa, de alto custo, demorada e ambientalmente indesejada (KOKOSA; PRZYJAZNY; JEANNOT, 2009). Para minimizar esses problemas e tornar o monitoramento das reações menos agressivo ao meio ambiente, técnicas modernas de microextração que utilizam quantidades mínimas de solventes orgânicos podem ser utilizadas, tais como, a microextração em fase líquida com fibras ocas (“hollow fiber liquid-phase microextraction” HF-LPME) (CARLETTO; CARASEK; WELZ, 2011) (BEDENDO; JARDIM; CARASEK, 2012).

A HF-LPME foi idealizada por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen em 1999 e pode ser considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes. Os poros de uma membrana capilar porosa e hidrofóbica (fibra oca), como por exemplo, a de polipropileno são impregnados com o solvente orgânico de extração e o seu lúmen é preenchido com microlitros de uma fase

aceptora. Com isso, a fase aceptora não entra em contato direto com a matriz aquosa (fase doadora), permitindo aplicar agitação constante durante a extração. A HF-LPME é uma técnica de extração em equilíbrio onde a concentração do analito na solução aceptora aumenta em um certo nível, e subsequentemente o sistema entra em equilíbrio e a concentração do analito na fase aceptora permanece constante. Assim a HF-LPME não é uma técnica de extração exaustiva como a LLE e a extração em fase sólida (Solid-Phase Extraction SPE) (KOKOSA; PRZYJAZNY; JEANNOT, 2009) (OLIVEIRA et al., 2008) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Há duas configurações principais em que a HF-LPME é empregada. A mais utilizada é a configuração em “U” (Figura 25A), que utiliza duas microsseringas conectadas à fibra, e a configuração tipo “haste”, onde somente uma microsseringa é utilizada para injetar e coletar a fase aceptora (Figura 25B) (KOKOSA; PRZYJAZNY; JEANNOT, 2009) (OLIVEIRA et al., 2008).

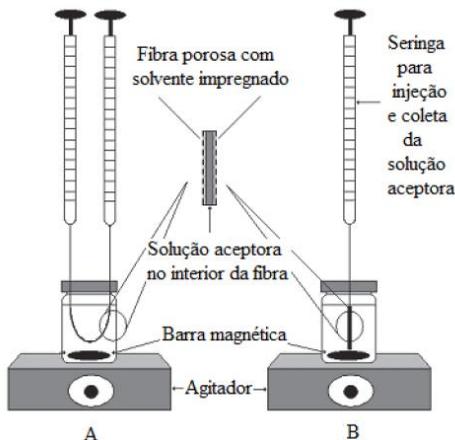


Figura 25. Configurações da HF-LPME mais empregadas. Sistema em “U” (A) e sistema tipo “haste” (B).

Fonte: (OLIVEIRA et al., 2008)

A HF-LPME vem sendo muito utilizada na pré-concentração de metais pesados, pesticidas e na extração de fármacos de fluídos biológicos tais como, plasma, sangue total, urina, leite materno, saliva e cabelo (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008). Por exemplo, EMÍDIO et al. (2010) otimizaram os parâmetros de extração da HF-LPME para determinação de Δ^9 -tetraidrocannabinol (Δ^9 -THC), canabidiol (CBD) e canabinol (CBN) em cabelo

humano por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas operando no modo sequencial (GC/EM//EM).

A partir destas considerações teóricas, a microextração líquida com fibras ocas mostra ser uma alternativa viável e ambientalmente correta para a extração dos reagentes e produtos do meio aquoso para monitoramento das conversões das reações biocatalisadas por células íntegras de microorganismos. Sendo assim, neste trabalho será testada uma nova técnica de extração baseada em microextração líquido-líquido-líquido com membrana porosa de polipropileno (HF-LLLME) que é derivada da HF-LPME.

1.8. METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A metodologia de superfície de resposta (RSM “*Response Surface Methodology*”) é um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para o desenvolvimento, melhoria e otimização de processos em que a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis e o objetivo é otimizar essa resposta. A RSM tem aplicação importante no planejamento, desenvolvimento, e da formulação de novos produtos, bem como na melhoria da concepção do produto existente. Essa metodologia define o efeito de variáveis independentes, sozinho ou em combinação, sobre os processos. Além de avaliar os efeitos das variáveis independentes, essa metodologia experimental gera um modelo matemático que descreve processos químicos ou bioquímicos (BAŞ; BOYACI, 2007).

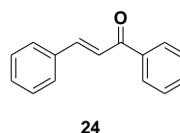
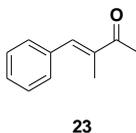
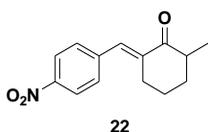
2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a biotransformação de olefinas ativadas, em meio aquoso, ou em sistema bifásico, mediada por leveduras *S. cerevisiae*, *Cryptococcus flavescens* e *Spathaspora xylofermentans* ou por fungos endofíticos isolados da *Aspidosperma excelsum* Benth (carapanaúba, uma espécie de planta comum da região Amazônica).

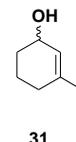
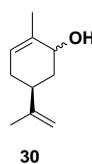
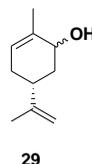
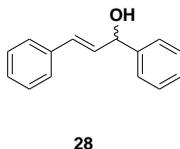
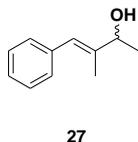
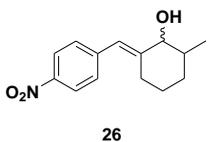
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar, purificar e caracterizar as olefinas ativadas, (6*E*)-2-metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona (**22**), (3*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona (**23**) e (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (**24**), para serem utilizadas como substratos na biorredução catalisadas por leveduras.



2. Realizar a reação de redução *via* química da (4*R*)-carvona (**7**) e (4*S*)-carvona (**8**) com zinco metálico em etanol e água, para a obtenção das correspondentes di-hidrocarvonas **9** e **10**.

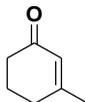
3. Preparar os álcoois **26**, **27**, **28**, **29**, **30** e **31** através da redução dos substratos **7**, **8**, **22**, **23**, **24** e **25** com boroidreto de sódio para serem utilizados como padrões nas análises de CG-quiral.



4. Utilizar as leveduras *S. cerevisiae* (FP, CAT-1 e PE-2) como catalisadores na biotransformação da (4*R*)-carvona e verificar a influência de diversos parâmetros reacionais, tais como meio reacional, concentração de

substrato e levedura, temperatura, pH, adição de aditivos no meio aquoso, tais como líquidos iônicos, compostos sulfurados (DMSO e L-cisteína), solventes polares e apolares, açúcares e polióis (glicerol, sacarose e trealose) e porcentagem do aditivo (v/v).

5. Realizar a biorredução das olefinas **8**, **22**, **23**, **24** e 3-metil-ciclohexen-2-ona (**25**) com a melhor condição obtida na biorredução da (4*R*)-carvona com FP, para verificar a eficiência do biocatalisador frente a outros substratos.



25

6. Desenvolver uma metodologia para extração dos reagentes e produtos do meio aquoso para o monitoramento das conversões das reações biocatalisadas, utilizando HF-LLLME.

7. Otimizar as condições reacionais da redução enzimática da (4*S*)-carvona mediada por leveduras *S. cerevisiae* em meio aquoso tais como, temperatura, tempo, pH, concentração do tampão, razão substrato/levedura (S/L) e adição de aditivos, usando metodologia de superfície de resposta.

8. Realizar a redução em microescala da (4*S*)-carvona com as leveduras *S. cerevisiae*, *C. flavescens* (Pal) e *S. xylofermentans* (Spat) e com os fungos de plantas da floresta Amazônica.

9. Otimizar as condições reacionais da redução enzimática da (3*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona **23** mediada por FP em meio aquoso tais como, temperatura, tempo, pH, concentração de enzima e substrato, utilizando a metodologia de superfície de resposta.

10. Efetuar para fins comparativos as reações citadas acima, na ausência do biocatalisador.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPAMENTOS

- Agitadores magnéticos (Dist);
- Banho termostatzado (Micro Química MOBTZ99 – 20);
- Rotaevaporador (Buchi 461);
- Balanças analíticas Marte A 500;
- Agitador orbital (Certomat MO);
- Cromatógrafo a gás (Agilent 7820A) equipado com coluna capilar de fase estacionária quiral da Restek (RT – BetaDex – SM 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) ou Supelco (Beta Dex™ 110 30 m x 0,25mm x 0,25µm);
- Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu GC–EM 2010 Plus, coluna Restek (Rtx – 5MS 5% difenil – 95% dimetilpolisiloxano, 30m x 0,25 mm x 0,25 µm) – Lab 209 – Professor Drº Eduardo Carasek;
- Polarímetro (Polartronic E Schmidt e Haensch);
- Espectrofotômetro ABB Bomer FTLA 2000 – 100 Perkin Elmer FT – IR 1600 – Central de Análises – UFSC;
- Espectrômetro de RMN da Bruker AC 200F – 400 MHz – Central de Análises – UFSC.

3.2. REAGENTES, SOLVENTES E BIOCATALISADORES

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau P. A.

3.2.1. Reagentes, solventes e membrana

- Sigma Aldrich: (4*R*)-(–)-carvona (98%); (4*S*)-(+)–carvona (98%); (–)-di-hidrocarveol [(75% – (1*R*,2*R*,4*R*), 6% – (1*S*,2*S*,4*R*), 3% – (1*R*,2*S*,4*R*), 13% – (1*S*,2*R*,4*R*)] (padrão); (+)-di-hidrocarveol [(75% – (1*S*,2*S*,4*S*), 6% – (1*R*,2*R*,4*S*), 3% – (1*S*,2*R*,4*S*), 13% – (1*R*,2*S*,4*S*)] (padrão); 3-metil-ciclo-hexen-2-ona; 4-nitro-benzaldeído; 2-metil-ciclo-hexanona; sacarose; trealose.

- Vetec: benzaldeído; acetona; fosfato de potássio bibásico; ácido bórico; diclorometano; acetato de etila; glicerol; *tert*-butanol; sílica gel 60 para cromatografia em coluna 70 – 230 mesh.
- Ecibra: 2-butanona.
- Riedel-di-Haen: acetofenona.
- Merck: boroidreto de sódio; L-cisteína.
- Grupo Química: hidróxido de sódio; etanol; *N,N*-dimetilformamida (DMF); dimetilsulfóxido (DMSO).
- Cromato produtos químicos: ácido cítrico.
- F. Maia: *n*-hexano; tolueno; tetrahidrofurano (THF).
- CIL: clorofórmio deuterado (99,8%).
- Fluka: tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][BF₄] (97%); hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][PF₆] (96%); tetrafluoroborato de 1-butil-4-metil piridínio [BMPy][BF₄] (96%).
- Membrane GmbH: Membrana porosa de polipropileno (Q 3/2 accurel) diametro interno (600 μm), espessura da parede (200 μm), tamanho dos poros (0,2 μm) e porosidade (~75%).

3.2.2. Biocatalisadores

- Fermento biológico Fleischmann (leveduras secas de *S. cerevisiae*);
- Linhagens industriais CAT-1 e PE-2 de *S. cerevisiae* (leveduras secas);
- Leveduras de *C. flavescens* (Pal) e *S. xylofermentans* (Spat)¹;
- Fungos isolados da *Aspidosperma excelsum* Benth (carapanaúba), uma espécie de planta comum da região Amazônica².

¹ As leveduras *C. flavescens* foram coletadas no parque Palmital, em Chapecó/SC e a *S. xylofermentans* na Floresta Amazônica de Roraima, ambas foram crescidas em meio de D-xilose pela aluna de mestrado Alice Heidrich Prompt do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

² Os fungos isolados de plantas da floresta Amazônica foram gentilmente fornecidos pela Profa. Dra. Sandra Patrícia Zanotto do grupo de pesquisa do laboratório de Bio-orgânica da Universidade Estadual do Amazonas (UEA), e cultivados em nosso laboratório de pesquisa.

3.3. CRESCIMENTO DOS FUNGOS

Os fungos isolados da carapanaúba (CG 0504 e CF 0305) foram crescidos em meio de batata-dextrose-ágar (BDA), conforme procedimento descrito por ZANOTTO et al., (2009) e descrito a seguir.

Em um béquer de 1 L adicionaram-se 250 mL de água destilada e 50 g de batata picada. As batatas foram cozidas durante 20 minutos. Após resfriada, a solução foi filtrada com gaze, e ao caldo adicionaram-se 5 g de dextrose e água suficiente para completar 500 mL, o pH foi ajustado para 5,8 com adição de NaOH ou HCl e posteriormente foram acrescentados 3,75 g de ágar. Em seguida, a solução foi esterilizada em 121°C a 1 atm por 15 minutos em uma autoclave. O meio de cultura foi vertido ainda líquido sobre uma placa de Petri estéril. Sobre o meio de cultura sólido, foram semeados os fungos. Estes foram cultivados por aproximadamente 14 dias. Após decorrido esse tempo, foram cortados em cubos com aproximadamente 1 cm² e depositados no meio líquido de BDA. Esse meio foi incubado em temperatura ambiente por 9 dias em um agitador orbital (150 rpm) a 28 °C. Os micélios do fungo foram coletados do meio de cultura, filtrados a vácuo, lavados com água e acetona, secos por 48 h em um dessecador e posteriormente pesados.

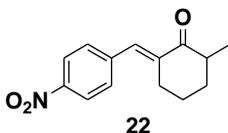
3.4. PREPARAÇÃO DAS OLEFINAS ATIVADAS **22**, **23** E **24**

3.4.1. Preparação das olefinas ativadas **22** e **24** *via* condensação aldólica básica

Em um balão de 125 mL, munido de agitação magnética, adicionaram-se aproximadamente 15 mL de etanol, acetofenona (21,0 mmol) e o benzaldeído (21,0 mmol) (para formação de **24**) ou 2-metil-ciclo-hexanona (21,0 mmol) e o 4-nitro-benzaldeído (21,0 mmol) (para formação de **22**). Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foram gotejadas lentamente ~8 gotas de solução de NaOH 50%, até atingir o pH ~10, e a mistura foi mantida à temperatura ambiente. A formação do produto foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando como eluente a mistura de *n*-hexano:acetato de etila (9:1 ou 6:4 v/v). Ao final da reação, a mistura foi deixada na geladeira por uma noite, sendo em seguida filtrada em funil de Büchner e o produto foi lavado com etanol a frio. As olefinas ativadas foram recristalizadas com etanol absoluto a quente e a seguir determinou-se o ponto de fusão. O produto da reação foi pesado, e então calculado o rendimento.

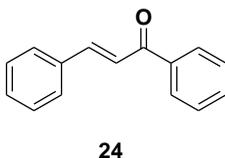
Os compostos obtidos foram caracterizados por técnicas de IV, RMN de ^1H , CG-quiral e CG/EM, e os respectivos cromatogramas e os espectros encontram-se no Apêndice A.

➤ (6E)-2-metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona **22**



$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ (245,3 g mol $^{-1}$); tempo reacional de 9 h; sólido amarelo claro; 4,9 g (87 %); p.f.: 115 – 117 °C (p.f. não encontrado na literatura); R_f : 0,29 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3426, 2936 – 2866, 1674, 1602, 1512, 1343, 1145, 11,08, 999, 937, 845, 754; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1,20 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,91 – 2,11 (m, 2H), 1,60 – 1,64 (m, 3H), 2,48 – 2,64 (m, 2H), 2,95 – 2,99 (m, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,48 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) e 8,23 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H); CG-quiral $t_R = 24,0$ min; CG/EM $t_R = 22,2$ min; $m/z = 245$ (M^+), 217, 128, 115, 81, 55. [Condições de programação CG-quiral e CG/EM: conforme descrito no item 3.12.3]

➤ (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona **24**



$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}$ (208,3 g mol $^{-1}$); tempo reacional de 5 h; sólido amarelo claro; 3,5 g (80 %); p.f.: 53 – 54 °C (Lit. (LI et al., 2002) 57 – 58 °C); R_f : 0,47 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3050, 1663, 1606, 1572, 1446, 1285, 988, 750, 687; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7,42 (m, 3H), 7,50 – 7,66 (m, 6H), 7,82 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H); CG-quiral $t_R = 17,3$ min; CG/EM $t_R = 22,7$ min; $m/z = 208$ (M^+), 207, 131, 105, 103, 77. [Condições de programação CG-quiral e CG/EM: conforme descrito no item 3.12.5.]

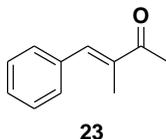
3.4.1. Preparação da olefina ativada **23** via condensação aldólica ácida

A olefina **23** foi preparada de acordo com a metodologia descrita a seguir e adaptada de LU; BOLM, (2008).

Em um erlenmeyer, adicionaram-se 10 mL de ácido acético, 3,6 g (50,0 mmol) de 2-butanona e 2,7 g (25,0 mmol) de benzaldeído. Esta mistura foi mantida sob agitação constante à temperatura ambiente. Sobre essa solução adicionaram-se lentamente 2,4 g de H₂SO₄. Após o término da reação adicionaram-se 25 mL de água à mistura reacional, neutralizou-se com NaOH (25% m/v) e extraiu-se com acetato de etila (2 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com 10 mL solução aquosa de NaHCO₃ e 10 mL de uma solução saturada de NaCl ("brine"). O solvente foi evaporado e o produto **23** purificado em coluna cromatográfica com *n*-hexano/acetato de etila (9/1 v/v) como eluente.

O produto foi caracterizado por RMN de ¹H e CG-quiral e os cromatogramas e espectros estão apresentados no Apêndice A.

➤ (3*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona **23**



C₁₁H₁₂O (160,2 g mol⁻¹); tempo reacional de 4 h; líquido amarelo castanho; 3,28 g (82 %); R_f: 0,58 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7,42 – 7,52 (m, 6H), 2,46 (s, 3H), 2,05 (s, 3H); CG-quiral t_R = 12,5 min. [Condições de programação CG-quiral: conforme descrito no item 3.12.4.]

3.5. PREPARAÇÃO DAS DI-HIDROCARVONAS A PARTIR DE **7** E **8**

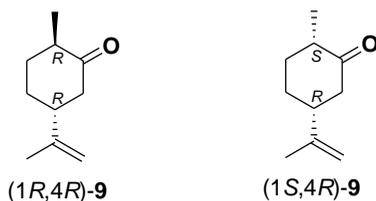
As di-hidrocarvonas foram preparadas de acordo com a metodologia descrita a seguir, e adaptada de FAIRLIE, HODGSON e MONEY, (1973).

Uma mistura de zinco metálico (2,5 g), hidróxido de potássio (1,0 g, 17,5 mmol), etanol absoluto (10 mL) e água (4 mL) foram mantidos sob refluxo com agitação vigorosa. Após, adicionou-se lentamente a carvona (2,5 g, 16,6 mmol) solubilizada em 4 mL de etanol. Ao final da reação a mistura foi filtrada e o solvente evaporado em um rotaevaporador. Após a evaporação do

solvente a mistura reacional foi tratada com "brine" e extraída com diclorometano (2 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 , o solvente evaporado e o produto purificado em coluna cromatográfica com *n*-hexano/acetato de etila (9/1 v/v) como eluente.

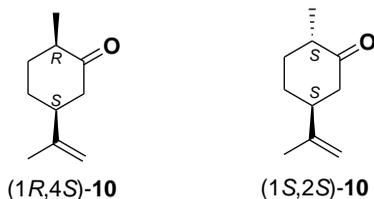
As di-hidrocarvonas **9** e **10** foram caracterizadas e analisadas por técnicas de RMN de ^1H , CG-quiral e CG/EM e espectros estão apresentados no Apêndice A.

➤ (1*R*,4*R*)- e (1*S*,4*R*)-di-hidrocarvona **9**



$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ (150,2 g mol⁻¹); tempo reacional de 24 h; líquido amarelo claro; 0,75 g (30%); razão de (1*S*,4*R*)-**9**/(1*R*,4*R*)-**9** de 1:4,6 (determinado por CG-quiral); R_f : 0,67 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 1,03 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H), 1,09 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H) 1,73 (s, 3H), 1,74 (s, 3H), 1,3 – 2,5 (m, 16H) 4,68 – 4,83 (m, 4H); CG-quiral $t_R = 6,4$ min (1*S*,4*R*)-**9** e 6,5 min (1*R*,4*R*)-**9**; CG/EM $t_R = 8,2$ min (1*R*,4*R*)-**9** e 8,4 min (1*S*,4*R*)-**9**; $m/z = 152$ (M^+), 123, 109, 95, 67 e 41. [Condições de programação CG-quiral e CG/EM: conforme descrito no item 3.12.1.]

➤ (1*R*,4*S*)- e (1*S*,4*S*)-di-hidrocarvona **10**



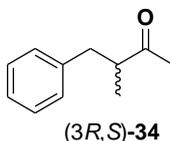
$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ (150,2 g mol⁻¹); tempo reacional de 24 h; líquido amarelo claro; 1,05 g (42%); razão de (1*R*,4*S*)-**10**/(1*S*,4*S*)-**10** de 1:4,3 (determinado por CG-quiral); R_f : 0,67 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1,03 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H), 1,08 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H) 1,74 (s, 3H), 1,74 (s, 3H), 1,3–2,6 (m, 16H) 4,69 – 4,83 (m, 4H).; CG-quiral $t_R = 8,8$ min (1*S*,4*S*)-**10**

e 9,0 min (1*R*,4*S*)-**10**; CG/EM t_R = 10,0 min (1*S*,4*S*)-**10** e 10,2 min (1*R*,4*S*)-**10**; m/z = 152 (M^+), 123, 109, 95, 67 e 41. [Condições de programação CG-quiral e CG/EM: conforme descrito no item 3.12.2.]

3.6. PREPARAÇÃO DA (*R,S*)-3-METIL-4-FENIL-2-BUTANONA **34**

O procedimento para a preparação de **34** foi realizado conforme descrito no item 3.5.

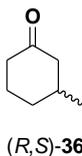
A cetona **34** foi caracterizada por técnicas de RMN de ^1H , CG-quiral e os cromatogramas e espectros estão apresentados no Apêndice A.



$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}$ (262,2 g mol^{-1}); tempo reacional de 8 h; líquido castanho claro; 1,3 g (50 %); R_f : 0,55 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1,09 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,53 – 2,59 (dd, J = 13,6 e 7,6 Hz, 1H), 2,80 – 2,85 (m, 1H), 2,97 – 3,02 (dd, J = 13,6 e 6,8, 1H), 7,17 – 7,32 (m, 5H); CG-quiral t_R = 11,9 e 12,0 min. [Condições de programação CG-quiral: conforme descrito no item 3.12.4.]

3.7. PREPARAÇÃO DA (*R,S*)-3-METIL-CICLO-HEXANONA **36**

A (*R,S*)-3-metil-ciclo-hexanona **36** foi preparada *via* hidrogenação catalítica com Pd/C sobre pressão a partir da olefina **25**, conforme procedimento descrito por FURNISS; VOGEL, (1987).



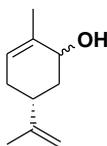
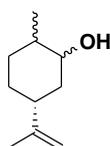
$C_7H_{12}O$ ($112,2 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional de 12 h; líquido incolor; 0,1 g (10 %); R_f : 0,65 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV v_{\max}/cm^{-1} (filme): 2952 – 2869, 1712, 1457, 1224, 1057, 775, 691; RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 0,76 (d, $J = 6,4 \text{ Hz}$, 3H), 1,14 – 1,24 (m, 1H), 1,45 – 1,57 (m, 1H), 1,69 – 1,92 (m, 4H), 2,05 – 2,25 (m, 3H); CG-quiral $t_R = 4,3$ e 4,4 min; CG/EM $t_R = 4,7$ min; $m/z = 112$ (M^+), 97, 69, 56, 41. [Condições de programação CG-quiral e CG/EM: conforme descrito no item 3.12.6.]

3.8. REDUÇÃO VIA QUÍMICA DAS OLEFINAS ATIVADAS

Para obtenção dos álcoois que foram utilizados como padrões nas análises de CG-quiral, CG/EM e de RMN de 1H , os compostos **7**, **8**, **22**, **23**, **24** e **25** foram reduzidos com $NaBH_4$ de acordo com a metodologia descrita a seguir e adaptada de FURNISS; VOGEL, (1987).

Adicionou-se lentamente, à temperatura ambiente, em um balão de fundo redondo, 0,5 g dos substratos dissolvidos em aproximadamente 20 mL de etanol e a seguir foi adicionado $NaBH_4$ em excesso (~0,3 g) e 1,0 g de sílica gel. A reação foi monitorada por CCD utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila (9:1 ou 6:4 v/v). Ao final, a mistura foi filtrada, e o solvente evaporado em rotaevaporador. Após a evaporação do solvente a mistura reacional foi lavada com aproximadamente 15 mL de diclorometano e filtrada para retirar o sólido branco remanescente no balão. A seguir, o solvente foi novamente evaporado e os álcoois foram purificados em coluna cromatográfica com *n*-hexano/acetato de etila (9/1 v/v) como eluente. Os correspondentes álcoois foram submetidos às análises de IV, RMN de 1H , CG-quiral CG/EM.

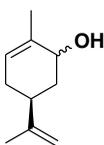
➤ Carveol **29** e di-hidrocarveol **11**

**29****11**

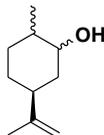
29 $C_{10}H_{16}O$ ($152,2 \text{ g mol}^{-1}$) e **11** $C_{10}H_{18}O$ ($154,2 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional de 0,5 h; líquido incolor; 0,25 g (50 %); R_f : 0,18 e 0,37 (*n*-

hexano:acet.etíla, 9:1 v:v); IV v_{\max}/cm^{-1} (filme): 3343, 2967 – 2856, 1645, 1452, 1374, 1038, 888; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 0,86 – 2,14 (m, 11H), 4,15 (s, 1H), 4,65 – 4,69 (m, 2H), 5,45 – 5,46 (m, 1H); CG-quiral $t_R = 7,9, 8,8, 9,1, 10,8, 11,1$ min; CG/EM $t_R = 8,1$ e $9,0$ min; $m/z = 154, 136, 121, 107, 93, 67, 41$ e 152 (M^+), 134, 119, 109, 84, 69,41. [Condições de programação CG-quiral e CG/EM: conforme descrito no item 3.12.1.]

➤ Carveol **30** e di-hidrocarveol **12**



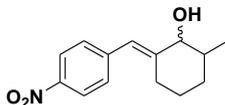
30



12

30 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ ($152,2 \text{ g mol}^{-1}$) e **12** $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ ($154,2 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional de 0,5 h; líquido incolor; 0,32 g (64 %); R_f : 0,18 e 0,37 (*n*-hexano:acet.etíla, 9:1 v:v); IV v_{\max}/cm^{-1} (filme): 3342, 2967 – 2856, 1645, 1451, 1435, 1374, 1038, 888; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 0,90 – 2,25 (m, 11H), 4,16 (s, 1H), 4,66 – 4,70 (m, 2H), 5,46 – 5,47 (m, 1H); CG-quiral $t_R = 9,2, 9,3, 9,8, 9,9, 10,0$ min; CG/EM $t_R = 10,0$ e $10,9$ min; $m/z = 154, 136, 109, 84, 55, 41$ e 152 (M^+), 134, 119, 109, 84, 55,41. [Condições de programação CG-quiral e CG/EM: conforme descrito no item 3.12.2.]

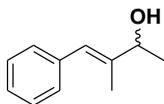
➤ (1*R,S*)-(6*E*)-2-metil-6-[(4-nitrofenil)-metilene]-ciclo-hexanol **26**



26

$C_{14}H_{17}NO_3$ ($247,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional de 0,5 h; líquido amarelo claro; 0,35 g (70 %); R_f : 0,25 (*n*-hexano:acet.etíla, 9:1 v:v); IV v_{\max}/cm^{-1} (filme): 3418, 2919, 1649, 1594, 1518, 1342, 1108, 1084, 1052, 862; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1,00 – 1,81 (m, 9H), 2,40 (m, 1H), 2,81 – 2,84 (m, 1H), 3,77 – 3,79 (m, 1H), 6,49 (s, 1H), 7,33 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 2H), 8,17 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 2H); CG-quiral $t_R = 24,8 \text{ min}$. [Condições de programação CG-quiral: conforme descrito no item 3.12.3.]

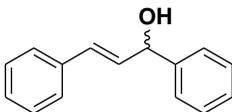
➤ (2*R,S*)-(3*E*)-metil-4-fenil-3-buten-2-ol **27**



27

$C_{11}H_{14}O$ ($162,2 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional de 0,5 h; líquido amarelo claro; 0,43g (86 %); R_f : 0,39 (*n*-hexano:acet.etíla, 9:1 v:v); RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1,33 (d, $J = 6,4 \text{ Hz}$, 3H), 1,85 (s, 3H), 4,34 (d, $J = 6,4 \text{ Hz}$, 1H), 6,48 (s, 1H), 7,25 – 7,3 (m, 5H); CG-quiral $t_R = 14,2 \text{ min}$. [Condições de programação CG-quiral: conforme descrito no item 3.12.4.]

➤ (1*R,S*)-(2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ol **28**



28

$C_{15}H_{14}O$ ($210,3 \text{ g mol}^{-1}$); tempo reacional de 0,5 h; sólido branco; 0,42 g, (84 %); p.f.: 49 °C (Lit. (ZEYNIZADEH; BEHYAR, 2005) 56 – 57 °C); R_f : 0,29 (*n*-hexano:acet.etíla, 9:1 v:v); IV v_{\max}/cm^{-1} (KBr): 3345, 3027, 1599, 1493, 1450, 1010, 966, 746, 696; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1,61 (s, 1H), 5,14 (m, 1H), 6,40 (m, 1H), 6,66 (dd, $J = 3,2$ e $16,0 \text{ Hz}$, 1H), 7,26 –

7,40 (m, 10H); CG-quiral $t_R = 18,1$ min. [Condições de programação CG-quiral: conforme descrito no item 3.12.5.].

➤ (1*R,S*)-3-metil-2-ciclo-hexen-1-ol (**31**) e 3-metil-ciclo-hexanol (**37**)



31 $C_7H_{12}O$ (112,2 g mol⁻¹) e **37** $C_7H_{12}O$ (114,2 g mol⁻¹); tempo reacional de 0,5 h; líquido incolor; 0,34 g (68 %); R_f : 0,55 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v:v); IV v_{max}/cm^{-1} (filme): 3344, 2929 – 2861, 1672, 1449, 1376, 1344, 1022, 958; RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 0,80 – 2,00 (m, 21H), 2,61 (s, 1H), 2,80 (s, 1H), 3,46 (m, 1H), 4,08 (s, 1H) 5,40 (s, 1H); CG-quiral $t_R = 4,8, 4,9, 5,5, 5,8$ min; CG/EM $t_R = 5,1$ e 5,8 min; $m/z = 114$ (M⁺), 96, 71, 57, 41; 112 (M⁺), 97, 84, 55, 41. [Condições de programação CG-quiral e CG/EM: conforme descrito no item 3.12.6.]

3.9. REDUÇÃO VIA ENZIMÁTICA DAS OLEFINAS ATIVADAS

Em um erlenmeyer de 125 mL, adicionaram-se o substrato (1,0 mmol), 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de solução tampão citrato/fosfato (0,2 mol L⁻¹/0,1 mol L⁻¹) e 3 g do biocatalisador (massa seca). Os frascos foram submetidos a agitação orbital com temperatura (20 - 50 °C) e agitação controlada (75 - 150 rpm). Foram periodicamente retiradas alíquotas do meio reacional e extraídas com diclorometano (2 x 15 mL) (LLE) ou foram extraídas com a técnica HF-LLLME. A formação dos produtos foi analisada por CCD e CG-quiral.

Para as reações onde foram utilizados os cossolventes, o procedimento experimental foi o seguinte: adicionou-se o biocatalisador em um erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de solução tampão, 1,0 mmol do substrato já previamente solubilizado em 3 mL dos cossolventes. Os frascos foram submetidos à agitação orbital com temperatura controlada. Alíquotas foram retiradas periodicamente do meio reacional, e a formação do produto foi analisada por CCD e CG-quiral. As quantidades utilizadas do biocatalisador e dos substratos assim como a temperatura, pH da solução tampão e cossolvente variaram conforme o experimento, e serão detalhadas no decorrer da apresentação dos resultados e discussão.

3.10. REDUÇÃO EM MICROESCALA DA (4S)-CARVONA MEDIADAS POR LEVEDURAS E FUNGOS

Em um frasco tipo falcon de 15 mL, adicionaram-se 1,44–2,75 μL de (4S)-carvona, 3 mL do meio de cultura ou tampão citrato/fosfato/borato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,5 e 172,3–329,5 mg do biocatalisador. Os frascos foram submetidos a agitação orbital com temperatura ($26 \text{ }^\circ\text{C}$) e agitação controladas (150 rpm). Após 48 h foram retiradas alíquotas do meio reacional e extraídas com a HF-LLLME. A formação dos produtos foi analisada por CCD e CG-quiral.

3.11. MICROEXTRAÇÃO COM MEMBRANA (HF-LLLME)

Os vários estágios do procedimento da microextração estão ilustrados na Figura 26. Uma membrana porosa, oca e tubular de polipropileno foi cortada em pequenos pedaços de aproximadamente 1,0 cm de comprimento (1) e inserida em um fio de aço inoxidável com o mesmo diâmetro interno da membrana, esta foi então fixada em um septo de silicone de uma tampa com rosca de um frasco de vidro de 4 mL (2). A membrana fixada foi então imersa no solvente extrator (tolueno) por alguns segundos e então adicionada ao frasco contendo uma amostra de aproximadamente 4 mL do meio reacional (3). Este sistema foi mantido sob agitação constante por 15 min (4). Após a extração, a membrana foi removida da amostra e do fio de aço e introduzida em um eppendorf contendo 75 μL de diclorometano (5). O eppendorf contendo a membrana e o diclorometano foi mantido em um banho de ultrassom durante 5 min para a etapa de extração de retorno. A solução resultante foi então diretamente analisada por CG.

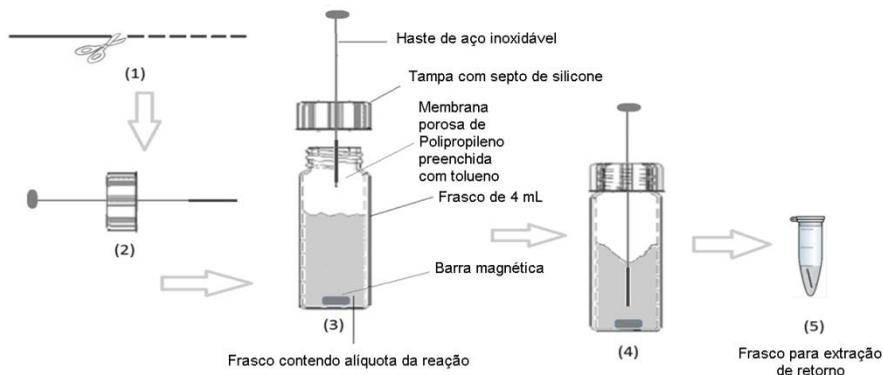


Figura 26. Representação esquemática das etapas do procedimento proposto para a extração dos reagentes e produtos do meio aquoso para o monitoramento da biorredução das olefinas ativadas usando HF-LLLME com membrana porosa de polipropileno.

3.12. DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

Para a determinação da porcentagem de conversão da biotransformação dos substratos, foram retiradas alíquotas do meio reacional periodicamente e analisadas por CG com uma coluna capilar com fase estacionária quiral da Restek ou da Supelco.

Como exemplo, a Figura 27 mostra um cromatograma de uma alíquota da reação de redução da (4*R*)-carvona catalisada por FP.

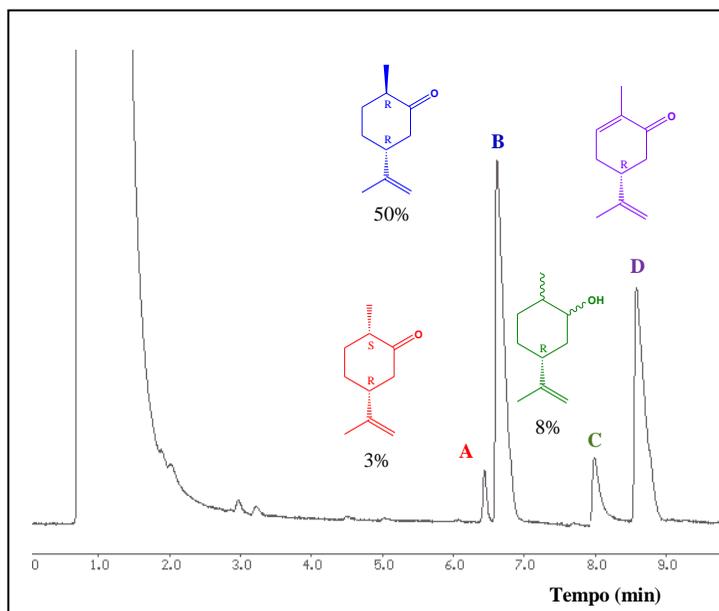


Figura 27. Cromatograma de CG-quiral de uma alíquota da biorredução da (4R)-carvona mediada por FP em meio aquoso. Compostos: (1S,4R)-*cis*-di-hidrocarvona (pico A), (1R,4R)-*trans*-di-hidrocarvona (pico B), (1R,2S,4R)-di-hidrocarveol (pico C), (4R)-carvona (pico D) [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.1.]

A conversão (c) em produto é calculada pela razão das áreas dos picos referentes ao reagente e aos produtos (Equação 1), e o excesso diastereoisomérico ($e.d.$) ou enantiomérico ($e.e.$) é calculado através da Equação 2 (SCHURIG, 2002) (COLLINS, 2006).

$$c = \frac{(\text{área do produto})}{\text{área do substrato} + (\text{área do produto})} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

$$e.d. \text{ ou } e.e. = \frac{\text{área do isômero maior} - \text{área do isômero menor}}{\text{área do isômero maior} + \text{área do isômero menor}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Os produtos foram caracterizados através das análises de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), através da presença do íon molecular e dos principais fragmentos obtidos para cada composto e pela comparação dos padrões de fragmentação usando os dados de base da biblioteca Nist 05 (NIST, Washington, D.C.) e espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H).

As condições de análise de CG-quiral e CG/EM para cada substrato estão apresentadas nos itens abaixo.

3.12.1. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a (4R)-carvona 7.

CG-quiral:

- Coluna: Restek
- Detector por ionização em chama (FID): 220 °C;
- Injetor split (50:1): 220 °C
- Fluxo do gás de arraste (H_2): 2,0 mL min⁻¹
- Temperatura do forno: 90 – 135 °C (10 °C/min), 135 – 160 °C (5 °C/min) e 160 – 230 °C (10 °C/min).
- volume da amostra: 1 µL

CG/EM:

- Coluna: Rtx[®]-5MS
- Detector quadrupolo: 200 °C
- Impacto de elétrons: 70 eV
- Temperatura de fonte de íons: 200 °C
- Linha de transferência: 250 °C
- Fluxo do gás de arraste (He): 1,0 mL min⁻¹
- Temperatura do forno: idem temperatura CG-quiral
- Injetor split (25:1) : 280 °C
- Modo full scan 40 - 400

3.12.2. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a (4S)-carvona 8.

Idem ao item 3.12.1 exceto:

CG-quiral:

- Coluna: Supelco
- Fluxo do gás de arraste (H_2): 0,76 mL min⁻¹
- Temperatura do forno: 90 – 135 °C (10 °C/min), 135 – 140 °C (2 °C/min) e 140 – 230 °C (10 °C/min).

3.12.3. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a (6E)-2-metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona **22**.

Idem ao item 3.12.1 exceto:

CG-quiral:

– Temperatura do forno: Isoterma de 220 °C

3.12.4. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a (3E)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona **23**.

Idem ao item 3.12.1 exceto:

CG-quiral:

– Fluxo do gás de arraste (H₂): 0,76 mL min⁻¹

– Temperatura do forno: 90 – 135 °C (10 °C/min), 135 – 140 °C (2 °C/min) e 140 – 230 °C (10 °C/min).

3.12.5. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona **24**.

Idem ao item 3.12.1 exceto:

CG-quiral:

– Temperatura do forno: 10 – 200 °C (15 °C/min).

3.12.6. Condições de programação do CG-quiral e CG/EM para a 3-metil-ciclo-hexen-2-ona **25**.

Idem ao item 3.12.1 exceto:

CG-quiral:

– Temperatura do forno: 100 a 200 °C (5 °C/min).

3.13. ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO

As superfícies de resposta utilizadas neste trabalho consistem da combinação entre m curvas univariadas de n níveis cada. No caso de superfícies completas, ou seja, sem nenhum tratamento estatístico para redução

do número de experimentos como matriz Doehlert, Box-Behnken ou composto central, por exemplo, o número total de experimentos será $n \times m$.

Por exemplo, para a construção da superfície apresentada na Figura 55, as variáveis otimizadas foram temperatura e tempo de reação, sendo que foram utilizadas 5 temperaturas (20, 26, 30, 35 e 40 °C) e 3 tempos reacionais (24, 48 e 72 h).

Na Tabela 3 estão apresentados os dados referentes à superfície apresentada na Figura 55.

Tabela 3. Dados referentes à superfície apresentada na Figura 55.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Conversão em (1R,2R,4S)-12
20	24	9,5
26	24	15,1
30	24	20,3
35	24	29,9
40	24	44,2
20	48	19,4
26	48	36,5
30	48	42,5
35	48	37,9
40	48	52,2
20	72	29,3
26	72	44,5
30	72	43,3
35	72	39,0
40	72	52,7

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. REDUÇÃO VIA QUÍMICA E ENZIMÁTICA DA (4R)-CARVONA

Primeiramente serão abordados os resultados relacionados à síntese das di-hidrocarvonas (1*R*,4*R*)-**9** e (1*S*,4*R*)-**9** e dos correspondentes álcoois pela redução da (4*R*)-carvona com zinco metálico e com NaBH₄ respectivamente. Estes compostos foram utilizados como padrões nas análises de CG-quiral e CG/EM. Em seguida, serão abordados os estudos realizados da biotransformação de **7** mediada pela levedura *S. cerevisiae* (FP, CAT-1 e PE-2) em sistema bifásico ou em meio aquoso.

4.1.1. Preparação das di-hidrocarvonas com zinco metálico

As di-hidrocarvonas **9** foram preparadas conforme procedimento descrito na literatura a partir da (4*R*)-carvona, utilizando zinco metálico. (Figura 28)

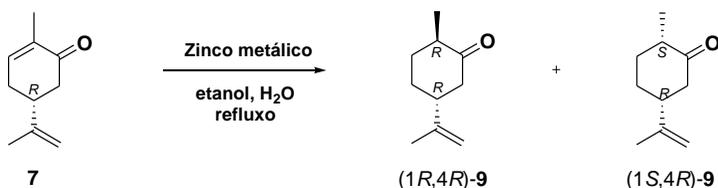


Figura 28. Redução *via* química da (4*R*)-carvona com zinco metálico.

As di-hidrocarvonas (1*S*,4*R*)-**9** e (1*R*,4*R*)-**9** foram obtidas na forma de óleo com rendimento de 30%. Estas foram identificadas por CG-quiral e CG/EM e RMN de ¹H.

Na Figura 29, está demonstrado o cromatograma de CG-quiral de uma alíquota da reação de redução da carvona com zinco metálico.

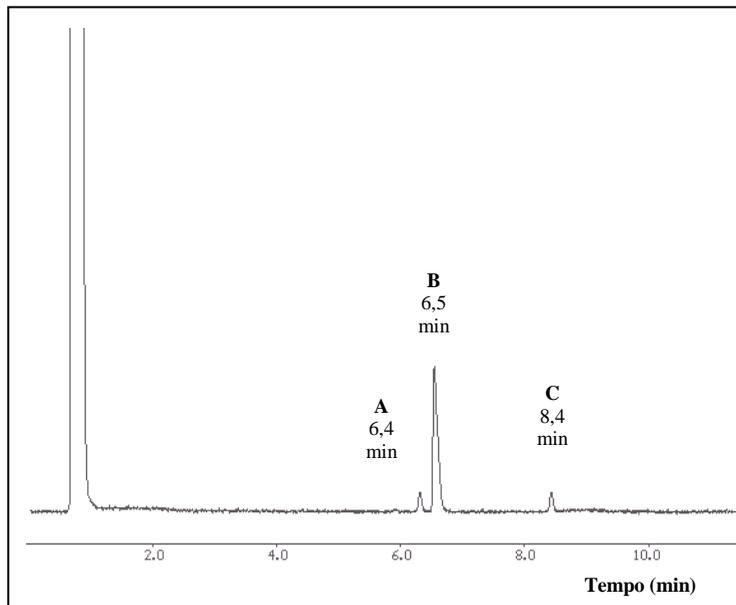


Figura 29. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução da (4*R*)-carvona (pico C) com zinco metálico. Compostos: (1*S*,4*R*)-**9** (pico A) e (1*R*,4*R*)-**9** (pico B). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.1.]

Pela análise deste cromatograma, pode-se observar a presença de 3 picos com tempos de retenção de 6,4, 6,5 e 8,4 min. O pico em 8,4 min (pico C), refere-se a (4*R*)-carvona que não foi totalmente reduzida. Os picos em 6,4 min (pico A) e 6,5 min (pico B) com razão de 1:4,6, foram atribuídos às di-hidrocarvonas (1*S*,4*R*)-**9** e (1*R*,4*R*)-**9**, respectivamente. A identificação desses produtos foi comprovada com base nos dados obtidos por PORTO et al., (2010) na redução da (4*R*)-carvona com zinco metálico, onde as di-hidrocarvonas (1*S*,4*R*)-**9**:(1*R*,4*R*)-**9** foram obtidas com razão diastereoisomérica de 1:4,5.

Estes resultados também foram comprovados por análises de CG/EM, e o cromatograma de íons totais e os espectros de massas destes compostos estão apresentados na Figura 30.

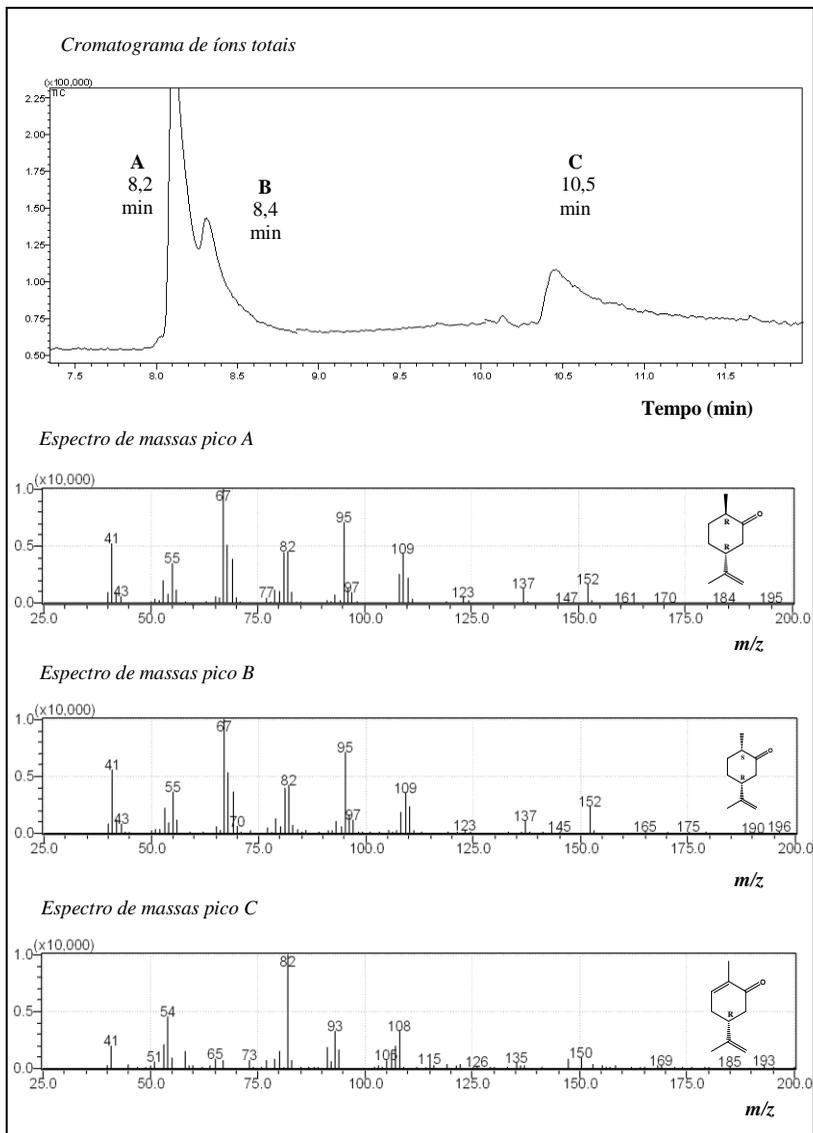


Figura 30. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação *via* química da (4*R*)-carvona com zinco metálico. Compostos: (1*R*,4*R*)-**9** (pico **A**), (1*S*,4*R*)-**9** (pico **B**) e **7** (pico **C**). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.1.]

Pelas análises de CG/EM, pode-se observar que o pico C refere-se a (4R)-carvona, sendo verificado a presença do íon molecular com razão massa/carga (m/z) de 150 (0,9%) e dos outros fragmentos 108 (34,2%), 93 (34,2%), 82 (100%) e 54 (50,3%) que são característicos deste composto. A similaridade dos espectros de massas dos picos A e B, onde observa-se o íon molecular com m/z de 152 (15,9) e de outros fragmentos com 109 (38,2%), 95 (65,4%), 67 (100%) e 41 (61,1%), são evidências de que os picos A e B correspondem aos produtos de redução da ligação dupla carbono-carbono endocíclica, a (1R,4R)- e (1S,4R)-di-hidrocarvona, respectivamente.

Na Figura 31, estão apresentadas as propostas para os principais fragmentos que correspondem aos sinais observados no espectro de massas para os picos A e B.

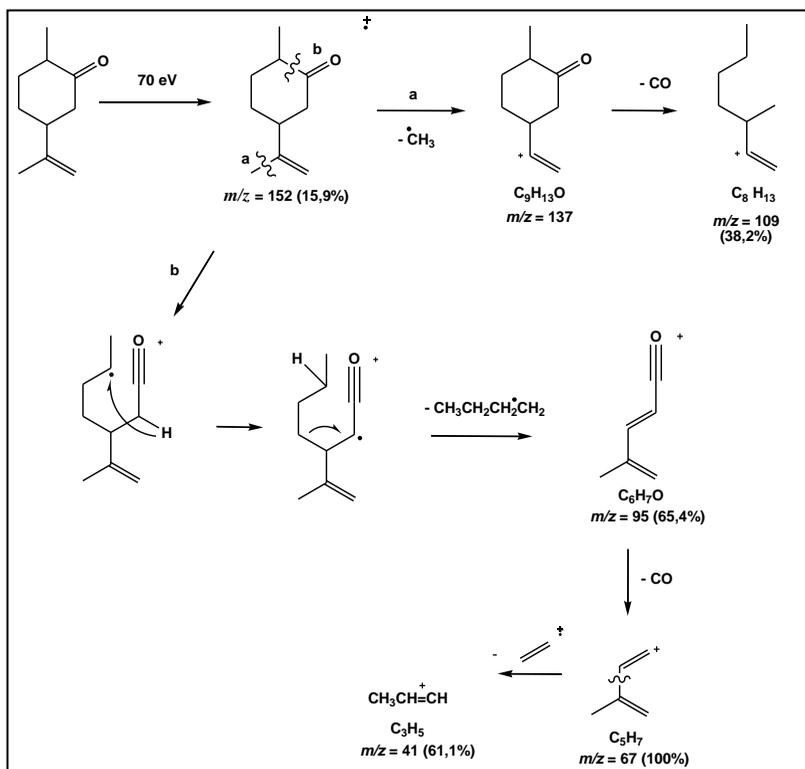


Figura 31. Propostas de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas das di-hidrocarvonas (picos A e B da Figura 30).

Além das análises de CG-quiral e CG/EM, as di-hidrocarvonas obtidas na redução de **7** com zinco metálico também foram caracterizadas por RMN de ^1H e o seu respectivo espectro está apresentado na Figura 32.

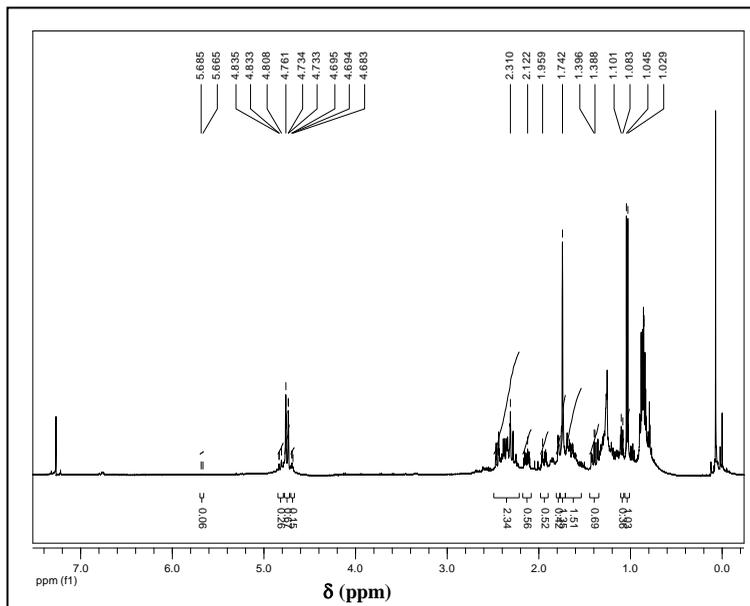


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na reação *via* química da (4*R*)-carvona com zinco metálico. [CDCl_3 , 400 MHz]

No espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na reação *via* química da (4*R*)-carvona com zinco metálico, observam-se os sinais característicos da formação da (1*S*,4*R*)-**9** (um duplete em 1,10 ppm referente ao hidrogênio H-10 e dois multipletes em 4,68 e 4,83 ppm referente aos hidrogênios H-9) e (1*R*,4*R*)-**9** (um duplete em 1,03 ppm referente ao hidrogênio H-10 e dois multipletos em 4,73 e 4,76 ppm referente aos hidrogênios H-9), além dos demais sinais na região de 0,9 – 2,4 ppm, que são referentes aos hidrogênios H-1, H-3, H-4, H-5, H-6 e H-8 (OHBA et al., 1997) (a numeração dos hidrogênios está representada nas estruturas das dihidrovarvonas apresentada na folha dos compostos utilizados).

4.1.2. Preparação dos álcoois com NaBH_4

A seguir, realizou-se a redução de **7** com boridreto de sódio, para a obtenção dos álcoois 2-metil-5-(1-metiletenil)-2-ciclo-hexen-1-ol **29** (carveóis) que foram utilizados como padrões nas análises de CG-quiral e de CG/EM. (Figura 33)

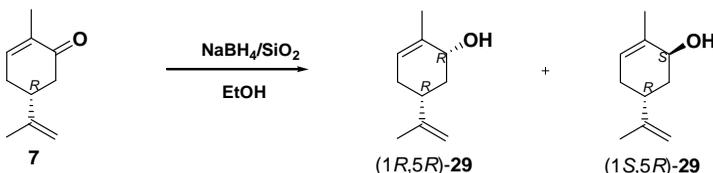


Figura 33. Redução *via* química da (4R)-carvona com NaBH₄ para obtenção dos carveóis (1R,5R)-**29** e (1S,5R)-**29**.

Para determinar quais foram os produtos formados na reação de redução de **7** com NaBH₄ foram realizadas análises de CG-quiral, CG/EM além das análises de RMN de ¹H e IV. Os cromatogramas de CG-quiral e CG/EM estão apresentados nas Figuras 34 e 35.

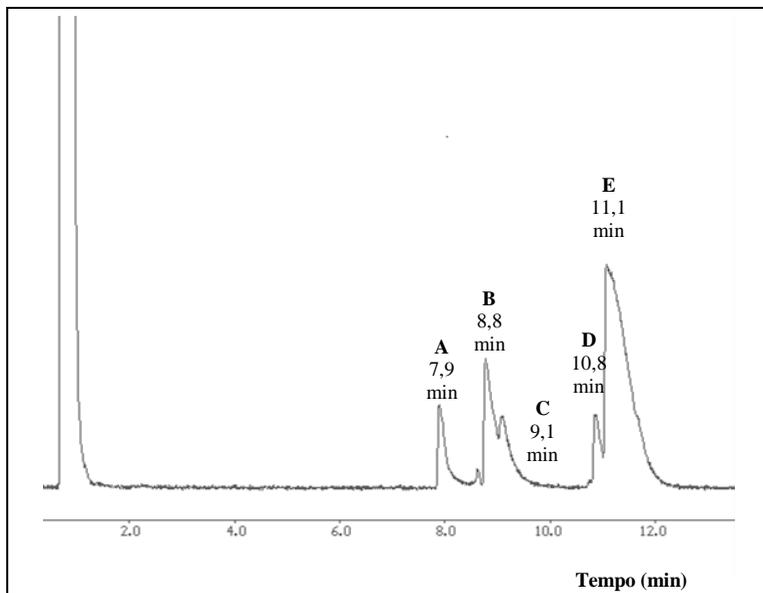


Figura 34. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na redução *via* química da (4R)-carvona com NaBH₄. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.1.]

Pela análise do cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **7** com NaBH_4 (Figura 34) observa-se a presença de 5 picos com tempos de retenção de 7,9 (pico A), 8,8 (pico B), 9,1 (pico C), 10,9 (pico D) e 11,1 min (pico E). Estes resultados evidenciam que além dos carveóis foram obtidos outros compostos.

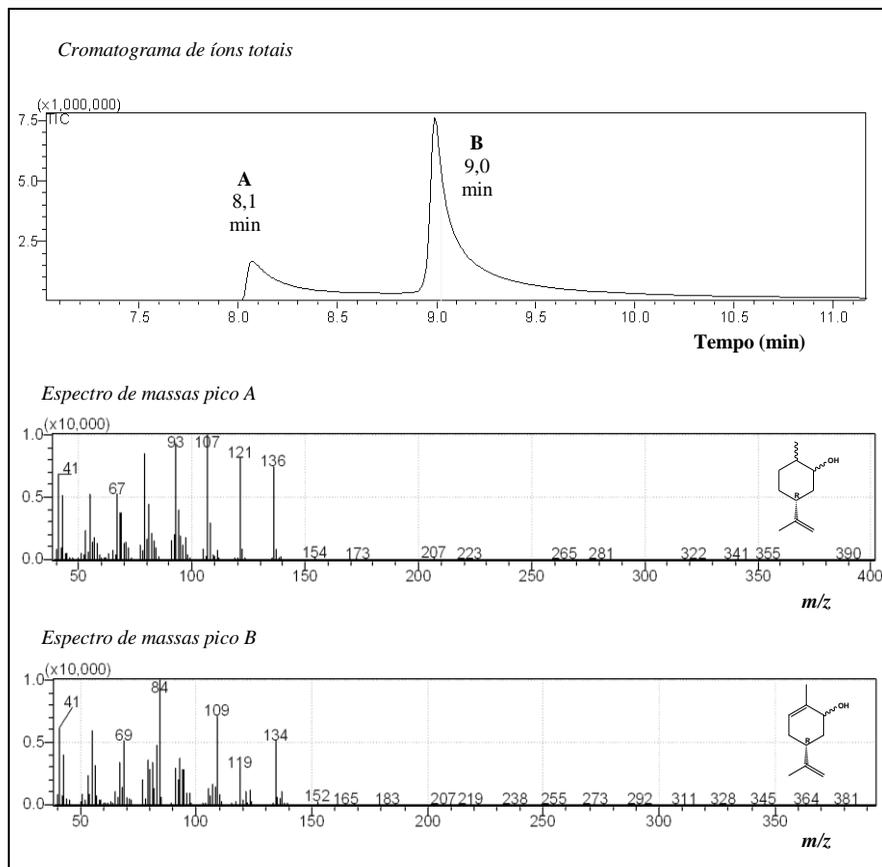


Figura 35. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação *via* química da (4*R*)-carvona com NaBH_4 . Compostos: di-hidrocarveóis (pico A) e carveóis (pico B). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.1.]

Pela análise do cromatograma de íons totais de CG/EM, dos produtos obtidos nesta reação (Figura 35), observa-se somente a presença de dois picos, sendo estes com tempo de retenção de 8,1 (pico A) e 9,0 min (pico B). A análise do espectro de massas do pico A mostra a presença do íon molecular com m/z de 154 (1,4%) e dos outros fragmentos com m/z 136 (73,9%), 121 (82,9%), 107 (97,8%), 93 (100%), 67 (59,5%) e 41(59,4%). A presença destes fragmentos evidenciam que ocorreu a redução tanto da carbonila quanto da ligação dupla carbono-carbono conjugada à carbonila, formando os di-hidrocarveóis **11** (Figura 36). A análise do espectro de massas do pico B mostra a presença do íon molecular com m/z de 152 (1,7%), e dos fragmentos com m/z 134 (52,3%), 109 (70,2%), 84 (100%) e 41 (59,4%), a presença destes fragmentos evidencia a formação dos carveóis **29**.

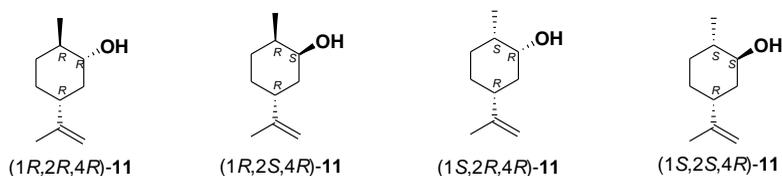


Figura 36. Produtos obtidos na redução *via* química de **7** com NaBH_4 .

A proposta de fragmentação para os principais picos observados nos espectros de massas A e B, está apresentadas na Figura 37.

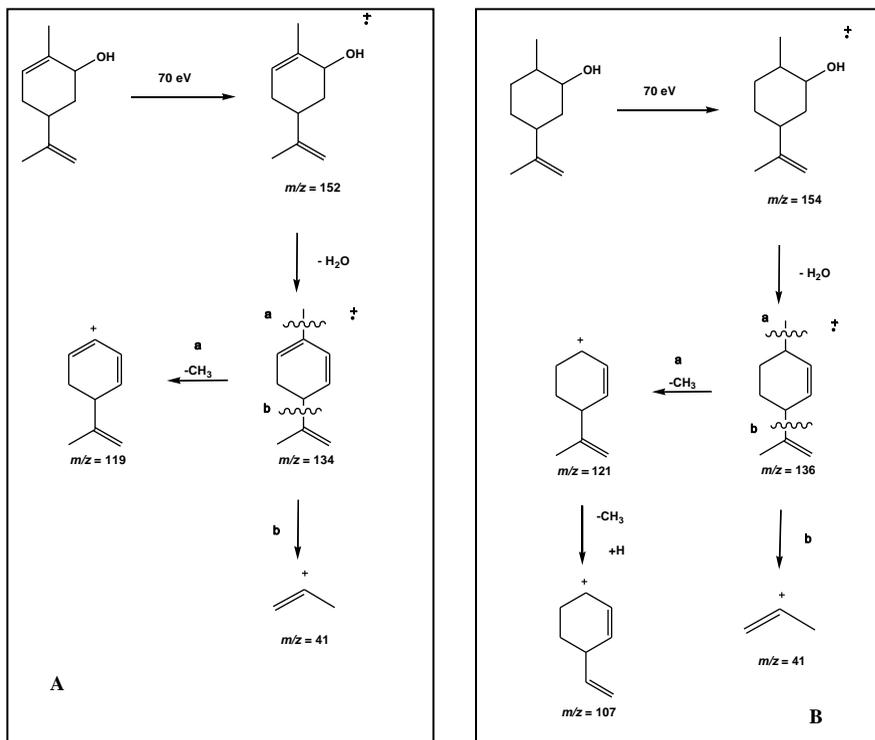


Figura 37. Propostas de fragmentação para os principais picos obtidos nos espectros de massas dos carveóis (A) e di-hidrocarveóis (B).

No espectro de IV dos produtos obtidos na redução de **7** com NaBH_4 foram observadas bandas em 3343 cm^{-1} referentes à deformação axial de O–H, em 3100 cm^{-1} à deformação axial de C=C, em $2856\text{ cm}^{-1} - 2967\text{ cm}^{-1}$ à deformação axial C–H, em 1645 e 1436 cm^{-1} da deformação axial C=C e em 1038 cm^{-1} devido à deformação axial C–O (Figura 38).

Estes dados também comprovam que a carbonila foi reduzida aos correspondentes álcoois **11** e **29**.

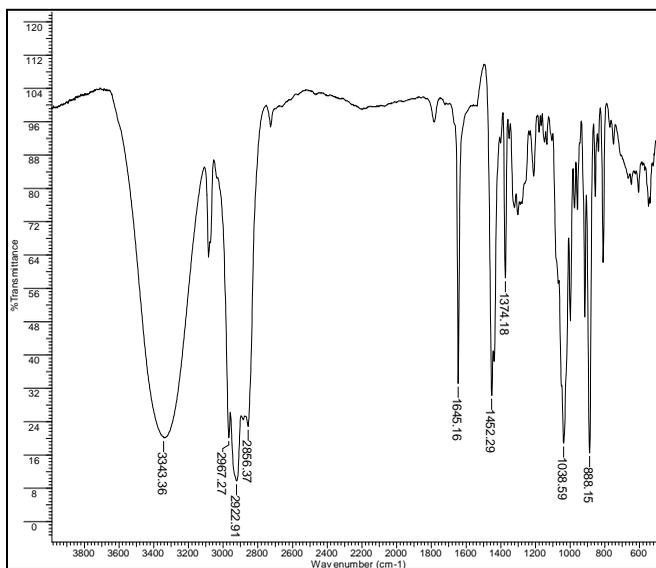


Figura 38. Espectro de IV dos produtos obtidos na redução *via* química de **7** com NaBH₄. [Filme]

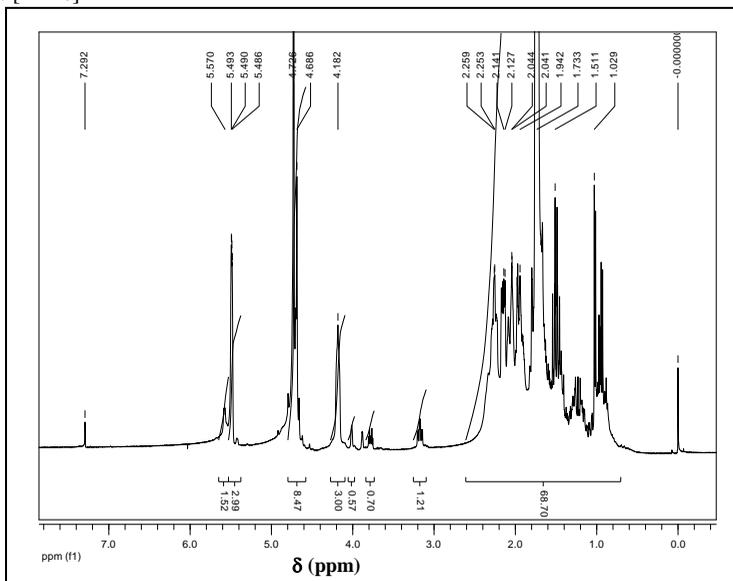


Figura 39. Espectro de RMN de ¹H dos produtos obtidos na redução *via* química de **7** com NaBH₄. [CDCl₃, 400 MHz]

Observa-se no espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na redução de **7** com NaBH_4 , os sinais característicos da formação dos carveóis, tais como um multiplete em 5,49 ppm referente ao hidrogênio H-6, um multiplete em 4,72 referente aos dois hidrogênios H-9, um multiplete em 4,18 referente ao hidrogênio H-2 (a numeração dos hidrogênios está representada na estrutura do carveol apresentada na folha dos compostos utilizados). Os sinais em menor proporção entre 3 e 4 ppm são característicos dos sinais dos hidrogênios dos di-hidrocarveóis (Figura 39).

A partir das análises realizadas para a caracterização e identificação dos produtos da redução de **7** com NaBH_4 , pode-se concluir que os produtos obtidos foram os carveóis **29** e os di-hidrocarveóis **11**.

4.1.3. Redução *via* enzimática da (4*R*)-carvona com leveduras *S. cerevisiae*

Na literatura está bem documentado que a biotransformação de compostos carbonílicos α,β -insaturados, tais como a (4*R*)-carvona, pode resultar na redução completa do sistema carbonílico α,β -insaturado com a formação dos álcoois saturados, di-hidrocarveóis (**11**), a redução exclusiva da carbonila levando aos álcoois alílicos, carveóis (**29**) ou a hidrogenação exclusiva da ligação dupla carbono-carbono endocíclica com formação das cetonas saturadas, di-hidrocarvonas (**9**) (SHIMODA; HIRATA; NOMA, 1998) (YADAV et al., 2007).

Na Figura 40, são apresentados os possíveis produtos obtidos na biotransformação da (4*R*)-carvona mediada por micro-organismos.

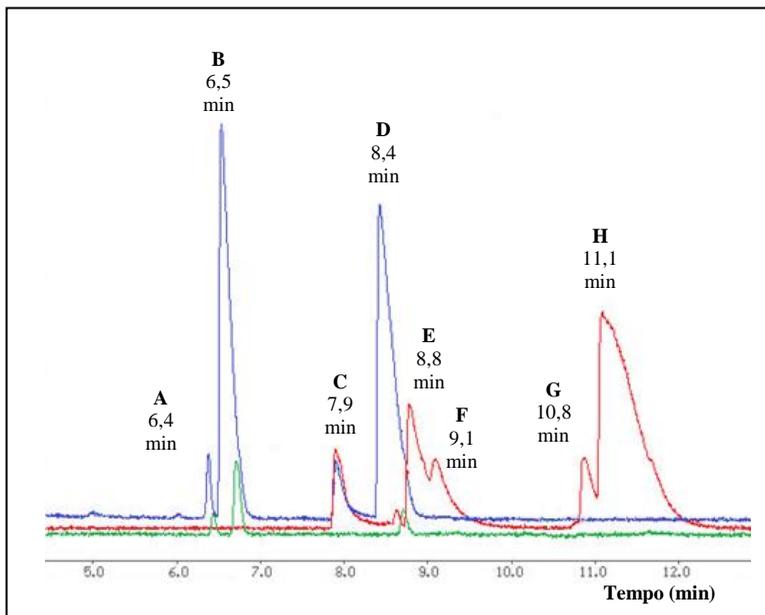


Figura 41. Sobreposição dos cromatogramas dos produtos obtidos na reação de redução *via* química de **7** com zinco metálico (verde), redução *via* química de **7** com NaBH_4 (vermelho) e na biotransformação de **7** mediada por FP (azul). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.1.]

Pela sobreposição dos cromatogramas, pode-se observar que na biotransformação da (4*R*)-carvona com Fp comercial ocorreu a formação das (1*S*,4*R*)- e (1*R*,4*R*)-di-hidrocarvonas (picos A e B), e a formação de outro produto que através das análises de CG/EM pode se afirmar que é um dos álcoois obtidos pela redução tanto da carbonila quando da ligação dupla carbono-carbono conjugada à carbonila, denominado de di-hidrocarveol (pico C) (Figura 41).

Pela sobreposição dos cromatogramas dos produtos formados na reação de redução de **7** com NaBH_4 e do padrão comercial (–)-di-hidrocarveol que é composto de uma mistura dos 4 diastereoisômeros com diferentes proporções (75% – (1*R*,2*R*,4*R*), 6% – (1*S*,2*S*,4*R*), 3% – (1*R*,2*S*,4*R*), 13% – (1*S*,2*R*,4*R*)), pode-se comprovar que o álcool formado na reação de redução da (4*R*)-carvona com FP foi o (1*R*,2*S*,4*R*)-di-hidrocarveol (Figura 42).

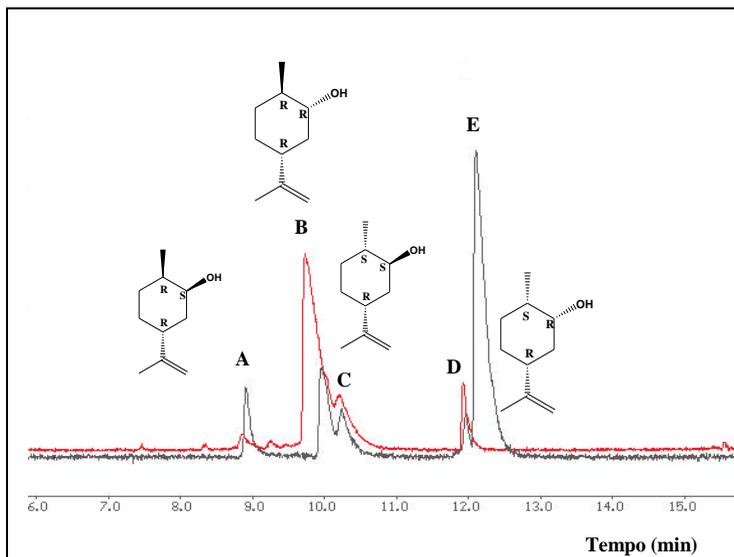


Figura 42. Sobreposição dos cromatogramas dos produtos obtidos na redução *via* química de **7** com NaBH_4 (preto) e do padrão (-)-di-hidrocarveol (vermelho). Compostos: (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** (pico A); (1*R*,2*R*,4*R*)-**11** (pico B); (1*S*,2*S*,4*R*)-**11** (pico C); (1*S*,2*R*,4*R*)-**11** (pico D) e **29** (pico E). [Condições de programação de CG-quiral: descritos no item 3.12.1.]

HIRATA et al., (2009) obtiveram resultados similares em relação aos produtos formados na redução da (4*R*)-carvona mediada por células de recombinante *Escherichia coli* expressa em *Nicotiana tabacum* e por *Nicotiana tabacum*, onde a (1*R*,4*R*)-di-hidrocarvona foi obtida majoritariamente com conversões de 86% e 11% seguida pela (1*S*,4*R*)-di-hidrocarvona (12 e 0,1%) e do (1*R*,2*S*,4*S*)-di-hidrocarveol (0 e 2,1%). A formação preferencial da (1*R*,4*R*)-di-hidrocarvona em relação a (1*S*,4*R*)-di-hidrocarvona mostra a seletividade das enzimas presente no FP e indica que o mecanismo de adição dos hidrogênios é o mesmo proposto por SHIMODA; HIRATA, (2000) que está apresentado na Figura 19.

Após a caracterização dos produtos obtidos na reação de redução da (4*R*)-carvona, serão apresentados e discutidos os resultados referentes à otimização das condições experimentais para a formação de **9**, tais como, meio reacional, concentração de levedura e substrato, temperatura, pH, adição de aditivos e porcentagem volumétrica do aditivo.

Nos estudos envolvendo a (4*R*)-carvona foi utilizada a LLE convencional para a extração dos reagentes e produtos do meio aquoso ou do sistema bifásico, para posterior análise em CG-quiral.

4.1.3.1. Efeito do meio reacional

A fim de verificar o efeito do meio reacional na biorredução da (4R)-carvona, as reações foram realizadas em sistema bifásico formado de *n*-hexano/tampão puro, ou em sistema bifásico com adição de sacarose (Sac), trealose (T) e cossolventes tais como glicerol (G), DMSO e DMF, em sistema monofásico aquoso contendo somente solução tampão, ou em sistema monofásico orgânico com *n*-hexano e adição de sacarose ou trealose. As conversões em produtos estão apresentadas na Tabela 4.

Pode-se observar que as conversões em di-hidrocarvonas foram dependentes do meio reacional utilizado e da levedura. Quando a reação foi realizada na ausência do biocatalisador não foi observada a formação do produto (Tabela 4, entrada 1).

As maiores conversões em **9** foram obtidas quando utilizou-se o FP como catalisador e somente com a solução tampão, tanto com a agitação magnética como com a orbital, sendo que as conversões foram de 46 e 53% e com excesso diastereoisomérico de 87 e 89%, respectivamente. Porém, ao usar este meio reacional, além das di-hidrocarvonas foi observada a formação do (1R,2S,4R)-di-hidrocarveol com conversões de 6 – 8% (Tabela 4, entradas 2 e 3). Foram obtidas baixas conversões em di-hidrocarvonas quando foram utilizadas as cepas CAT-1 e PE-2 tanto em sistema bifásico como em monofásico, sendo de 4 – 11% (Tabela 4, entradas 13,14, 15, e 16)

Quando foram utilizados os cossolventes, DMSO e glicerol e os agentes protetores sacarose e trealose no sistema bifásico, observou-se que as conversões em **9** foram similares ou menores (Tabela 4, entradas 6 - 9) quando comparadas com as realizadas somente em sistema bifásico (Tabela 4, entrada 4). Ao adicionar o DMF ao sistema bifásico, a conversão foi um pouco maior, sendo de 37% (Tabela 4, entrada 10). É importante salientar que o *e.d.* das reações realizadas nestes meios foram sempre > 99% e que não foi detectado a formação do (1R,2S,4R)-di-hidrocarveol, mostrando a boa seletividade da reação.

Observa-se também que quando diminuiu-se o volume da fase aquosa e da fase orgânica no sistema bifásico de 30 mL (Tabela 4, entrada 4) para 15 mL (Tabela 4, entrada 5), isto é, quando aumentou-se a concentração tanto da levedura quanto do substrato, ocorreu um acréscimo na conversão em **9**, sendo de 21%.

Foram obtidas baixas conversões em **9** quando utilizou-se o sistema monofásico orgânico com adição de sacarose e trealose, sendo de 5 e 6%, respectivamente (Tabela 4, entradas 11 e 12).

Tabela 4. Influência do meio reacional na biorredução da (4*R*)-carvona mediada por FP, CAT-1 e PE-2.^a

Entrada	Levedura	Sistema biocatalítico	conv. ^b	<i>e.d.</i> ^b	conv. ^b	<i>e.d.</i> ^b
			(%)	(%)	(%)	(%)
			9	(config.)	11	(config.)
1	Sem	Monofásico aq ^c	0	-	-	-
2	FP	Monofásico aq	46	87 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	6	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
3	FP	Monofásico aq ^d	53	89 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	8	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
4	FP	Bifásico	13	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
5	FP	Bifásico ^e	21	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
6	FP	Bifásico/G	13	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
7	FP	Bifásico/Sac	8	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
8	FP	Bifásico/T	13	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
9	FP	Bifásico/DMSO	12	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
10	FP	Bifásico/DMF	37	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
11	FP	Monofásico org/T	6	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
12	FP	Monofásico org/Sac	5	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
13	CAT-1	Monofásico aq ^d	10	91 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
14	CAT-1	Bifásico	4	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	<1	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
15	PE-2	Monofásico aq ^d	11	81 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
16	PE-2	Bifásico	5	>99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	<1	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)

^a *Condições reacionais*: FP Fleischmann ou CAT-1 ou PE-2 (3 g); **7** (0,5 mmol); Sistema monofásico aquoso: 30 mL de solução tampão citrato/fosfato (0,2 mol L⁻¹/0,1 mol L⁻¹ pH 5,5); Sistema bifásico: 30 mL solução tampão citrato/fosfato (0,2 mol L⁻¹/0,1 mol L⁻¹ pH 5,5) e 30 mL de *n*-hexano; Sistema monofásico orgânico: 30 mL de *n*-hexano; 3 mL de aditivos (10 % v/v); 35 °C; 24 h; agitação magnética (~800 rpm).

^b Conversão e *e.d.* determinados por CG-quiral.

^c 0 g de FP.

^d agitação orbital (100 rpm).

^e 15 mL solução tampão citrato/fosfato (0,2 mol L⁻¹/0,1 mol L⁻¹ pH 5,5) e 15 mL de *n*-hexano.

Estes resultados mostram que o meio reacional tem grande influência nas reações catalisadas por leveduras. O meio aquoso foi o mais eficiente para a biotransformação da (4*R*)-carvona, onde as condições reacionais mais adequadas para a sobrevivência dos micro-organismos foram mantidas e a (1*R*,4*R*)-di-hidrocarvona foi obtida com boas conversões e excesso diastereoisomérico. A partir destes resultados, o meio aquoso foi utilizado nos experimentos subsequentes.

4.1.3.2. Efeito da concentração de levedura

Outro estudo realizado foi a influência da concentração de FP na redução assimétrica da (4*R*)-carvona em meio aquoso a 25 °C, a fim de se obter a (1*R*,4*R*)-di-hidrocarvona com altas conversões e excessos diastereoisoméricos com uma quantidade mínima de levedura utilizada. As concentrações das leveduras utilizadas foram de 66,7 – 200,0 g L⁻¹. Os resultados obtidos em relação à conversão e *e.d.* dos produtos estão apresentados na Figura 43.

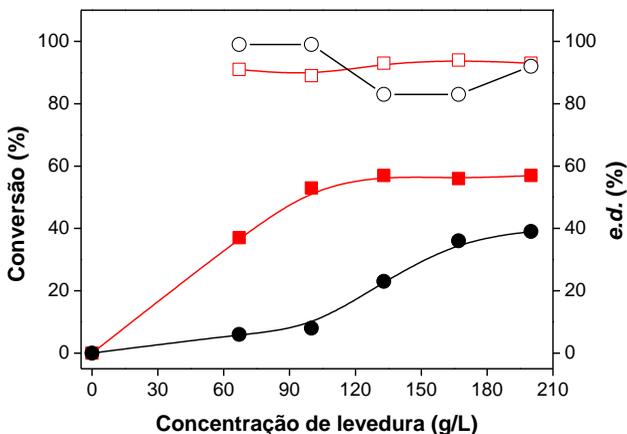


Figura 43. Valores de conversão em **9** (■) e **11** (●) e excesso diastereoisomérico de (1*R*,4*R*)-**9** (□) e (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** (○) em função da concentração de levedura. [Condições reacionais: FP Fleischmann (2 – 6 g); **7** (0,5 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato (0,2 mol L⁻¹ / 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5); 35 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm)]

Pode-se observar que não foi verificada a formação dos produtos na ausência do biocatalisador, e que com o aumento da concentração de levedura de 66,7 – 100,0 g L⁻¹ ocorreu um aumento das conversões em di-hidrocarvonas

de 37 – 53%. Após esta concentração ($> 100,0 \text{ g L}^{-1}$), as conversões em **9** mantiveram-se praticamente constantes (56 – 57%). O excesso diastereoisomérico de (1*R*,4*R*)-**9** manteve-se entre 89 – 94%. Neste estudo também foi observado que com o aumento da concentração de levedura de 66,7 – 200,0 g L^{-1} ocorreu uma maior formação dos di-hidrocarveóis (1*R*,2*R*,4*R*)-**11**, (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** e (1*S*,2*R*,4*R*)-**11**, e estes foram obtidos com conversões e *e.d.* de (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** que variaram de 6 – 39% e 80 – $>99\%$, respectivamente.

Considerado que a (1*R*,4*R*)-di-hidrocarvona foi obtida preferencialmente e com boas conversões e altos valores de *e.d.* quando utilizou-se a concentração de 100,0 g L^{-1} de FP, esta foi utilizada nos experimentos subsequentes.

4.1.3.3. Efeito da concentração de substrato

Está bem documentado na literatura que altas concentrações de substrato e/ou produtos podem levar a inibição das enzimas presentes nas células íntegras. Além disso, a estereosseletividade das reações biocatalisadas por células íntegras também pode ser afetada, devido ao fato de existirem vários tipos de oxidoredutases com diferentes estereosseletividades e afinidades pelo substrato (ZHANG et al., 2009) (HE et al., 2009) (HU; XU; NIE, 2010), e portanto, é de grande importância verificar este efeito.

Para avaliar o efeito da concentração do substrato na redução assimétrica da (4*R*)-carvona mediada por FP, foi realizada uma série de experimentos com diferentes concentrações do substrato, variando de 16,6 – 166,4 mmol L^{-1} em meio aquoso (pH 5,5) a 35 °C por 24 h. As conversões em produtos em função da concentração do substrato estão apresentadas na Figura 44.

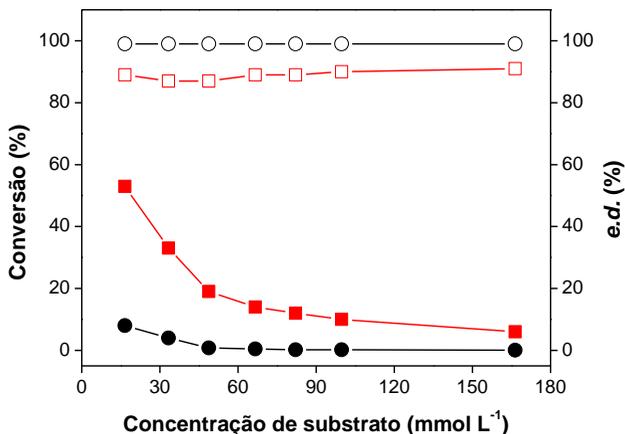


Figura 44. Valores de conversão em **9** (■) e **11** (●) e excesso diastereoisomérico de (1*R*,4*R*)-**9** (□) e (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** (○) em função da concentração de substrato. [Condições reacionais: FP Fleischmann (3 g); **7** (0,5 mmol – 5,0 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato (0,2 mol L⁻¹/0,1 mol L⁻¹, pH 5,5); 35 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm)]

Observa-se uma dependência nas conversões aos produtos com a variação da concentração de **7**. As conversões em di-hidrocarvonas e di-hidrocarveol diminuíram de 53 – 6% e 8 – 0%, respectivamente, com o aumento da concentração de substrato de 16,6 – 166,4 mmol L⁻¹. Este resultado indica uma inibição das enzimas presentes no FP pelo substrato. Os excessos diastereoisoméricos de (1*R*,4*R*)-**9** permaneceram praticamente constante (87 – 91%), enquanto que o e.d. do (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** manteve-se > 99% na faixa de concentração de substrato estudada.

ZHANG et al. (2009) descreveram um efeito similar da concentração de substrato na síntese biocatalítica do (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etila com a *Candida krusei* SW2026 em meio aquoso. Com o aumento da concentração de 2,5 – 20,0 g L⁻¹ os rendimentos e os valores de e.e. do produto diminuíram de 95,1 – 45,8% e 99,7 – 87,5%, respectivamente.

Considerando estes resultados, a concentração de 16,6 mmol L⁻¹ de substrato foi utilizada nos experimentos posteriores para avaliar a influência da temperatura, pH do meio, adição de aditivos e da porcentagem volumétrica dos aditivos.

4.1.3.4. Efeito da temperatura

Em geral, a temperatura da reação tem uma forte influência em reações catalisadas por enzimas e/ou células íntegras de micro-organismos, devido ao fato de que altas temperaturas aceleram a colisão entre enzima e o substrato. Porém, uma variação brusca da temperatura pode ocasionar a desnaturação da enzima e como consequência a diminuição e/ou perda da atividade catalítica (LEE; XIA; ZHANG, 2008). A temperatura pode afetar não apenas a atividade e estabilidade das enzimas microbianas, mas também a seletividade da reação (HU; XU; NIE, 2010) (ZHANG et al., 2009). A fim de verificar o efeito da temperatura na redução assimétrica da (4*R*)-carvona mediada por FP em meio aquoso (pH 5,5), variou-se a temperatura de 22 – 40 °C, e os resultados estão apresentados na Figura 45.

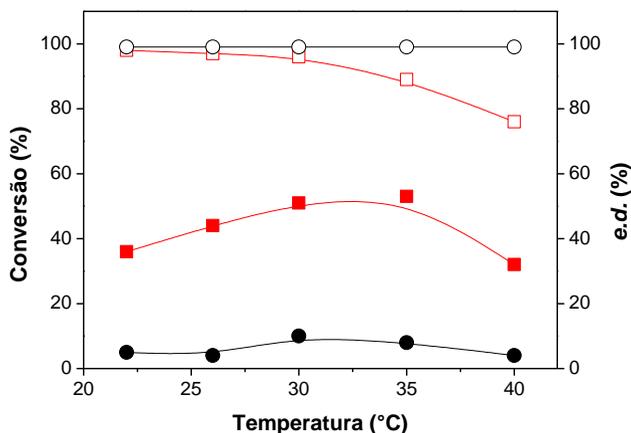


Figura 45. Valores de conversão em **9** (■) e **11** (●) e excesso diastereoisomérico de (1*R*,4*R*)-**9** (□) e (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** (○) em função da temperatura. [Condições reacionais: FP Fleischmann (3 g); **7** (0,5 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato (0,2 mol L⁻¹/0,1 mol L⁻¹, pH 5,5); 22 – 40 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm)]

Como pode ser observado as conversões em produtos foram dependentes da temperatura. Com o aumento da temperatura de 22 – 35 °C observou-se um pequeno aumento nas conversões em di-hidrocarvonas (36 – 53%) e uma diminuição no valor de e.d. de (1*R*,4*R*)-**9** (98 – 89%). Em temperaturas mais altas, as conversões em **9** e o e.d. de (1*R*,4*R*)-**9** diminuíram significativamente, sendo estes de 32 e 76%, respectivamente. Estes resultados indicam uma possível desnaturação das enzimas presentes no FP causada pelo aumento da

temperatura da reação. O (1*R*,2*S*,4*R*)-di-hidrocarveol foi obtido com baixas conversões, sendo de 4 – 10% e valores altos de *e.d.* >99%, na faixa de temperatura estudada.

Resultados similares em relação à temperatura foram obtidos por HU; XU; NIE (2010) na redução da 2-hidroxi-1-fenil-etanona usando *S. cerevisiae* JUC15 em meio aquoso e na presença de glicose como cossustrato. O maior rendimento em (*R*)-fenil-1,2-etanodiol (80,5%) foi obtido a 30 °C, e um aumento na temperatura para 40 °C levou a uma diminuição do rendimento em produto, sendo de 6,3%. O *e.e.* do produto permaneceu acima de 99,9% na faixa de temperatura estudada (20 – 40 °C).

Assim, a temperatura de 26 °C foi selecionada para verificar o efeito do pH e da adição de aditivos na redução de **7**.

4.1.3.5. Efeito do pH do meio

Outro parâmetro reacional importante que afeta as reações biocatalisadas por enzimas isoladas ou células íntegras de micro-organismos é o pH do meio, porque uma variação em seu valor pode alterar o estado iônico do substrato/produto e das enzimas envolvidas nesta reação (CHEN et al., 2006) (LOU et al., 2004). Assim o efeito do pH na redução assimétrica da (4*R*)-carvona mediada por FP foi investigado. Neste estudo 5 (cinco) diferentes tampões na concentração de 0,1 mol L⁻¹ com vários valores de pH foram utilizados: citrato (pH 3,5), acetato (pH 4,5 – 5,5), fosfato (pH 6,5 – 7,5), borato (pH 8,5) e carbonato (pH 9,5 – 10,5). Os resultados de valores de conversão e *e.d.* estão apresentados na Figura 46.

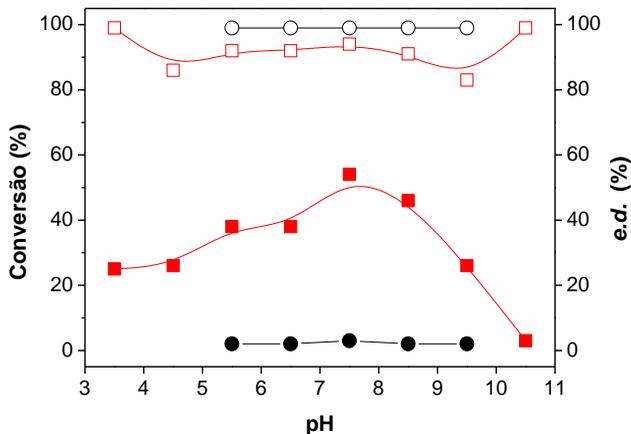


Figura 46. Valores de conversão em **9** (■) e **11** (●) e excesso diastereoisomérico de (1*R*,4*R*)-**9** (□) e (1*R*,2*S*,4*R*)-**11**(○) em função do pH do meio. [Condições reacionais: FP Fleischmann (3 g); 7 (0,5 mmol); 30 mL de tampão (0,1 mol L⁻¹ pH 3,5 – 10,5); 26 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm)]

Observa-se que quando o pH aumentou de 3,5 – 7,5 as conversões em di-hidrocarvonas aumentaram de 25 – 54%, e o *e.d.* de **9** variou de 86 – 99%. Um aumento no pH do meio de 7,5 – 10,5 levou a uma diminuição nas conversões em **9** de 54 – 3%, e o *e.d.* obtido foi de 83 – 99%. O di-hidrocarveol (1*R*,2*S*,4*R*)-**11** foi obtido com baixas conversões (2 – 3%), mas com altos valores de *e.d.* >99%. A partir destes resultados fica claro que o pH ótimo da redução da (4*R*)-carvona é de 7,5 para a formação das di-hidrocarvonas.

CHEN et al. (2006) estudaram a influência do pH na redução assimétrica do 4-cloro-3-oxobutirato de etila catalisada por FP em meio aquoso e observaram uma forte influência do pH na atividade das enzimas e foram obtidos altos valores de rendimentos quando a reação foi realizada com o pH de 7,5, sendo de 91,5%.

A partir destes resultados, o pH de 7,5 foi selecionado para verificar o efeito da adição de aditivos no meio aquoso.

4.1.3.6. Efeito da adição de aditivos

Está bem documentado na literatura que diferentes aditivos ou cossolventes podem influenciar significativamente a conversão e seletividade dos produtos obtidos nas reações mediadas por FP (BENCZE et al., 2010). Portanto, após a otimização dos parâmetros experimentais discutidos

anteriormente da redução assimétrica da (4*R*)-carvona catalisada por FP em meio aquoso, uma série de aditivos foram utilizados, incluindo solventes polares e apolares, líquidos iônicos, e solução de açúcares (10% v/v) tais como sacarose e trealose. Os resultados obtidos de conversão e *e.d.* para os produtos estão apresentados na Tabela 5.

Table 5. Influência da adição de aditivos na biorredução da (4*R*)-carvona mediada por FP em meio aquoso.^a

Entrada	Aditivos	conv. ^b	<i>e.d.</i> ^b	conv. ^b	<i>e.d.</i> ^b
		(%)	(%)	(%)	(%)
		9	(config.)	11	(config.)
1	Sem	54	94 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	3	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
2	CH ₂ Cl ₂	1	99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	<1	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
3	DMF	2	99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
4	THF	4	67 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
5	Acetonitrila	23	81 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
6	<i>t</i> -Butanol	25	75 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	<1	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
7	<i>n</i> -Hexano	39	99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
8	Glicerol	53	97 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	8	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
9	Etanol	57	91 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	2	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
10	DMSO	70	97 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	6	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
11	L-Cisteína	64	99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
12	[BMPy][BF ₄]	22	83 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
13	[BMIm][BF ₄]	36	86 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
14	[BMIm][PF ₆]	56	99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	-	-
15	Sacarose	71	92 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	7	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
16	Trealose	74	99 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	8	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)

^a Condições reacionais: FP Fleischmann (3 g); **7** (0,5 mmol); 27 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹ pH 7,5); 3 mL aditivo; 26 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm);

^b Conversão e *e.d.* determinados por CG-quiral.

Como pode ser observado, as conversões em produtos foram fortemente influenciadas pela adição de aditivos. Quando os solventes polares e apolares foram utilizados como aditivos, tais como CH₂Cl₂, DMF, THF, acetonitrila, *t*-butanol, e *n*-hexano (Tabela 5, entradas 2 – 7) não foi observado um aumento nas conversões em produto (1 – 39% com *e.d.* de 67 – 99%), quando comparado com a reação realizada sem aditivo (54% com *e.d.* de 94%; Tabela 5, entrada 1). Entretanto quando o glicerol, etanol, DMSO, L-cisteína, sacarose e trealose foram utilizados como aditivos, foram obtidas boas conversões em

di-hidrocarvonas, sendo de 53, 57, 70, 63, 71 e 74%, respectivamente (Tabela 5, entradas 8 – 11, 15 e 16). É importante salientar que quando a L-cisteína e o *n*-hexano foram utilizados como aditivos a seletividade da reação foi muito melhor, e apenas a di-hidrocarvona (1*R*,4*R*)-**9** foi obtida. Estes resultados estão de acordo com os citados na literatura, onde estes compostos apresentam a capacidade de estabilizar a membrana plasmática das células íntegras dos micro-organismos, protegendo assim as enzimas do meio reacional, ou atuam como fonte de hidreto para a regeneração da coenzima (ZHANG et al., 2009) (ALBUQUERQUE et al., 2007) (ANDRADE; PIOVAN; PASQUINI, 2009) (HAYAKAWA et al., 1998).

Quando os líquidos iônicos [BMIm][BF₄] e [BMPy][BF₄] foram utilizados como aditivos, ambas as conversões em di-hidrocarvonas (22 – 36%) e *e.d.* de (1*R*,4*R*)-**9** (83 – 86%) (Tabela 5, entradas 12 e 13) foram menores quando comparadas com os dados obtidos sem adição de aditivo (Tabela 5, entrada 1). Entretanto, quando o [BMIm][PF₆] foi usado, a di-hidrocarvona (1*R*,4*R*)-**9** foi obtida como produto único com conversão de 56% (Tabela 5, entrada 14). Estes resultados indicam uma influência positiva do [BMIm][PF₆] na redução assimétrica de **7** catalisada por FP.

HE et al. (2009) verificaram a influência da adição de líquidos iônicos na biorredução assimétrica do acetoacetato de etila catalisada por células íntegras de *Pichia membranaefaciens* Hansen ZJPH07 em meio aquoso. Os autores observaram que as maiores conversões e *e.e.* em (*R*)-3-hidroxitirato de etila foram obtidos quando o LI [BMIM][BF₄] foi adicionado ao meio aquoso, sendo de 77,8 e 73,0 % respectivamente. Quando a reação foi realizada somente em meio aquoso, a conversão e o *e.e.* foram de 68,5 e 65,1%, respectivamente. Estes resultados demonstraram que a adição do LI diminuiu a inibição do substrato e aumentou a enantiosseletividade quando comparada com a reação realizada em meio aquoso.

A partir destes resultados, o DMSO foi escolhido como um dos melhores aditivos para a redução da (4*R*)-carvona mediada por FP, e este foi utilizado para verificar a influência da porcentagem volumétrica no meio aquoso.

4.1.3.7. Efeito da porcentagem volumétrica de aditivos

Neste estudo, avaliou-se a porcentagem volumétrica do DMSO na redução assimétrica da (4*R*)-carvona em meio aquoso, uma vez que está bem documentado que altas concentrações deste aditivo podem influenciar as reações mediadas por células íntegras devido ao fato de interagirem com o metabolismo e membranas das células, resultando em diversos danos celulares

(VIOLANTE et al., 2002). Além disso, altas concentrações de cossolvente podem desnaturar a enzima, devido à remoção da água essencial ligada à superfície da enzima (YEATES; KRIEG; BREYTENBACH, 2007). Os valores de conversão em **9** e **11** em função da porcentagem de DMSO estão apresentados na Tabela 6.

Table 6. Influência da porcentagem de DMSO na biorredução da (4R)-carvona mediada por FP em meio aquoso.^a

Entrada	% DMSO	conv. ^b	<i>e.d.</i> ^b	conv. ^b	<i>e.d.</i> ^b
		(%)	(%)	(%)	(%)
		9	(config.)	11	(config.)
1	1	73	95 (1R,4R)	6	>99 (1R,2S,4R)
2	5	73	97 (1R,4R)	6	>99 (1R,2S,4R)
3	10	70	97 (1R,4R)	6	>99 (1R,2S,4R)
4	15	68	96 (1R,4R)	7	>99 (1R,2S,4R)
5	30	89	86 (1R,4R)	0	-
6	50	0	-	0	-

^a Condições reacionais: FP Fleischmann (3 g); **7** (0,5 mmol); 15 – 29,7 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹ pH 7,5); 0,3 – 15 mL DMSO; 26 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm);

^b Conversão e *e.d.* determinados por CG-quiral.

Observa-se que o aumento da porcentagem de DMSO de 1 – 30% ocasionou um aumento nas conversões em di-hidrocarvonas de 73 – 89%, entretanto o *e.d.* de (1R,4R)-**9** diminuiu de 95 – 86% nesta faixa de porcentagem de aditivo. Quando utilizou-se 50% de DMSO no meio reacional, não foi observada a formação dos produtos, e isso pode ter sido ocasionado devido ao aumento da viscosidade e polaridade do meio, uma vez que esta bem relatado que solventes polares tendem a desnaturar as enzimas (CUI et al., 1998) (LAANE et al., 1987).

Como as conversões e os valores de *e.d.* não alteraram muito quando variou-se a porcentagem de DMSO de 1 a 15%, a porcentagem de 10% continuou sendo utilizada nos estudos subsequentes, com outras olefinas ativadas.

4.2. REDUÇÃO VIA ENZIMÁTICA DE VÁRIAS OLEFINAS ATIVADAS COM LEVEDURAS DE *S. CEREVISIAE*

Após a otimização das condições experimentais para a reação de redução da (4R)-carvona mediada por FP, esta metodologia foi aplicada para

outros compostos carbonílicos α,β -insaturados, tais como (4*S*)-carvona (**8**), (6*E*)-2-metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona (**22**), (3*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona (**23**), (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (**24**) e 3-metil-ciclo-hexen-2-ona (**25**). As melhores condições reacionais foram, meio aquoso contendo tampão fosfato pH 7,5 com 10% de DMSO (v/v), 26 °C e concentração de FP e substrato de 100,0 g L⁻¹ e 16,6 m mol L⁻¹, respectivamente.

A identificação dos produtos obtidos neste estudo foi realizada por RMN de ¹H, CG-quiral, CG/EM e polarimetria, para o substrato **23**. Entretanto para estes compostos não foi realizada uma análise mais detalhada dos espectros e cromatogramas como foi feito para a (4*R*)-carvona. É importante salientar que utilizaram-se as mesmas metodologias para obtenção dos padrões, e por comparação foi então possível identificar os produtos obtidos na redução com as leveduras. Os espectros de IV e RMN de ¹H, bem como os cromatogramas de CG-quiral e CG/EM, estão apresentados no Apêndice A.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores de conversão e *e.d.* ou *e.e.* obtidos da redução das várias olefinas ativadas mediada por FP em meio aquoso com adição de DMSO (10% v/v).

Table 7. Biorredução de olefinas ativadas mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO.^a

Entrada	Substrato	Produto	conv. ^b (%)	<i>e.d.</i> ^b ou <i>e.e.</i> ^b (%) (config.)
1	7	9	70	97 (1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)
		11	6	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)
2	8	10	3	25 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)
		12	4	> 99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
3	22	33	59	38
		32	2	-
4	23	34	33	64 (3 <i>S</i>)
5	24	35	>99	-
6	25	36	4	56

^a Condições reacionais: FP Fleischmann (3 g); substratos (0,5 mmol); 27 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 3 mL DMSO (10% v/v); 26 °C; 24 h; ag. orbital (100 rpm).

^b Conversão e *e.e.* ou *e.d.* determinados por CG-quiral.

A redução da (4*S*)-carvona mediada por FP (Figura 47) resultou na formação da (2*R*,4*S*)- e (2*S*,4*S*)-di-hidrocarvona pela redução da ligação dupla C=C, e na formação do (1*R*,2*R*,4*S*)-di-hidrocarveol devido a redução das ligações duplas C=C e C=O. Estes compostos foram obtidos com conversões baixas de 3 e 4 % com *e.d.* de (1*R*,2*S*)-**10** e de (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** de 25 e >99%, respectivamente (Tabela 6, entrada 2). Diferentemente da redução da (4*R*)-carvona, onde o produto majoritário nessas condições reacionais foi a (1*R*,4*R*)-di-hidrocarvona (69% com *e.d.* de 97%), o produto majoritário obtido na redução da (4*S*)-carvona foi o (1*R*,2*R*,4*S*)-di-hidrocarveol, porém com baixa conversão (Tabela 7, entrada 1). As estruturas dos compostos obtidos *via* reação enzimática foram elucidadas pela comparação dos cromatogramas e espectros dos padrões preparados *via* reações químicas e pelo padrão (+)-di-hidrocarveol (Apêndice A, Figuras 71-73, 80-84 e 96-98).

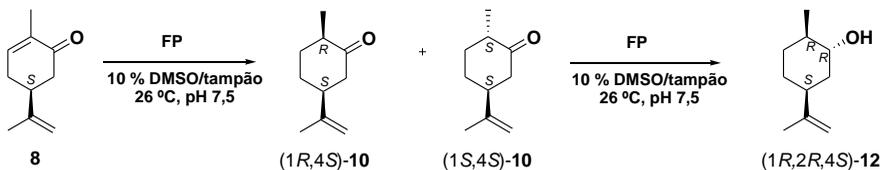


Figura 47. Produtos obtidos na biotransformação da (4S)-carvona mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO (10% v/v).

Em relação ao produto majoritário obtido na redução de **8**, estes resultados diferem dos obtidos por GORETTI et al. (2009), HIRATA et al. (2009) e KIM et al. (2002). Por exemplo GORETTI et al. (2009) realizaram a redução assimétrica da (4S)-carvona catalisada por 16 cepas de leveduras, sendo de 14 espécies e 6 gêneros (por exemplo e.g. *Candida maltosa*, *Cryptococcus terreus*, *Pichia amylophila* e *Saccharomyces spencerorum*) em diferentes estados fisiológicos (células em crescimento, em repouso, liofilizada e liofilizada com glicose). Eles observaram que, em geral, e independentemente do estado fisiológico utilizado das leveduras, o produto majoritário obtido foi a (1S,4S)-di-hidrocarvona, seguido da (1R,4S)-di-hidrocarvona e dos álcoois (1R,2S,4S)-, (1S,2S,4S)- e (1S,2R,4S)-dihydrocarveol, e formou apenas traços do (1R,2R,4S)-di-hidrocarveol. A partir destes resultados pode-se concluir que a redução de **8** mediada por FP é uma alternativa viável para a obtenção do (1R,2R,4S)-di-hidrocarveol **12** com excelente seletividade, apesar da conversão ter sido baixa (4%).

Na biotransformação da olefina **22** mediada por FP em meio aquoso contendo 10 % de DMSO como aditivo (Figura 48) os produtos obtidos foram os isômeros derivados da 2-metil-6-(4-nitrofenilmetil)-ciclo-hexanona (**33**) obtidos a partir da redução da ligação dupla C=C e o isômero (6Z)-2-metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona (**32**) com conversões de 59 e 2%, respectivamente (Tabela 7, entrada 3). A formação destes produtos foram comprovadas pelas análises de CG-quiral (3 picos com tempo de retenção de 20,5, 20,6 e 20,9 min), CG/EM (2 picos com tempo de retenção de 21,0 e 21,3 min e espectros de massas com íons moleculares de $m/z = 247$ e 245) e RMN de ^1H (8,21 – 8,24 ppm (m, 2H), 8,11 – 8,13 ppm (m, 2H), 7,47 – 7,49 ppm (m, 1H), 7,31 – 7,36 ppm (m, 2H) além dos demais picos característicos) (Apêndice A, Figura 99). É importante salientar que a partir dessas análises, não foi possível determinar a configuração absoluta do isômero obtido majoritariamente e nem por polarimetria uma vez que o *e.e.* ou *e.d.* foi muito baixo.

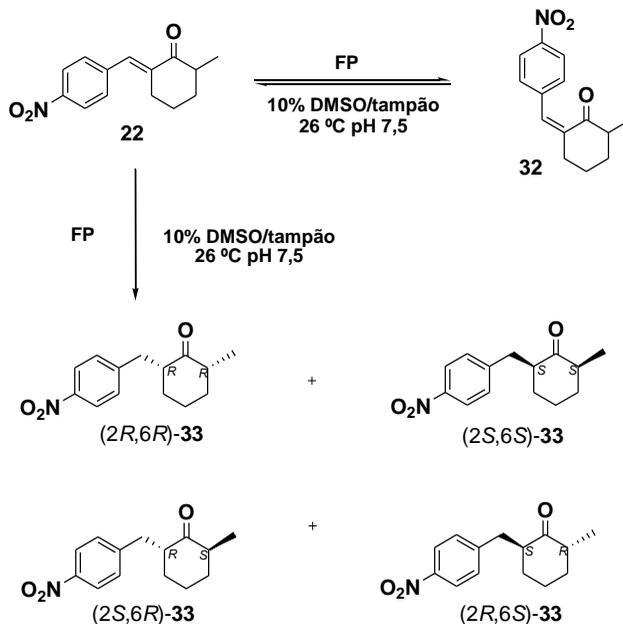


Figura 48. Produtos obtidos na biotransformação da (6*E*)-2-metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO (10% v/v).

Na redução assimétrica da (3*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona (**23**) mediada por FP (Figura 49) os produtos obtidos foram as (3*R*)- e (3*S*)-3-metil-4-fenil-2-butanona (**34**), com conversão de 33% e *e.e.* de (3*S*)-**34** de 64%, resultantes da redução da ligação dupla C=C (Tabela 7, entrada 4). No espectro de RMN de ^1H são observados os sinais em 7,28-7,16 (m, 5H, H-2', H-3', H4', H-5', H-6'), 3,00 (dd, $J = 6,8$ e 13,6 Hz, 1H, H-4), 2,84-2,82 (m, 1H, H-3), 2,57 (dd, $J = 7,6$ e 13,6 Hz, 1H, H-4), 2,09 (s, 3H, H-1) e 1,09 (d, $J = 7,2$ Hz, H-5) ppm, que são característicos destes produtos (LI et al., 2010) (Apêndice A, Figura 102). A configuração absoluta do enantiômero obtido majoritariamente foi determinada a partir da comparação da rotação óptica ($[\alpha]^{23}_{\text{D}}$) de uma mistura contendo 81% deste enantiômero, com o dados da literatura $\{[\alpha]^{23}_{\text{D}}$ (*R*)-(-) = -29,9 (c 1,05, CHCl_3); $[\alpha]^{23}_{\text{D}}$ (*S*)-(+) = +31,8 (c 1,0, CHCl_3)\} (ABATE et al., 2005). Como o valor de $[\alpha]^{23}_{\text{D}}$ (c 1,9, CHCl_3) da mistura foi de +25,6 pode-se afirmar que o enantiômero formado preferencialmente foi o (3*S*)-**34**.

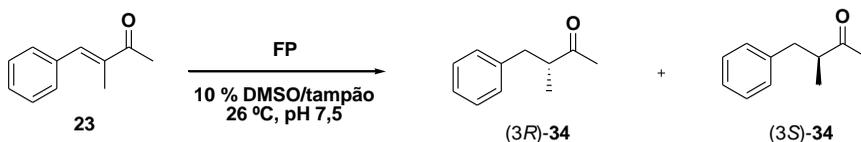


Figura 49. Produtos obtidos na biotransformação da (3*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO (10% v/v).

ZAGOZDA; PLENKIEWICZ (2006) investigaram a redução enantiosseletiva desta enona mediada por leveduras *Geotrichum candidum*, *Mortierella isabellina* e *Rhodotorula rubra* em meio aquoso com glicose. Eles observaram que o produto majoritário formado na biotransformação de **23** com a *R. rubra* foi a cetona saturada (3*S*)-**34** com 44% de rendimento e 46% de *e.e.*. Em menor quantidade foi observada a formação do álcool insaturado 3-metil-4-fenil-3-buten-2-ol e do álcool saturado 3-metil-4-fenil-2-butanol. Entretanto, quando as células íntegras de *G. candidum* e *M. isabellina* foram utilizadas como biocatalisador na redução de **23**, o produto majoritário obtido foi o (2*S*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ol com rendimentos de 24% (*e.e.* 98%) e 65% (*e.e.* 97%), respectivamente.

A redução da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona (**24**) mediada por FP (Figura 50) foi quimiosseletiva, formando apenas a cetona saturada 1,3-difenil-1-propanona (**35**) resultante da redução da ligação dupla C=C, com conversão >99% (Tabela 7, entrada 5). É importante salientar que em sistema bifásico contendo *n*-hexano/tampão e em apenas 3 h de reação este produto foi obtido com conversões >99%. (SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2010). Estes resultados mostram que para esse substrato o sistema bifásico foi mais eficiente.

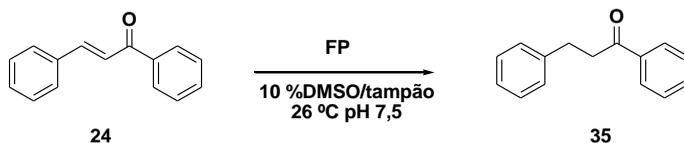


Figura 50. Produtos obtidos na biotransformação da (2*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO (10% v/v).

A biotransformação da 3-metil-ciclo-hexen-2-ona **25** com FP (Figura 51) levou à formação das cetonas saturadas 3-metil-ciclo-hexanona **36** pela

redução da ligação dupla C–C. Este produto foi obtido com baixa conversão (4%) e moderado *e.e.* (56%) (Tabela 7 entrada 6). A identificação deste produto foi realizada através da comparação dos cromatogramas e espectros obtidos da reação de **25** com FP com os padrões obtidos *via* reação química com H₂, Pd/C (preparação de **36**) e com NaBH₄ (preparação do **31**) (Apêndice A, Figuras 109 e 110).

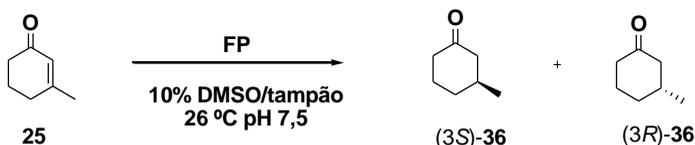


Figura 51. Produtos obtidos na biotransformação da 3-metil-ciclo-hexen-2-ona mediada por FP em meio aquoso contendo DMSO (10% v/v).

SWIDERSKA; STEWART (2006) realizaram a redução da olefina ativada **25** mediada por *Saccharomyces carlsbergensis* em meio aquoso com adição de β -ciclo-dextrina (para promover a solubilização do substrato no meio aquoso) em 24 h de reação. O produto da biorredução obtido foi a cetona saturada (3S)-**36** proveniente da redução da ligação dupla C–C, com conversão de 100% e *e.e.* de 94%.

A partir destes resultados pode-se observar a tendência das enzimas presentes no FP (enoato redutases) de reduzirem preferencialmente a ligação dupla C–C conjugada à carbonila dos compostos **7**, **22–25** (Tabela 7 entradas 3–6), formando as cetonas saturadas **9**, **33–36**. Porém, na redução de **8**, foram observadas tanto a redução da ligação dupla C–C quanto da ligação dupla C–O (Tabela 7, entrada 2), formando as cetonas saturadas (**10**) e os álcoois saturados (**12**).

A próxima etapa deste trabalho foi verificar se a técnica de microextração com membrana oca de polipropileno é eficiente para extrair os reagentes e produtos do meio reacional e realizar a otimização das condições experimentais da redução da (4S)-carvona mediada por FP.

4.3. TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO

Para verificar a precisão do método de extração proposto, foi inicialmente construída uma curva de calibração com uma solução contendo FP e diferentes porções da (4S)-carvona **8**, das di-hidrocarvonas **10** e dos di-

hidrocarveóis **12**, a fim de verificar se as proporções de reagentes e produtos adicionados seriam iguais às proporções destes recuperados após a microextração (Figura 52). O tolueno foi selecionado como solvente extrator porque está bem documentado na literatura que a escolha do solvente é de fundamental importância, uma vez que este não pode ser solúvel em água (KOKOSA; PRZYJAZNY; JEANNOT, 2009). Solventes tais como o diclorometano e clorofórmio não são bons solventes extratores devido à maior solubilidade destes em água. Outro solvente que tem mostrado excelentes propriedades tais como baixa solubilidade, baixa pressão de vapor e alta extração é o 1-octanol, entretanto, não foi possível utilizá-lo devido ao tempo de retenção ser muito próximo a dos reagentes e produtos nas análises de CG.

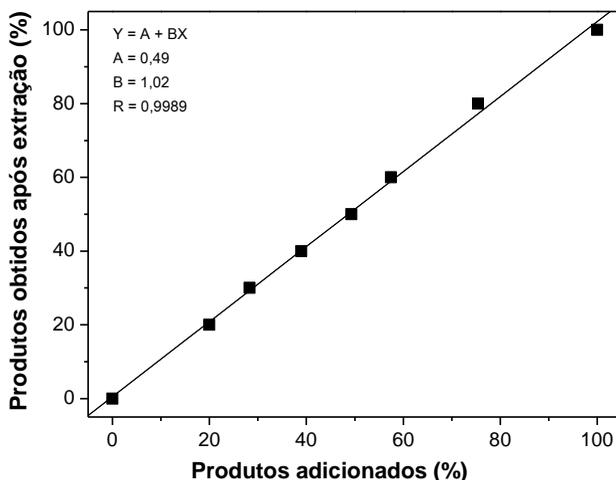


Figura 52. Curva de calibração de uma solução de FP com diferentes proporções da (4S)-carvona **8**, das di-hidrocarvonas **10** e dos di-hidrocarveóis **12**, para verificar a eficiência da HF-LLLME com membrana porosa de polipropileno.

A partir dos resultados obtidos verificou-se que as proporções dos reagentes e produtos recuperados após a HF-LLLME foram equivalentes às proporções adicionadas.

O tempo de extração (5 – 20 min) e a adição de NaCl (0 – 0,6 g) foram otimizados, a fim de verificar a influência destes parâmetros na microextração em relação à quantidade de analito extraída (área do sinal cromatográfico) (Figura 53).

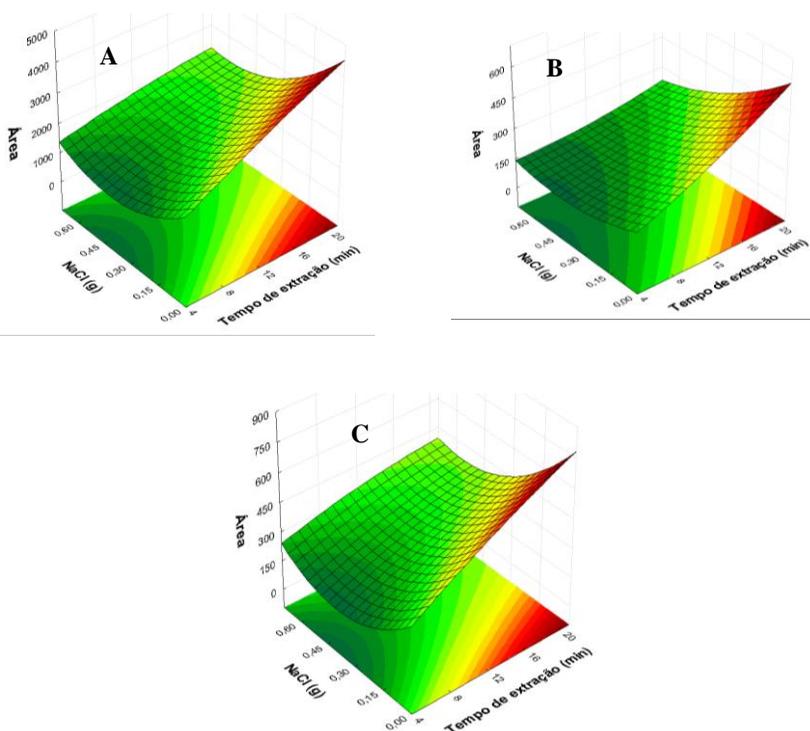


Figura 53. Influência da adição de NaCl e do tempo na microextração de uma mistura reacional contendo a (4*S*)-carvona (A), as (1*R*,4*S*)- e (1*S*,4*S*)-di-hidrocarvonas (B) e a mistura de di-hidrocarveol (C).

Observa-se nas Figuras 53A–C que não houve uma variação significativa da quantidade dos analitos extraídos com a adição de NaCl, entretanto observa-se uma variação com o aumento do tempo de extração. Sendo assim nos estudos subsequentes todas as microextrações foram realizadas sem a adição de sal e em 15 min.

É importante salientar também que foi realizada a extração convencional líquido-líquido e a microextração das reações biocatalisadas em sistema bifásico e monofásico para verificar se as duas técnicas utilizadas iriam extrair igualmente os reagentes e produtos da reação. Quando ambas as extrações foram utilizadas, a porcentagem da (4*S*)-carvona e das di-hidrocarvonas e do di-hidrocarveol recuperados foi semelhante. Estes resultados mostram

novamente que a microextração pode ser utilizada para extrair os reagentes e produtos do meio aquoso e assim monitorar as conversões das reações mediadas por células íntegras de micro-organismos por CG-quiral.

Após verificar a eficiência do método de microextração proposto, realizou-se a otimização das condições experimentais da reação de redução de **8** e **23** com FP, com o intuito de obter os produtos em maiores conversões e *e.d.* ou *e.e.*. É importante salientar que também tentou-se otimizar as condições reacionais de **25** a fim de se obter os produtos em maiores conversões, entretanto, em todas as tentativas o produto foi obtido com conversão máxima de 10% com *e.e.* >99% nas seguintes condições reacionais, tempo reacional de 72 h, temperatura 26 °C, 3 g de FP, 0,5 mmol de substrato, 30 mL de tampão (pH 7,5), 27 mL de *n*-hexano, 3 mL de DMSO e agitação magnética.

4.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS NA REDUÇÃO VIA ENZIMÁTICA DA (4*S*)-CARVONA COM LEVEDURAS *S. CEREVISIAE*

Como a redução da (4*S*)-carvona mediada por FP em meio aquoso com adição de DMSO forneceu baixas conversões em produto, optou-se em otimizar as condições reacionais tais como, temperatura, pH, tempo reacional, razão substrato/levedura utilizando a metodologia de superfície de resposta. Este estudo visa obter maiores conversões em (1*R*,2*R*,4*S*)-di-hidrocarveol, uma vez que este foi obtido majoritariamente e seletivamente.

Optou-se em utilizar a RSM uma vez que esta já vem sendo muito utilizada para a otimização das condições reacionais de processos químicos e bioquímicos e permite analisar as interações entre as variáveis a serem otimizadas (BAŞ; BOYACI, 2007). O software utilizado nesse trabalho foi o Statistica 6.0.

4.4.2. Efeito do meio reacional

Assim como foi realizado na redução da (4*R*)-carvona, o primeiro estudo realizado na redução da (4*S*)-carvona mediada por FP foi o do meio reacional, considerando que este tem grande importância nas reações mediadas por células íntegras. Os valores de conversão em produto e *e.d.* estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Influência do meio reacional na biorredução da (4*S*)-carvona mediada por FP.^a

Entrada	Sistema biocatalítico	conv. ^b (%)	<i>e.d.</i> ^b (%) (config.)	conv. ^b (%)	<i>e.d.</i> ^b (%) (config.)
		10		12	
1	Monofásico ^c	5	29 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	6	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
2	Bifásico ^c	0	-	0	-
3	Monofásico ^d	5	32 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	5	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
4	Bifásico ^d	<1	20 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	2	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)

^a *Condições reacionais*: FP Fleischmann (3 g); **8** (0,5 mmol); sistema monofásico: 30 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹ pH 7,5); sistema bifásico: 30 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹ pH 7,5) e 30 mL *n*-hexano; 26 °C; 24 h.

^b Conversão e *e.d.* determinados por CG-quiral.

^c Agitação orbital (100 rpm).

^d Agitação magnética (~800 rpm).

Novamente, observa-se que o meio reacional é de fundamental importância para as reações catalisadas por células íntegras de micro-organismo. As maiores conversões em di-hidrocarvonas (5% com *e.d.* (1*R*,2*S*)-**10** de 29–32%) e di-hidrocarveol (6% com *e.d.* de (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** de > 99%) foram obtidas quando utilizou-se o sistema monofásico formado de tampão fosfato com agitação orbital (Tabela 8, entrada 1) e magnética (Tabela 8, entrada 3). Quando utilizou-se o sistema bifásico composto de *n*-hexano e solução tampão, foram obtidas baixas conversões em **10** e **12** variando de 0 – 2% (Tabela 8 entradas 2 e 4).

Como pode ser observado as conversões em produtos foram similares quando utilizou-se o sistema monofásico com agitação orbital e monofásico com agitação magnética. A partir dessa observação optou-se em realizar a reação em sistema monofásico com agitação orbital, que permite o controle da agitação de forma mais precisa, em rpm.

4.4.3. Efeito da velocidade de agitação (rpm)

A velocidade de agitação em rpm influencia a difusão e partição do substrato e produto no meio reacional e assim a velocidade, rendimento e enantiosseletividade da reação (LOU et al., 2004). A fim de verificar este efeito, a reação de redução da (4*S*)-carvona mediada por FP em meio aquoso foi realizada com diferentes velocidades de agitação, sendo de 75, 100, 125 e 150 rpm. Os valores de conversão e *e.d.* em produtos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Influência da velocidade de agitação na biorredução da (4*S*)-carvona mediada por FP em meio aquoso.^a

Entrada	Vel. agitação (rpm)	conv. ^b (%)	<i>e.d.</i> ^b (%) (config.)	conv. ^b (%)	<i>e.d.</i> ^b (%) (config.)
		10		12	
1	75	4	28 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	5	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
2	100	5	29 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	5	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
3	125	5	32 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	6	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
4	150	5	33 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	6	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)

^a Condições reacionais: FP Fleischmann (3 g); **8** (0,5 mmol); 30 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 26 °C; 24 h; agitação orbital (75 – 150 rpm).

^b Conversão e *e.d.* determinados por CG-quiral.

Observa-se na Tabela 9 que não houve uma variação significativa nas conversões em **10** e **12** na faixa da velocidade de agitação estudada. As conversões em **10** variaram de 4 – 5% com *e.d.* de (1*R*,2*S*)-**10** de 28 – 33% e as conversões em **12** variaram de 5 – 6% com *e.d.* de (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** >99%.

A partir destes resultados, os estudos subsequentes foram realizados com 150 rpm, visando aumentar a conversão em produto.

4.4.4. Efeito do uso de diferentes marcas de fermentos

Neste estudo, seis cepas de *S. cerevisiae*, sendo 4 fermentos de pão comerciais (Fleischmann, Nordeste, Dona Benta, e Bruggemann) e duas industriais (CAT-1 e PE-2), que vêm sendo utilizadas no Brasil para produção de bioetanol (BASSO et al., 2008), foram utilizadas como catalisadores na reação de redução da (4*S*)-carvona em meio aquoso, para verificar o potencial de redução das enzimas presentes nestas leveduras. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Biorredução da (4*S*)-carvona em meio aquoso com diferentes leveduras de *S. cerevisiae*.^a

Entrada	Levedura	conv. ^b	<i>e.d.</i> ^b	conv. ^b	<i>e.d.</i> ^b
		(%)	(%)	(%)	(%)
		10	(config.)	12	(config.)
1	Fleischman	4	33 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	6	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
2	Dona Benta	10	61 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	6	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
3	Nordeste	13	61 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	4	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
4	Bruggeman	4	28 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	4	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
5	CAT-1	12	45(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	1	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
6	PE-2	1	9 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)	0	-

^a Condições reacionais: levedura (3 g); **8** (0,5 mmol); 30 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 26 °C; 24 h; agitação orbital (150 rpm).

^b Conversão e *e.d.* determinados por CG-quiral.

Todas as leveduras utilizadas apresentaram a capacidade de mediar a redução da (4*S*)-carvona, sendo que algumas foram mais eficientes que outras. Por exemplo, quando foram utilizados os fermentos comerciais das marcas Dona Benta (Tabela 10, entrada 2) e Nordeste (Tabela 10, entrada 3) como biocatalisadores, estes foram os mais eficientes, e as di-hidrocarvonas foram obtidas majoritariamente com conversões de 10 e 13% e boa seletividade (*e.d.* de (1*R*,2*S*)-**10** de 61%) e o di-hidrocarveol foi obtido com conversões de 6 e 4% e excelente seletividade ((1*R*,2*R*,4*S*)-**12** >99%), respectivamente.

Quando a levedura industrial CAT-1 (Tabela 10, entrada 5) foi utilizada, as di-hidrocarvonas também foram obtidas majoritariamente, entretanto com uma seletividade menor (*e.d.* de (1*R*,2*S*)-**10** de 45%) e o di-hidrocarveol foi obtido com apenas 1% de conversão. A levedura PE-2 (Tabela 10, entrada 6) foi o biocatalisador menos eficiente, e as di-hidrocarvonas foram obtidas com apenas 1% de conversão e baixa seletividade (*e.d.* de (1*R*,2*S*)-**10** de 9%), e o di-hidrocarveol não foi obtido.

Como o propósito deste trabalho é obter o di-hidrocarveol (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** com boas conversões e excelente *e.d.*, e baseado nestes resultados, o FP comercial Dona Benta foi selecionado para ser utilizado nos experimentos subsequentes.

4.4.5. Efeito do uso de diferentes tampões

A fim de verificar se o tipo de tampão utilizado na reação de redução da (4*S*)-carvona mediada por FP influencia nas conversões em produtos, neste estudo utilizou-se o tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,5 e uma mistura de

tampões contendo os tampões citrato, fosfato e borato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,5. É importante salientar que este estudo foi realizado com o intuito de verificar se era possível utilizar uma mistura de tampões que abrangesse a faixa de pH de 3,5 – 11,5 sem alterar as conversões em produtos, para posteriormente realizar o estudo do pH (Tabela 11).

Tabela 11. Influência do tipo de tampão na biorredução da (4*S*)-carvona mediada por FP em meio aquoso.^a

Entrada	Tampão	conv. ^b (%)	<i>e.d.</i> ^b (%)	conv. ^b (%)	<i>e.d.</i> ^b (%)
		10	(config.)	12	(config.)
1	fosfato	10	61 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	6	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
2	citrato/fosfato/borato	8	58 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	8	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)

^a Condições reacionais: FP Dona Benta (3 g); **8** (0,5 mmol); 30 mL solução tampão (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 26 °C; 24 h; agitação orbital (150 rpm).

^b Conversão e *e.d.* determinados por CG-quiral.

Como pode ser observado na Tabela 11 (entradas 1 e 2), a mudança do tampão de fosfato para citrato/fosfato/borato não influenciou significativamente as conversões e os valores de *e.d.* em di-hidrocarvonas. Quando os tampões fosfato e citrato/fosfato/borato foram utilizados as conversões em **10** foram de 10 e 8% com *e.d.* de (1*R*,2*S*)-**10** de 61% e 58%, e o di-hidrocarveol foi obtido com conversão de 6 e 8% com *e.d.* de (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** de >99%, respectivamente. Este estudo mostrou que é possível utilizar a mistura dos tampões sem interferir nas conversões em produto.

4.4.6. Efeito da razão substrato/levedura (S/L) versus concentração de levedura

Como citado anteriormente, o desempenho das reações biocatalisadas por FP pode ser influenciado devido a altas concentrações de substrato que pode levar à inibição das enzimas presentes nas células íntegras e, além disso, alguns compostos são tóxicos para muitos organismos vivos. Assim, para verificar a relação entre a massa de substrato e a de levedura e seu efeito na concentração de levedura, foi realizado um estudo multivariado usando RSM com a razão substrato/levedura (S/L) e a concentração de levedura de 8,0 – 40,0 mg g⁻¹ e 75,0 – 150,0 g L⁻¹, respectivamente. Os resultados em relação à conversão de (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função da razão S/E estão apresentados na Figura 54.

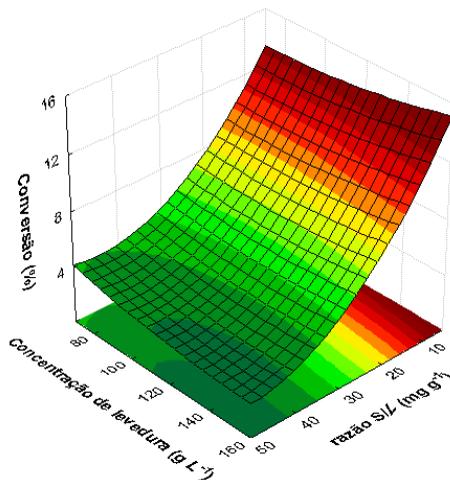


Figura 54. Valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função da razão (S/L) e concentração da levedura. [Condições reacionais: FP Dona Benta (3 g); **8** (0,2 – 0,8 mmol); 20 – 40 mL tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 26 °C; 24 h; agitação orbital (150 rpm)]

Pelos resultados mostrados na Figura 54, pode-se observar que a concentração da levedura não afetou significativamente as conversões em **12**. Entretanto, a razão substrato/enzima teve um forte efeito na conversão em **12**, porém a seletividade não foi afetada (*e.d.* de (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** >99%). Observou-se um aumento das conversões de 3 – 13% com a diminuição da razão S/E de 40,0 – 8,0, isto é com a diminuição da concentração do substrato. Estes resultados indicam que provavelmente ocorreu a inibição das enzimas presentes no FP com o aumento da concentração do substrato. OU et al. (2011) descreveram um efeito similar na redução da oxocarbazepina com *S. cerevisiae* CGMCC No. 2266, sendo que a conversão aumentou gradativamente com o tempo de reação e diminuiu com o aumento da concentração inicial do substrato. Assim como o *e.d.* de (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** não foi afetado pela variação da razão S/L, o *e.e.* da *S*-licarbazepina também não foi afetado pela variação da concentração inicial do substrato

As di-hidrocarbonas foram obtidas com conversões de 8 – 10% e *e.d.* de (1*R*,4*S*)-**10** de 37 – 65% (resultados não mostrados). A partir desses dados a razão S/E de 8,0 mg g⁻¹ e o volume de solução tampão de 30 mL foram empregados nos próximos experimentos.

4.4.7. Efeito da temperatura e do tempo

Para verificar a influência da temperatura e sua correlação com o tempo na reação de redução da (4*S*)-carvona mediada por FP utilizou-se a RSM. A temperatura e o tempo reacional variaram de 20 – 50 °C e 24 – 72 h, respectivamente. Os valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função da temperatura e do tempo reacional estão apresentados na Figura 55.

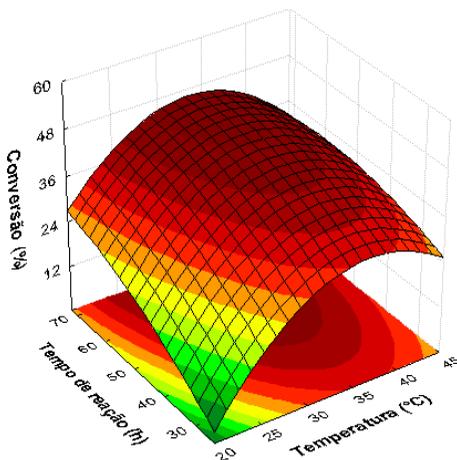


Figura 55. Valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função da temperatura e tempo reacional. [Condições reacionais: FP Dona Benta (3 g); **8** (0,2 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 20 – 50 °C; 24 – 72 h; agitação orbital (150 rpm)]

Como pode ser observado na Figura 55, ambos os efeitos, temperatura e tempo reacional, influenciaram significativamente as conversões em **12**. O aumento da temperatura de 20 – 40 °C aumentaram as conversões em produto, sendo de 10 – 53%. Ao aumentar a temperatura de 45 – 50 °C foi observada uma grande diminuição na conversão, sendo que a 45 °C, o produto foi obtido com ~25% (valor ~50 % menor em relação a maior conversão obtida), e a 50 °C não foi detectada a formação do produto. A diminuição da conversão com o aumento da temperatura pode ser atribuída provavelmente a grande perda da atividade catalítica devido à desnaturação das enzimas presentes no FP.

As maiores conversões em produto (~50%) foram obtidas em temperaturas entre 35 e 40 °C, e nesta faixa pode-se observar que não há uma mudança significativa nos valores obtidos após o tempo reacional de 45 – 50 h. Ao usar temperaturas menores, por exemplo, 20 °C observou-se um aumento

gradual das conversões com o aumento do tempo reacional de 24 – 72 h, sendo de 9 – 30%.

É importante enfatizar que a temperatura apresentou um grande efeito na formação do di-hidrocarveol (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** sendo que este foi obtido majoritariamente com conversões variando de 3 – 53% e com *e.d.* >99%, na faixa de temperatura utilizada, enquanto que as di-hidrocarvonas (1*S*,4*S*)-**10** e (1*R*,4*S*)-**10** foram obtidas com baixas conversões variando de 2 – 16 e 2 – 8 %, respectivamente. A di-hidrocarvona (1*R*,4*S*)-**10** sempre foi obtida em maiores quantidades que a (1*S*,4*S*)-**10**, porém quando a temperatura de 45 °C foi utilizada a (1*S*,4*S*)-**10** foi obtida em maior conversão (resultado não apresentado). Estes dados sugerem que provavelmente o aumento da temperatura influenciou na estereosseletividade da redução.

Resultados similares em relação à mudança da seletividade da reação foram obtidos por (XIAO et al., 2009) na síntese assimétrica do (2*S*,5*S*)-2,5-hexanediol catalisada com FP número 6 em meio aquoso. O maior rendimento em produto (78,7%) foi obtido quando a temperatura de 40 °C foi utilizada. Entretanto nesta temperatura foi observada uma pequena diminuição do *e.e.*, sendo de 95,7 – ~89%.

Baseado nos resultados em relação à conversão e *e.d.* de (1*R*,2*R*,4*S*)-**12**, a temperatura de 40 °C e o tempo reacional de 48 h foram escolhidos para serem utilizados nos experimentos seguintes.

4.4.8. Efeito do pH e da concentração do tampão

O efeito do pH e da concentração do tampão na redução de **8** mediada por FP em meio aquoso foi investigado usando a RSM. O pH variou de 3,5 – 11,5 e a concentração do tampão de 0,01 – 0,1 mol L⁻¹. Não foi possível utilizar tampões com concentrações na ordem de 0,001 mol L⁻¹ porque nesta concentração não é possível manter o pH da reação. Portanto, a concentração da solução tampão deve ser de 0,01 mol L⁻¹ ou maior para ser eficiente. Os valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função do pH e da concentração do tampão estão apresentados na Figura 56.

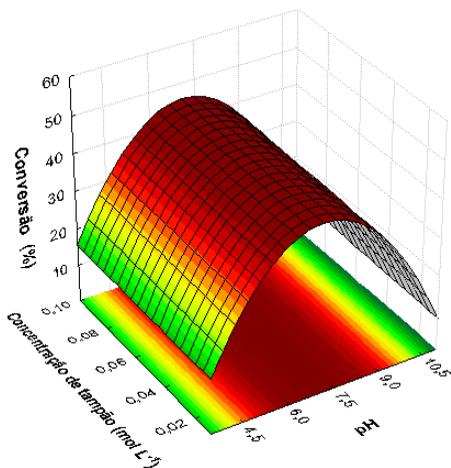


Figura 56. Valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função do pH e da concentração do tampão. [Condições reacionais: FP Dona Benta (3 g); **8** (0,2 mmol); 30 mL tampão citrato/fosfato/borato (0,01 – 0,1 mol L⁻¹, pH 3,5 – 11,5); 40 °C; 48 h; agitação orbital (150 rpm)]

Como pode ser observado na Figura 56 as conversões em **12** foram fortemente influenciadas pelo pH da solução, entretanto não foi verificado um efeito significativo com relação à concentração do tampão na faixa estudada. As maiores conversões em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** (53 % com *d.e.* >99%) foram observadas em pH neutros (7,0 – 7,5). Em pH mais ácidos ou mais básicos foi verificado uma diminuição nas conversões em produto, sendo de 53 – 0%.

É importante salientar que foi observado um aumento da conversão em (1*S*,4*S*)-**10** de 4 – 16% especialmente em pH básicos (pH > 9,5) (resultados não apresentados).

Resultados similares em relação ao pH ótimo foram obtidos na redução da (4*R*)-carvona mediada por FP (item 4.1.3.5) e na redução de outros substratos onde utilizou-se a levedura *S. cerevisiae*, e o pH mais adequado variou de 7,0 – 8,0 (CHEN et al., 2006) (LOU et al., 2004).

Para o estudo da adição de aditivos e dos demais estudos, o pH e a concentração do tampão foram fixados em 7,5 e 0,1 mol L⁻¹, respectivamente.

4.4.9. Efeito da adição de aditivos

Como pode-se observar no item 4.1.3.6 a adição de aditivos teve grande influência nas conversões em produto na biorredução da (4*R*)-carvona mediada

por FP. Os melhores aditivos foram o DMSO, a trealose e o líquido iônico [BMIm][PF₆], onde as di-hidrocarvonas foram obtidas com conversões de 56 – 74% e *e.d.* de (1*R*,2*R*)-**9** de 97 – 99%. Assim, a fim de verificar a influência da adição desses aditivos na redução de **8** mediada por FP, foram utilizados estes 3 aditivos puros e suas misturas utilizando uma superfície triangular. Os valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função da adição de aditivos estão apresentados na Figura 57.

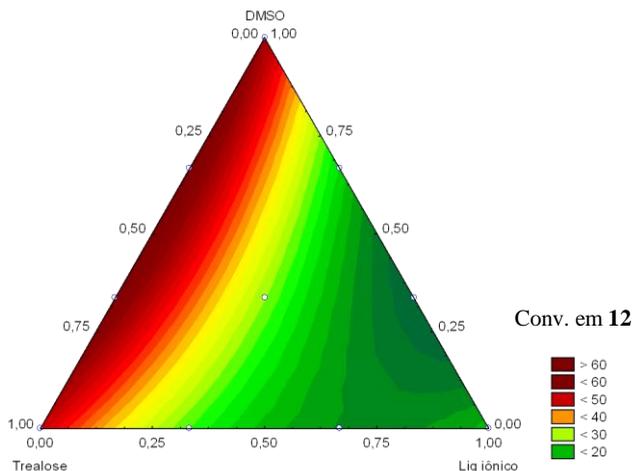


Figura 57. Valores de conversão em (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** em função da adição de aditivos usando uma superfície triangular. [Condições reacionais: FP Dona Benta (3 g); **8** (0,2 mmol); 27 mL de tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 3 mL aditivo; 40 °C; 48 h; agitação orbital (150 rpm)]

Pode-se observar na Figura 57 que quando o [BMIm][PF₆] foi utilizado como aditivo puro ou em misturas com DMSO e trealose, foram obtidas baixas conversões em produto, variando de 5 – 14%. Diversos estudos demonstram que o sistema bifásico formado de água/LI pode aumentar significativamente as biotransformações com células íntegras (PFRUENDER; JONES; WEUSTER-BOTZ, 2006) (HE et al., 2009), porém este efeito não foi observado neste estudo. Uma explicação provável deve-se à solubilização do substrato no LI dificultando assim sua interação com o biocatalisador que permaneceu na fase aquosa. Quando a trealose e o DMSO puros ou em suas misturas foram utilizados, foram obtidas as maiores conversões em produto, sendo de 14 – 50%. Comparando os resultados de conversão em **12** usando aditivos (conv. 5 – 50% e *e.d.* >99%) com os sem a adição destes (conv. 53% e *e.d.* >99%), pode-se concluir que estes compostos não mostraram efeito significativo em relação

ao aumento da conversão ao produto, como ocorreu quando estes foram utilizados na biorredução da (4*R*)-carvona.

Estes resultados mostraram que encontrar a melhor condição para uma reação enzimática não é uma tarefa fácil e não se pode presumir que o meio reacional utilizado para um substrato atuará da mesma maneira para o outro composto, mesmo que este seja estruturalmente semelhante.

Baseado nestes resultados a biotransformação da (4*S*)-carvona mediada por leveduras e fungos foi realizada sem a adição de aditivos.

4.4.10. Biorredução da (4*S*)-carvona com diferentes leveduras e fungos em micro escala

A fim de verificar a eficiência de outras leveduras e fungos na biorredução da (4*S*)-carvona, as leveduras *C. flavescens* (Pal) (coletadas no parque Palmital, em Chapecó/SC) e *S. xylofermentans* (Spat) (coletada na Floresta Amazônica de Roraima) crescidas em D-xilose e os fungos CF 0305 (isolados da folha da carapanaúba) e CG 0504 (isolados da galho da carapanaúba) crescidos em meio BDA foram utilizadas como biocatalisadores. Devido à pouca quantidade destas leveduras e fungos, as reações foram realizadas em microescala com volume total da reação de 3 mL. As demais condições reacionais foram as previamente otimizadas na redução da (4*S*)-carvona, tais como razão S/L = 8,0 mg g⁻¹, tempo reacional de 48 h, agitação orbital 150 rpm e pH do tampão citrato/fosfato/borato de 7,5, exceto a temperatura que foi de 26 °C. Para fins comparativos, a biorredução de **8** foi também realizada com FP nestas condições (Tabela 12).

Tabela 12. Biorredução da (4*S*)-carvona com diferentes leveduras e fungos em meio aquoso.^a

Entrada	Levedura	conv. ^b	<i>e.d.</i> ^b	conv. ^b	<i>e.d.</i> ^b
		(%)	(%)	(%)	(%)
		10	(config.)	12	(config.)
1	Pal 4.1.A	1	60 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	0	-
2	Pal 4.2.B	<1	0	<1	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)
3	Pal 5.1.B	27	62 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	3	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)
4	Pal 5.2.A	31	66 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	0	-
5	Pal 5.4.A	8	48 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	0	-
6	Spat 23.3	23	80 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	64	22 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)
7	CF 0305	11	87 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	0	-
8	CG 0504	14	26 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	0	-
9	FP	5	12 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	19	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)

^a Condições reacionais: levedura ou fungo (172,3-329,5 mg); **8** (razão S/L 8,0 mg g⁻¹); 3 mL solução tampão (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 26 °C; 48 h; agitação orbital (150 rpm).

^b Conversão e *e.d.* determinados por CG-quiral.

Observa-se na Tabela 12 que todas as leveduras utilizadas apresentaram a capacidade de biotransformar a (4*S*)-carvona, sendo que algumas foram mais eficientes e seletivas que outras. As leveduras Pal 5.1.B e Pal 5.2.A (Tabela 11, entradas 3 e 4) reduziram preferencialmente a ligação dupla C–C formando as di-hidrocarvonas com conversões de 27 e 31 % e *e.d.* de (1*R*,2*S*)-**10** de 62 e 66%, respectivamente.

As reações com os fungos CF 0305 e CG 0504 também formaram preferencialmente as di-hidrocarvonas, porém com conversões menores, sendo de 11 e 14% e com *e.d.* (1*R*,2*S*)-**10** de 87 e 26%, respectivamente (Tabela 12 entradas 7 e 8).

A levedura Spat 23.3 e o FP reduziram preferencialmente a ligação dupla C–C seguida da redução da ligação dupla C–O formando os di-hidrocarveóis com conversões de 64 (com *e.d.* de (1*R*,2*S*,4*S*)-**12** de 22%) e 19% (com e *e.d.* de (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** de >99%), respectivamente (Tabela 12 entradas 6 e 9). É importante salientar que esta levedura foi a mais eficiente, sendo que a (4*S*)-carvona foi 86,3% biotransformada em seus correspondentes produtos, porém foi a menos seletiva. As leveduras Pal 4.1.A, 4.2.B e 5.4.A foram as menos eficientes, e as di-hidrocarvonas e os di-hidrocarveóis foram obtidos com baixas conversões variando de 1 – 8% (Tabela 12, entradas 1, 5 e 6).

De um modo geral, as leveduras Pal e Spat e fungos CF 0305 e CG 0504 apresentaram um grande potencial para serem utilizados como biocatalisadores

na redução de **8**, sendo comparáveis ou muitas vezes superiores às leveduras *S. cerevisiae* que já vêm sendo amplamente utilizadas em biotransformações microbianas.

Dando continuidade a este trabalho, realizou-se a otimização das condições reacionais da biorredução da (3*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona **23** com FP em meio aquoso usando RSM, e os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

4.5. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS DA REDUÇÃO VIA ENZIMÁTICA DA (3*E*)-3-METIL-4-FENIL-3-BUTEN-2-ONA **23** COM FP

Como a redução de **23** catalisada por FP formou a cetona saturada **34** em baixa conversão (33%) e moderado *e.e.* (64%), realizou-se também a otimização das condições experimentais para este substrato utilizando a RSM a fim de se obter melhores conversões e *e.e.*.

4.5.1. Efeito da concentração de levedura e de substrato

O primeiro estudo realizado para a otimização das condições reacionais da redução de **23** catalisada por FP em meio aquoso por RSM foi a influência da concentração do substrato (8,3 – 25,0 mmol L⁻¹) e de levedura (33,3 – 166,7 g L⁻¹). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 58.

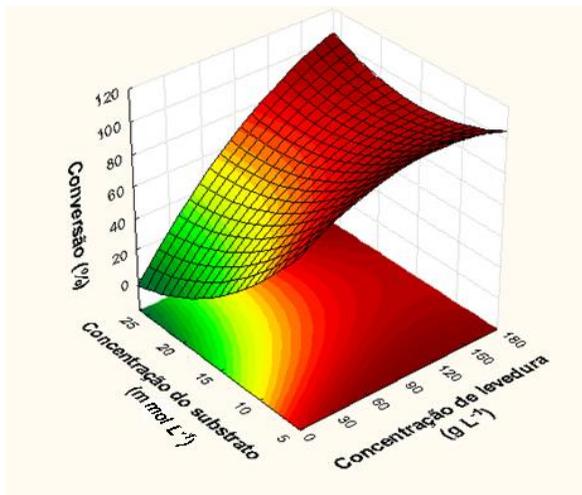


Figura 58. Valores de conversão em **34** em função da concentração de levedura e substrato. [Condições reacionais: FP Dona Benta (3 g); **23** (0,5 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 25 °C; 24 h; agitação orbital (150 rpm)]

Podem-se observar nos dados obtidos na superfície de resposta com relação à conversão em **34** em função da concentração de levedura e substrato, que ambas as variáveis afetam as conversões em produto. Com o aumento da concentração do substrato observou-se uma diminuição da conversão em **34**, sendo de 100 – 24%. Porém, com o aumento da concentração de levedura observou-se um aumento da conversão até a concentração de 100,0 g L⁻¹ e para valores maiores, as conversões se mantiveram praticamente constantes principalmente em baixas concentrações de substrato (8,3 mmol L⁻¹). Em altas concentrações de substrato (25,0 mmol L⁻¹), observou-se um aumento gradual da conversão com o aumento da concentração de levedura. Estes resultados também indicam que provavelmente ocorreu a inibição das enzimas com o aumento da concentração do substrato, assim como foi observado na redução da (4R)- e (4S)-carvona. A seletividade da reação praticamente não foi afetada pela variação na concentração de substrato e levedura, e o *e.e.* variou de 54 – 61%.

Baseado nestes resultados, a concentração de substrato de 8,3 mmol L⁻¹ e de levedura de 100,0 g L⁻¹ foram selecionadas para avaliar o efeito do pH do meio.

4.5.4. Efeito do pH do meio aquoso

Para verificar a influência do pH do meio nas conversões em produto, a reação de redução de **23** mediada por FP foi realizada em diferentes valores de pH, variando de 3,5 – 11,5. Os valores de conversão e *e.e.* em função do pH estão apresentados na Figura 59.

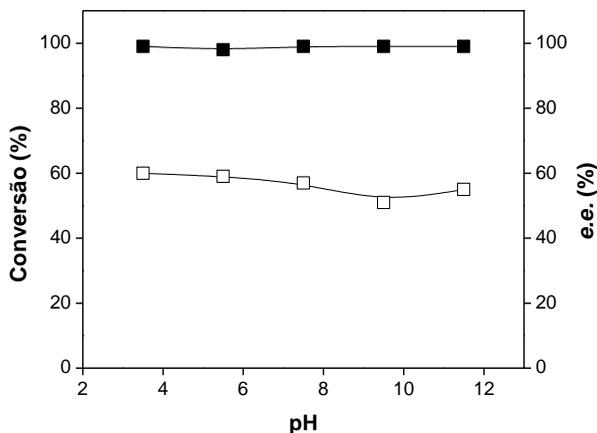


Figura 59. Valores de conversão em **34** (■) e excesso enantiomérico de (3*S*)-**34** (□) em função do pH do meio. [Condições reacionais: FP Dona Benta (3 g); **23** (0,25 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 3,5 – 11,5); 25 °C; 24 h; agitação orbital (150 rpm)]

Pode-se observar na Figura 59 que não houve uma variação das conversões (~99%) e *e.e.* (51 – 60%) em função da variação do pH do meio, diferentemente do que ocorreu com a biorredução da (4*R*)- e (4*S*)-carvona, onde as maiores conversões foram obtidas em pH na faixa de 7,0 – 8,0. Como o pH não influenciou a biorredução de **23**, o pH de 7,5 continuou sendo utilizado nos estudos subsequentes.

4.5.2. Efeito da temperatura e do tempo reacional

A fim de verificar-se a influência da temperatura (20 – 45 °C) e do tempo reacional (3 – 9 h) na reação de biorredução da olefina ativada **23** com FP comercial, realizou-se um estudo multivariado, e os valores de conversão em **34** estão apresentados na Figura 60.

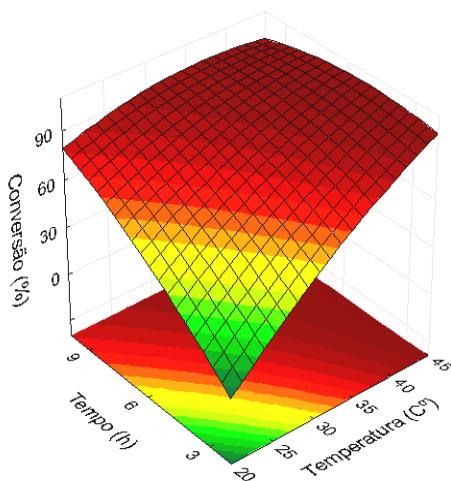


Figura 60. Valores de conversão em **34** em função da temperatura e tempo reacional. [Condições reacionais: FP Dona Benta (3 g); **23** (0,25 mmol); 30 mL de tampão citrato/fosfato/borato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 20 – 40 °C; 3 – 9 h; agitação orbital (150 rpm)]

Observa-se na superfície de resposta da conversão em **34** em função da temperatura e tempo reacional, que ambos os fatores influenciaram a formação do produto. Observou-se um grande aumento nas conversões em produto com o aumento da temperatura de 20 – 40 °C, principalmente em 3 h de reação, sendo de 19 – >99 %. Após 9 h de reação não houve uma mudança significativa nas conversões nesta faixa de temperatura. Novamente observou-se que a temperatura e o tempo de reação são os fatores que mais influenciaram a formação dos produtos nas reações biocatalisadas. É importante salientar que não houve uma mudança significativa nos valores de *e.d.* (50 – 61%) com a variação da temperatura. A partir destes resultados a temperatura de 35 °C e os tempos de reação de 3 e 6 h foram utilizados para verificar a influência da adição de aditivos.

4.5.3. Efeito da adição de aditivos

Como pode ser observado em todos os estudos até então realizados com o substrato **23**, a seletividade da reação não foi influenciada significativamente, obtendo-se sempre valores moderados de *e.e.* (50 – 61%). Com o intuito de aumentar os valores de *e.e.*, realizou-se a redução de **23** em meio aquoso com a adição de aditivos uma vez que está bem documentado na literatura que alguns

aditivos podem influenciar não apenas a reatividade da reação mas também a seletividade. Os valores de conversão em **34** em função do aditivo estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Influência da adição de aditivos na biorredução da olefina ativada **23** mediada por FP em meio aquoso.^a

Entrada	Aditivo	conversão ^b (%)		<i>e.e.</i> ^b (%)	
		3 h	6 h	3 h	6 h
1	Sem	81	93	54	52
2	Acetonitrila	46	68	69	65
3	<i>t</i> -Butanol	50	70	70	67
4	<i>n</i> -Hexano	38	67	58	58
5	Glicerol	63	80	58	57
6	Etanol	79	98	63	66
7	DMSO	63	98	63	64
8	L-Cisteína	61	96	58	58
9	[BMIm][PF ₆]	8	22	54	48
10	[BMIm][BF ₄]	55	82	48	45
11	Sacarose	64	73	58	58
12	Trealose	81	93	55	55
13	Glicose	68	96	56	52

^a Condições reacionais: FP Dona Benta (3 g); **23** (0,25 mmol); 27 mL solução tampão (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5); 3 mL de aditivo; 35 °C; 3 e 6 h; agitação orbital (150 rpm).

^b Conversão e *e.e.* determinados por CG-quiral.

Observa-se na Tabela 13 que em geral quando as reações foram realizadas em 3 h e com a adição dos aditivos, as conversões em **34** foram menores ou similares quando comparadas à conversão na ausência de aditivo (Tabela 13, entrada 1). Porém, observou-se um aumento na seletividade da reação com a adição de quase todos estes aditivos, principalmente quando a acetonitrila (Tabela 13, entrada 2) e o *t*-butanol (Tabela 13, entrada 3) foram utilizados, onde obteve-se *e.e.* de 69 e 70% respectivamente. Quando a reação foi realizada em 6 h e com a presença de etanol, DMSO, L-cisteína e glicose as conversões em **34** foram superiores às obtidas sem a presença de aditivo, e o *e.e.* variou de 45 – 67% (Tabela 13, entradas 6, 7, 8 e 13).

É importante salientar que para este substrato, o LI [BMIm][BF₄] foi mais eficiente que [BMIm][PF₆], sendo que as conversões variaram de 55 – 82% e 8 – 22%, respectivamente. Uma explicação para este fato é que o [BMIm][BF₄] é mais solúvel em água (VAN RANTWIJK; MADEIRA LAU; SHELDON, 2003) e não formou fases com o meio aquoso e nem com o

substrato e assim não houve uma dificuldade de difusão entre o substrato e a enzima, como talvez tenha ocorrido com o [BMIm][PF₆].

Estes resultados mostraram, de modo geral, que ambas as conversões e seletividade dependem da presença de aditivos no meio reacional. A natureza e a estrutura do substrato também devem ser avaliadas, em conjunto com os outros parâmetros experimentais.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados na biorredução da (4*R*)-carvona (**7**) mediada por levedura *S. cerevisiae*, pode-se concluir que:

➤ A biorredução de **7** mediada por FP levou à formação preferencial da (1*R*,4*R*)-di-hidrocarvona, seguida da (1*S*,4*R*)-di-hidrocarvona pela redução da ligação dupla C–C endocíclica e do (1*R*,2*S*,4*R*)-di-hidrocarveol pela redução das ligações dupla C–C endocíclica e C–O.

➤ O sistema biocatalítico formado de apenas tampão citrato/fosfato e FP da marca Fleischmann com agitação orbital (100 rpm) foi o mais eficiente, onde as di-hidrocarvonas foram obtidas com conversão de 53% e com *e.d.* da (1*R*,4*R*)-**9** de 89%;

➤ Tanto a concentração de levedura quanto a de substrato influenciaram as conversões e *e.d.* de **9**, onde as maiores foram obtidas com 100,0 g L⁻¹ de FP e 16,6 mmol L⁻¹ de substrato;

➤ A temperatura e o pH ótimo da biorredução de **8** foram de 25 °C e 7,5, respectivamente;

➤ Observou-se uma grande influência nas conversões e *e.d.* em produto com a adição de aditivos no meio aquoso. O DMSO, trealose e sacarose foram os mais eficientes, e as di-hidrocarvonas foram obtidas com 70, 74 e 71% de conversão e *e.d.* de (1*R*,4*R*)-**9** de 97, 99 e 92%, respectivamente;

➤ A porcentagem volumétrica de DMSO também influenciou as conversões e excesso diastereoisomérico em produto.

A biorredução das olefinas ativadas **7**, **22**, **23**, **24** e **25** mediada por leveduras em meio aquoso com adição de DMSO levou a formação preferencial das cetonas saturadas **9**, **33**, **34**, **35** e **36** pela redução da ligação dupla C–C conjugada à carbonila com conversões de 70, 59, 33, >99 e 4%, respectivamente. A biorredução de **8** levou à formação de **12** com 4% de conversão pela redução das ligações duplas C–C e C–O.

A partir dos resultados apresentados da biorredução da (4*S*)-carvona (**8**) mediada pela levedura *S. cerevisiae*, pode-se concluir que:

➤ As maiores conversões em **12** foram obtidas em meio aquoso contendo apenas tampão, tanto em agitação orbital como magnética (5 – 6% com *e.d.* de (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** >99%);

➤ Na faixa de velocidade de agitação estudada (75 – 150 rpm) não foi verificada uma variação nas conversões e *e.d.* em **12** (5 – 6%);

➤ Quando as leveduras *S. cerevisiae* Dona Benta, Nordeste e CAT-1 foram utilizadas como biocatalisadores, os produtos majoritários foram as di-hidrocarvonas com conversões de 10 – 13%, com *e.d.* de (1*R*,2*S*)-**10** de 33 –

61%. O (1*R*,2*R*,4*S*)-di-hidrocarveol foi obtido com conversões de 1 – 6% e com *e.d.* de >99%;

- O tipo do tampão não influenciou as conversões em produto;
- A razão substrato/levedura (S/L) influenciou as conversões em **12**, porém não foi verificado efeito significativo da variação da concentração de levedura nas conversões em produtos;
- Tanto a temperatura quanto o tempo de reação influenciaram nas conversões em **12**, sendo obtidas conversões de ~50% a 35 – 40°C e após 48 h de reação;
- Observou-se uma grande influência nas conversões com a variação do pH do meio, sendo o pH ótimo de 7,5;
- A variação da concentração do tampão não influenciou as conversões em **12**;
- Não foi verificado um aumento das conversões em **12** com a adição de aditivos;
- Todas as leveduras e fungos utilizados como catalisadores na redução de **8** apresentaram a capacidade de biotransformar este substrato, sendo que a levedura *S. xylofermentans* foi a mais eficiente, biotransformando 86,3% do substrato em produtos. Entretanto, este foi o biocatalisador menos seletivo, formando tanto as di-hidrocarvonas como os di-hidrocarveóis.

A partir dos resultados apresentados da biorredução da (3*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona (**23**) mediada por levedura *S. cerevisiae*, pode-se concluir que:

- Ambas as variáveis, concentração de levedura e substrato, afetaram as conversões em (3*S*)-**34** (24 – 100%), porém a seletividade da reação não foi afetada (*e.e.* de 54 – 61%). As concentrações ótimas de substrato e levedura foram de 8,3 mmol L⁻¹ e de 100,0 g L⁻¹, respectivamente;
- Não houve uma variação significativa nas conversões (~99%) e *e.e.* (51 – 60%) em produto com a variação do pH do meio reacional;
- A temperatura e o tempo de reação ótimo da biorredução de **23** mediada por FP foram de 35 °C e 6 h, respectivamente, e o produto **34** foi obtido com conversões de 93% e *e.e.* de 52%;
- Não houve variação significativa na seletividade da reação com a adição de aditivo no meio reacional (*e.e.* 45 – 67%) em 6 h de reação, porém com a adição de etanol, DMSO, L-cisteína, glicose e trealose as conversões em **34** foram similares (93%) ou superiores (96 – 98%) às obtidas sem a presença de aditivo (93%);

O método proposto para extrair os reagentes e produtos do meio aquoso, a HF-LLLME, apresentou vantagens em relação à menor geração de resíduos

(redução de 99,5% de solvente orgânico) e tempo necessário para extração, quando comparado à extração líquido-líquido convencional.

A partir dos resultados apresentados, verifica-se a grande importância de analisar as condições reacionais nas biotransformações catalisadas por microorganismos.

A RSM utilizada para otimizar as condições experimentais das reações biocatalisadas mostrou ser uma técnica eficiente, sendo possível obter informações importantes das interações entre as variáveis que foram analisadas.

De maneira geral, obteve-se resultados bastante promissores na biorredução da olefina ativada (4*S*)-carvona mediada pelas leveduras *S. cerevisiae*, *S. xylofermentans* e *C. flavescens* e pelos fungos isolados da carapanaúba, uma planta da floresta Amazônica.

6. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, têm-se como perspectivas:

- Dar continuidade aos estudos de biorredução de **8** com os fungos isolados da carapanaúba e as leveduras *S. xylofermentans* e *C. flavescens*, a fim de obter as condições ótimas de reação, bem como realizar estas reações em maior escala;
- Testar outros micro-organismos na biotransformação da 3-metil-ciclo-hexen-2-ona, para obter o produto em maiores conversões e *e.e.*;
- Realizar as reações de biotransformação em sistemas trifásicos formados por água/solvente orgânico/líquidos iônicos;
- Determinar a configuração absoluta do produto formado na biorredução da (6*E*)-2-metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanona **22** e **25** catalisada por micro-organismos;
- Imobilizar o biocatalisador em diferentes suportes, tais como crisotila, carvão ativo, polissacarídeos (amido, gelatina e caseinato de sódio) e polímeros sintéticos (PEO, PVA, etc.), e avaliar a sua eficiência nas reações citadas anteriormente;
- Reutilizar as membranas nas reações de biorredução.

REFERÊNCIAS

ABATE, A. et al. Chirality and fragrance chemistry: Stereoisomers of the commercial Chiral odorants muguesia and pamplefleu. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 1281-1290, 2005.

ALBUQUERQUE, P. M. et al. Influence of sugars on enantioselective reduction using *Saccharomyces cerevisiae* in organic solvent. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 141-147, 2007.

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.

BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. Baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a tool for the synthesis of pheromones. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 421-431, 2004.

BARKAKATY, B.; TAKAGUCHI, Y.; TSUBOI, S. New synthetic routes towards various α -fluorinated aryl ketones and their enantioselective reductions using baker's yeast. **Tetrahedron**, v. 63, n. 4, p. 970-976, jan. 2007.

BARROS-FILHO, B. A. et al. Bioreduction of prochiral ketones by growing cells of *Lasiodiplodia theobromae*: Discovery of a versatile biocatalyst for asymmetric synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1-4, p. 37-40, ago. 2010.

BAŞ, D.; BOYACI, İ. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 836-845, 2007.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BEDENDO, G. C.; JARDIM, I. C. S. F.; CARASEK, E. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and detection by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 88, p. 573-580, 2012.

BEHERA, S. et al. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia L.*) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 96-100, 2010.

BENCZE, L. C. et al. Substituent effects on the stereochemical outcome of the baker's yeast-mediated biotransformation of α -hydroxy- and α -acetoxymethyl-5-phenylfuran-2-yl-ethanones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, n. 3, p. 356-364, 2010.

BHATIA, S. P. et al. Fragrance material review on dihydrocarveol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S123-S125, 2008.

BIE, S. et al. Effect of phase composition on the bioconversion of methyltestosterone in a biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 55, n. 1-2, p. 1-5, set. 2008.

BLAY, G. et al. Synthesis of all 7 α H-guaia-4,11-dien-3-one diastereomers from (+)-dihydrocarvone. **Tetrahedron**, v. 61, n. 47, p. 11156-11162, 2005.

BORGES, K. B. et al. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 4, p. 385-397, 2009.

BRÄUTIGAM, S. et al. Whole-cell biocatalysis: Evaluation of new hydrophobic ionic liquids for efficient asymmetric reduction of prochiral ketones. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 4, p. 310-316, 2009.

BRENNA, E. et al. Enantioselective C=C bond reduction of unsaturated α -chloro esters by old yellow enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 73, n. 1-4, p. 17-21, dez. 2011.

CABRAL, J. S. **Engenharia Enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003.

CAMPBELL, M. K. et al. **Bioquímica**. São Paulo: Thomson, 2007.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927, 2007.

CARBALLEIRA, J. . et al. *Gongronella butleri*, *Schizosaccharomyces octosporus* and *Diplogelasinospora grovesii*: novel microorganisms useful for the stereoselective reduction of ketones. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 6, p. 611-623, 2004.

CARBALLEIRA, J. D. et al. Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 686-714, 2009.

CARLETTO, J. S.; CARASEK, E.; WELZ, B. Hollow-fiber liquid-liquid-solid micro-extraction of lead in soft drinks and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 84, n. 3, p. 989-994, 2011.

CHEN, J. et al. Sequential design of pH profiles for asymmetric bioreduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutyrate using a new experimental design method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 689-696, 2006.

CHEN, X. et al. Synthesis of optically active dihydrocarveol *via* a stepwise or one-pot enzymatic reduction of (*R*)- and (*S*)-carvone. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 23, n. 10, p. 734-738, 2012.

CHU, Y. et al. Hydrogen transfer pathways of the asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketone mediated by baker's yeast. **Bioorganic Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 158-166, 2006.

COLLINS, C. H. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

CORDELL, G. A. et al. Vegetables as chemical reagents. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 3, p. 478-492, 2007.

CRAMAROSSA, M. R. et al. Biocatalytic reduction of (+)- and (-)-carvone by bacteria. **Comptes Rendus Chimie**, v. 8, n. 5, p. 849-852, 2005.

CRUZ, A. et al. Solvent partitioning and whole-cell sitosterol bioconversion activity in aqueous-organic two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 3-4, p. 342-353, 2004.

CUI, J.-N. et al. Control of enantioselectivity in the baker's yeast asymmetric reduction of γ -chloro β -diketones to γ -chloro (S)- β -hydroxy ketones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 9, n. 15, p. 2681-2692, 1998.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 2-3, p. 205-214, 1999.

DA SILVA, J. M. R.; NASCIMENTO, M. DA G. **Epoxidação Químio-Enzimática do Citronelol e β -Cariofileno**. Florianópolis, SC, 2012. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

DOŁĘGA, A. Alcohol dehydrogenase and its simple inorganic models. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 7-8, p. 916-937, 2010.

DONG, Y. et al. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 2, p. 226-230, 2007.

DUMANSKI, P. G. et al. The baker's yeast-mediated reduction of conjugated methylene groups in an organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 905-908, 2001.

EMÍDIO, E. S. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 24, p. 2175-2183, 2010.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry : a Textbook**. Berlin: Springer Berlin, 2011.

FAIRLIE, J. C.; HODGSON, G. L.; MONEY, T. Synthesis of (\pm)-camphor. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 0, p. 2109-2112, 1973.

FERNANDES, P. et al. Use of free and immobilized *Pseudomonas putida* cells for the reduction of a thiophene derivative in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, n. 0, p. 353-361, 2002.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6-7, p. 405-418, 2009.

FURNISS, B. S.; VOGEL, A. I. **Vogel's textbook of practical organic chemistry including qualitative organic analysis**. Disponível em: <<http://books.google.com/books?id=n-EPAQAAMAAJ>>. Acesso em: 16 jul. 2012.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, n. 8, p. 1721-1754, 2007.

GORETTI, M. et al. Biotransformation of electron-poor alkenes by yeasts: Asymmetric reduction of (4*S*)-(+)-carvone by yeast enoate reductases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6-7, p. 463-468, 2009.

GORETTI, M. et al. Response surface methodology as optimization strategy for asymmetric bioreduction of (4*S*)-(+)-carvone by *Cryptococcus gastricus*. **Bioresource Technology**, v. 121, n. 0, p. 290-297, 2012.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.

HAMADA, H. et al. Biotransformation of geraniol, nerol and (+)- and (-)-carvone by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 4, p. 615-621, 1997.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HAYAKAWA, R. et al. Control of enantioselectivity in the bakers' yeast reduction of β -keto ester derivatives in the presence of a sulfur compound. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 1–2, p. 67-70, 1998.

HAYAKAWA, R.; SHIMIZU, M.; FUJISAWA, T. The baker's yeast reduction of 1-acetoxy-2-alkanones in the presence of a sulfur compound. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 19, p. 3201-3204, 1997.

HE, J.-Y. et al. Biocatalytic synthesis of ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxy-butanoate in an aqueous-organic solvent biphasic system using *Aureobasidium pullulans* CGMCC 1244. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 244-249, 2006.

HE, J.-Y. et al. Microbial reduction of ethyl acetoacetate to ethyl (*R*)-3-hydroxybutyrate in an ionic liquid containing system. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 316-321, 2009.

HIRATA, T. et al. Stereospecific hydrogenation of the C=C double bond of enones by *Escherichia coli* overexpressing an enone reductase of *Nicotiana tabacum*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 158-162, 2009.

HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D. Enzymatic reductions for the chemist. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2285-2314, 2011.

HOOK, I. L.; RYAN, S.; SHERIDAN, H. Biotransformation of aliphatic and aromatic ketones, including several monoterpenoid ketones and their derivatives by five species of marine microalgae. **Phytochemistry**, v. 63, n. 1, p. 31-36, 2003.

HU, Q.; XU, Y.; NIE, Y. Highly enantioselective reduction of 2-hydroxy-1-phenylethanone to enantiopure (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol using *Saccharomyces cerevisiae* of remarkable reaction stability. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8502-8508, 2010.

HUA, D. H.; VENKATARAMAN, S. Preparation of (*S*)-(-)-4-methyl-2-cyclohexen-1-one. A useful chiral building block. **J. Org. Chem.**, v. 53, n. 5, p. 1095-1097, 1988.

HUANG, Y.; ZHANG, F.; GONG, Y. A convenient approach to (*S*)-2-ethylhexan-1-ol mediated by baker's yeast. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 42, p. 7217-7219, 2005.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1019-1032, 2008.

JACOBSEN, E. E. et al. Enantioselective enzymatic preparation of chiral glutaric monocarboxylic acids and amides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, n. 1-2, p. 55-58, 2003.

JIANG, C.-H.; BHATTACHARYYA, A.; SHA, C.-K. Enantiospecific total synthesis of (-)-bakkenolide III and formal total synthesis of (-)-bakkenolides B, C, H, L, V, and X. **Organic Letters**, v. 9, n. 17, p. 3241-3243, 2007.

JURČEK, O.; WIMMEROVÁ, M.; WIMMER, Z. Selected chiral alcohols: Enzymic resolution and reduction of convenient substrates. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, n. 5-7, p. 767-781, 2008.

KIM, G.-S. et al. Transformation of menthane monoterpenes by *Mentha piperita* cell culture. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 19, p. 1553-1556, 2002.

KOKOSA, J. M.; PRZYJAZNY, A.; JEANNOT, M. A. **Solvent Microextraction : Theory and Practice**. Hoboken, N.J: Wiley, 2009.

KRAGL, U.; ECKSTEIN, M.; KAFTZIK, N. Enzyme catalysis in ionic liquids. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 565-571, 2002.

LAANE, C. et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1987.

LEE, D.-X.; XIA, W.-S.; ZHANG, J.-L. Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 291-295, 2008.

LEÓN, R. et al. Whole-cell biocatalysis in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7–8, p. 483-500, 1998.

LI, J.-T. et al. Improved synthesis of chalcones under ultrasound irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 9, n. 5, p. 237-239, 2002.

LI, X. et al. Chemoselective conjugate reduction of α,β -unsaturated ketones catalyzed by rhodium amido complexes in aqueous media. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 9, p. 2981-2988, 2010.

LI, Y.-N. et al. Asymmetric reduction of 2-octanone in water/organic solvent biphasic system with Baker's yeast FD-12. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1305-1311, 2007.

LOU, W.-Y. et al. Efficient synthesis of optically active organosilyl alcohol via asymmetric reduction of acyl silane with immobilized yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 190-196, 2004.

LOU, W.-Y.; ZONG, M.-H.; SMITH, T. J. Use of ionic liquids to improve whole-cell biocatalytic asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane for efficient synthesis of enantiopure (*S*)-1-trimethylsilylethanol. **Green Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 147, 2006.

LU, S.-M.; BOLM, C. Highly enantioselective synthesis of optically active ketones by iridium-catalyzed asymmetric hydrogenation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 46, p. 8920–8923, 2008.

LUO, F.; WANG, P.; GONG, Y. Highly enantioselective bioreduction of 2-fluorocinnamyl alcohols mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 13, p. 1693-1695, 2010.

LUO, Y.; LI, W.-M.; WANG, W. Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress? **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1–3, p. 378-384, 2008.

MACHADO, L. L. et al. Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 3-4, p. 130-133, 2008.

MACÍAS, F. A. et al. Studies on the stereostructure of eudesmanolides from *Umbelliferae*: Total synthesis of (+)-decipienin A. **Tetrahedron**, v. 56, n. 21, p. 3409-3414, 2000.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, n. 5, p. 513-557, 2009.

MAUGARD, T.; LAMARE, S.; LEGOY, M. D. Gas phase biotransformation reaction catalyzed by baker's yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 73, n. 2, p. 164-168, 2001.

MILNER, S. E.; MAGUIRE, A. R. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. **ARKIVOC**, v. (i), p. 321-382, 2012.

MIYAZAWA, M.; SHIMIZU, K. Stereoselective biocatalytic reduction of α -ionone by *Glomerella cingulata*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 1-2, p. 6-8, 2012.

MONTI, D. et al. Redox reactions catalyzed by isolated enzymes. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 7, p. 4111-4140, 2011.

MÜLLER, A.; HAUER, B.; ROSCHE, B. Enzymatic reduction of the α , β -unsaturated carbon bond in citral. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, n. 3-6, p. 126-130, 2006.

MUNRO, A. W.; TAYLOR, P.; WALKINSHAW, M. D. Structures of redox enzymes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 369-376, 2000.

NAKAMURA, K. et al. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 18, p. 2659-2681, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2000.

NESTL, B. M. et al. Biocatalytic racemization of synthetically important functionalized α -hydroxyketones using microbial cells. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, n. 12, p. 1465-1474, 2007.

Netxplica. Disponível em:
<<http://www.netxplica.com/manual.virtual/exercicios/bio10/biomoleculas/10.BIO.protidos.htm>>. Acesso em: 9 jul. 2012.

OHBA, M. et al. Syntheses and absolute configurations of the marine sponge purines (+)-agelasimine-A and (+)-agelasimine-B. **Tetrahedron**, v. 53, n. 50, p. 16977-16986, 1997.

OLIVEIRA, A. R. M. DE et al. Liquid-phase microextraction (LPME): fundamentals and applications to the analysis of drugs in biological samples. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

ORDEN, A. A. et al. Anti-Prelog reduction of ketones by hairy root cultures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, n. 3-4, p. 216-220, 2009.

OU, Z.-M. et al. Synthesis of *S*-licarbazepine by asymmetric reduction of oxcabazepine with *Saccharomyces cerevisiae* CGMCC No. 2266. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 294-297, 2011.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 132-142, 2008.

PERLES, C. E.; MORAN, P. J. S.; VOLPE, P. L. O. Bioreduction of ethyl 3-oxobutyrate by *Saccharomyces cerevisiae*: A metabolic in vivo study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 82-87, 2008.

PFRUENDER, H.; JONES, R.; WEUSTER-BOTZ, D. Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 182-190, 2006.

PILISSÃO, C.; CARVALHO, P. DE O.; NASCIMENTO, M. DA G. Enantioselective acylation of (*RS*)-phenylethylamine catalysed by lipases. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1352-1357, 2009.

PORTO, C. et al. (*R*)-(-)-carvone and (1*R*, 4*R*)-*trans*-(+)-dihydrocarvone from *Poiretia latifolia vogel*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 782-786, 2010.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAN, N. et al. Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale. **Green Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 361-372, 1 2008.

RCSB Protein Data Bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 11 nov. 2012.

RIBEIRO, J. B. et al. Immobilized microorganisms in the reduction of ethyl 4-chloroacetoacetate. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 19, p. 2263-2266, 2009.

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

SCHURIG, V. Chiral separations using gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9-10, p. 647-661, 2002.

SCHURIG, V. Use of derivatized cyclodextrins as chiral selectors for the separation of enantiomers by gas chromatography. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 68, n. 2, p. 82-98, 2010.

SEBRÃO, D.; SÁ, M. M.; NASCIMENTO, M. DA G. Regioselective acylation of D-ribose-1,4-lactone catalyzed by lipases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 551-556, 2011.

SHELDON, R. A. et al. Biocatalysis in ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 147-151, 2002.

SHIMODA, K.; HIRATA, T. Biotransformation of enones with biocatalysts - two enone reductases from *Astasia longa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 8, n. 4-6, p. 255-264, 2000.

SHIMODA, K.; HIRATA, T.; NOMA, Y. Stereochemistry in the reduction of enones by the reductase from *Euglena gracilis* z. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 49-53, 1998.

SILVA, V. D.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 3-4, p. 157-163, 2010.

SILVA, W. S. D. et al. Enzyme-mediated epoxidation of methyl oleate supported by imidazolium-based ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 98-103, 2011.

SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 460-468, 1998.

SOLOMONS, T. W. G. **Organic Chemistry**. New York: Wiley, 1996.

SORTINO, M.; ZACCHINO, S. A. Efficient asymmetric hydrogenation of the C=C double bond of 2-methyl- and 2,3-dimethyl-N-phenylalkylmaleimides by *Aspergillus fumigatus*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, n. 5, p. 535-539, 2010.

STALCUP, A. M. Chiral Separations. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 341-363, 2010.

STAMBUK, B. U. et al. A Dependable method for the synthesis of [¹⁴C]trehalose. **Analytical Biochemistry**, v. 212, n. 1, p. 150-153, 1993.

STEWART, J. D. Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 363-368, 2000.

SWIDERSKA, M. A.; STEWART, J. D. Stereoselective enone reductions by *Saccharomyces carlsbergensis* old yellow enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 1-2, p. 52-54, 2006.

VAIJAYANTHI, T.; CHADHA, A. Asymmetric reduction of aryl imines using *Candida parapsilosis* ATCC 7330. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, n. 1, p. 93-96, 2008.

VAN DYK, M. S. et al. Biotransformation of monoterpenoid ketones by yeasts and yeast-like fungi. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, n. 1-4, p. 149-154, 1998.

VAN RANTWIJK, F.; MADEIRA LAU, R.; SHELDON, R. A. Biocatalytic transformations in ionic liquids. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 131-138, 2003.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515-536, 2007.

VIOLANTE, G. D. et al. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 12, p. 1600-1603, 2002.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. New York: Wiley, 1995.

WANG, W.; ZONG, M.-H.; LOU, W.-Y. Use of an ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4'-methoxyacetophenone catalyzed by immobilized *Rhodotorula* sp. AS2.2241 cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 70-76, 2009.

WANG, X. Y. et al. Baker's yeast mediated reduction of substituted acenaphthenequinones: Regio- and enantioselective preparation of mono-hydroxyacenaphthenones. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, n. 6, p. 681-684, 2007.

WARD, T. J.; WARD, K. D. Chiral Separations: Fundamental Review 2010. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 12, p. 4712-4722, 2010.

WOLFENDEN, R.; SNIDER, M. J. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, n. 12, p. 938-945, 2001.

XIAO, M. et al. Reaction characteristics of asymmetric synthesis of (2*S*,5*S*)-2,5-hexanediol catalyzed with baker's yeast number 6. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n. 3, p. 493-499, 2009.

YADAV, J. S. et al. *Daucus carota* and baker's yeast mediated bio-reduction of prochiral ketones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, n. 6, p. 717-723, 2007.

YEATES, C. A.; KRIEG, H. M.; BREYTENBACH, J. C. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin induced complexation for the biocatalytic resolution of a poorly soluble epoxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 228-235, 2007.

ZAGOZDA, M.; PLENKIEWICZ, J. Enantioselective reduction of α,β -unsaturated ketones by *Geotrichum candidum*, *Mortierella isabellina* and *Rhodotorula rubra* yeast. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 13, p. 1958-1962, 2006.

ZAMPIERI, D. S. et al. Hydride transfer versus electron transfer in the reduction of 4-phenyl-3-halo-3-buten-2-ones mediated by *Pichia stipitis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 289-293, 2011.

ZAMPIERI, D. S. et al. Enhancements of enantio and diastereoselectivities in reduction of (Z)-3-halo-4-phenyl-3-buten-2-one mediated by microorganisms in ionic liquid/water

biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, n. 0, p. 61-64, 2013.

ZANOTTO, S. P. et al. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1046-1059, 2009.

ZEYNIZADEH, B.; BEHYAR, T. Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with NaBH_4 /wet SiO_2 under solvent free condition. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6a, p. 1200-1209, 2005.

ZHANG, C. X. et al. An enantioselective formal synthesis of (-)-thujopsene. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, n. 3, p. 256-258, 2008.

ZHANG, W. et al. Biocatalytic synthesis of ethyl (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate with *Candida krusei* SW2026: A practical process for high enantiopurity and product titer. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 11, p. 1270-1275, 2009.

ŻYMAŃCZYK-DUDA, E. et al. Stereochemical control of biocatalytic asymmetric reduction of diethyl 2-oxopropylphosphonate employing yeasts. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 690, n. 10, p. 2593-2596, 2005.

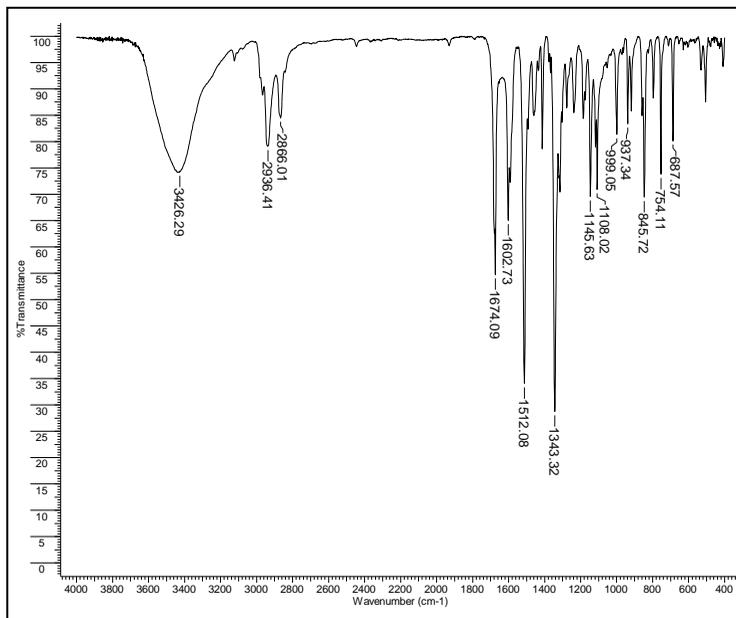


Figura 62. Espectro de IV de **22**. [Pastilha de KBr]

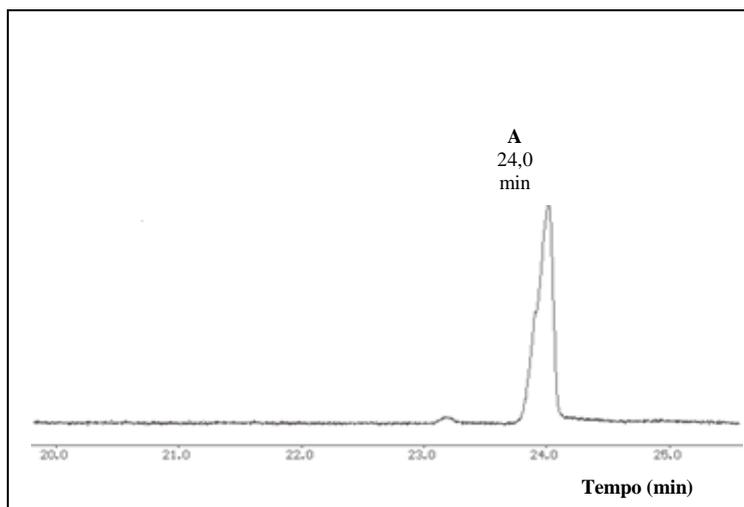


Figura 63. Cromatograma de CG-quiral de **22**. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.3.]

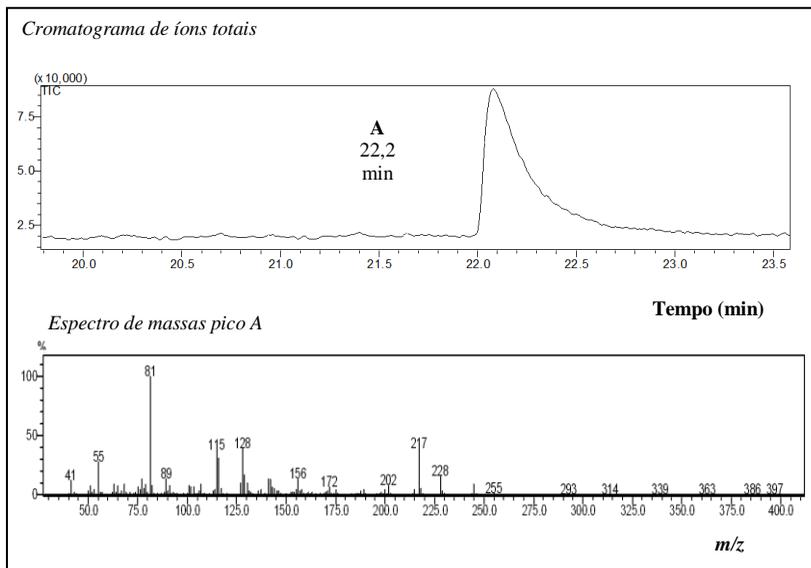
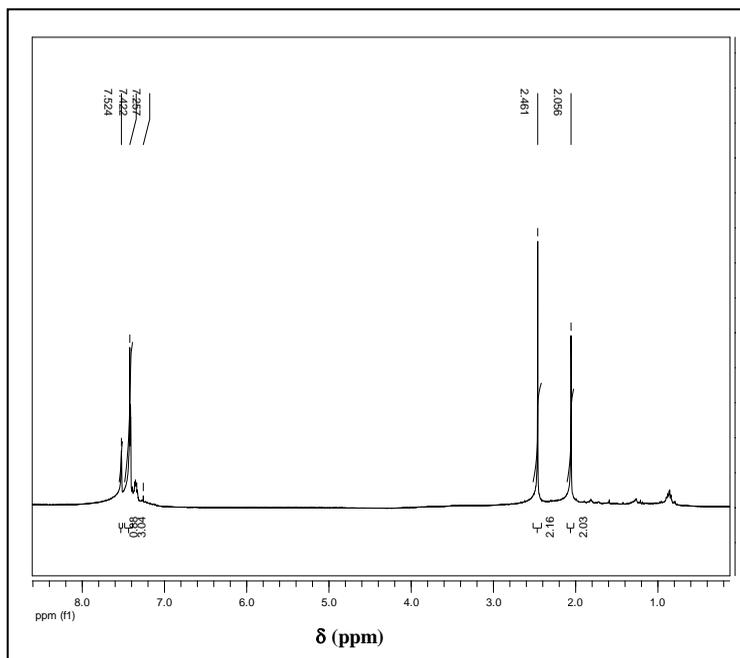
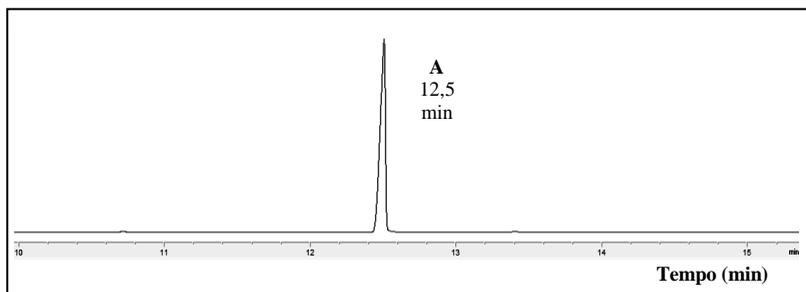
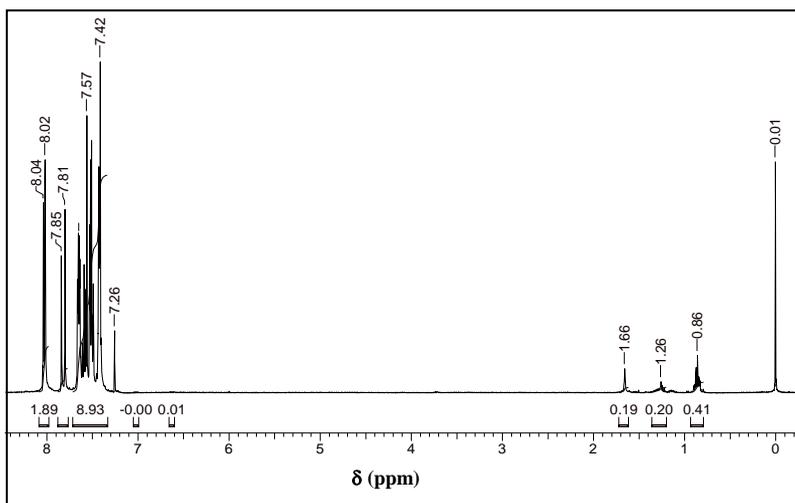


Figura 64. Cromatograma de íons totais e espectro de massas de **22** (pico A). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.3.]

A.1.2. (3E)-3-Metil-4-fenil-3-buten-2-ona **23**Figura 65. Espectro de RMN de ^1H de **23**. [CDCl_3 , 400 MHz]Figura 66. Cromatograma de CG-quiral de **23**. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.4.]

A.1.3. (2E)-1,3-Difenil-2-propen-1-ona **24**Figura 67. Espectro de RMN de ^1H de **24**. [CDCl_3 , 400 MHz]

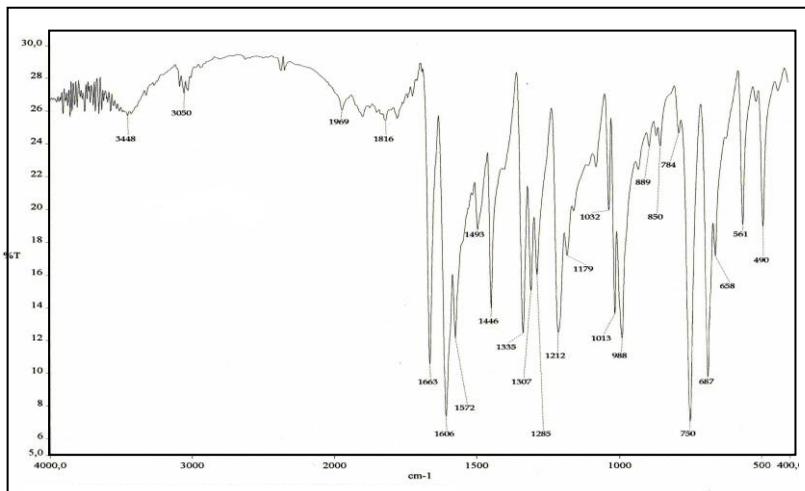


Figura 68. Espectro de IV de **24**. [Pastilha de KBr]

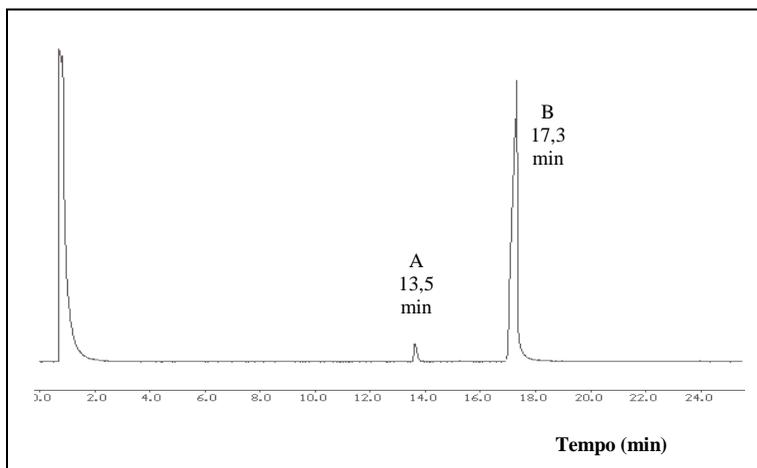


Figura 69. Cromatograma de CG-quiral de **24**. Compostos: (*Z*)-**24** (pico A) e (*E*)-**24** (pico B). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.5.]

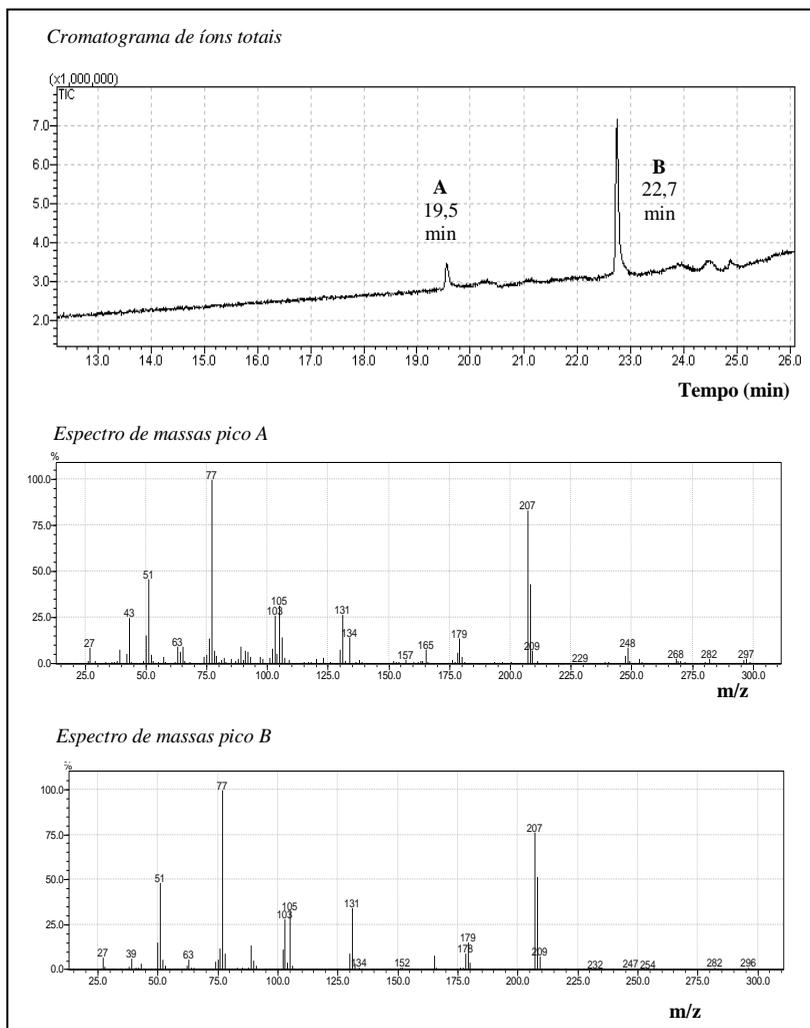


Figura 70. Cromatograma de íons totais e espectro de massas de **24**. Compostos: (*Z*)-**24** (pico A) e (*E*)-**24** (pico B). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.5.]

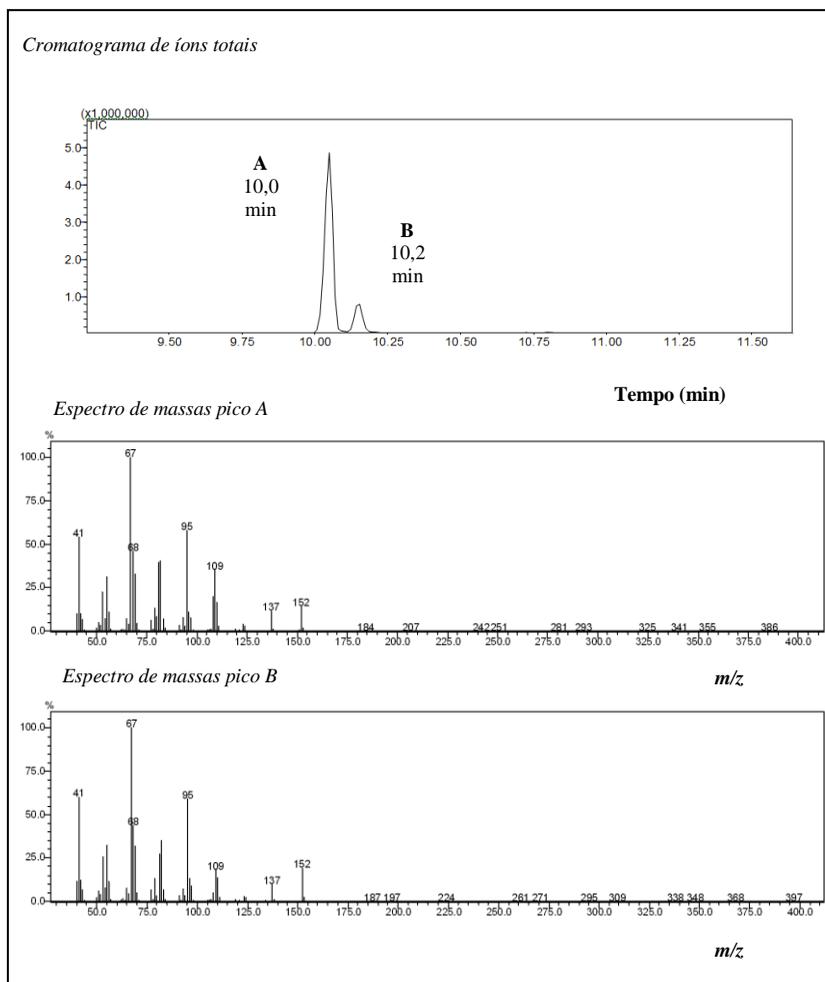


Figura 73. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com zinco metálico. Compostos: (1*S*,4*S*)-**10** (pico A) e (1*R*,4*S*)-**10** (pico B). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.2.]

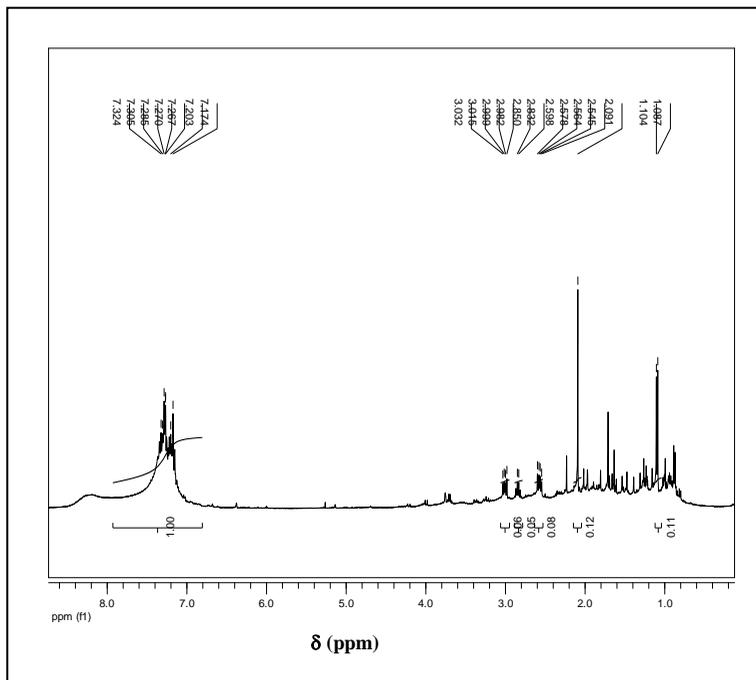
A.3. PREPARAÇÃO DA (3*R*,5)-3-METIL-4-FENIL-2-BUTANONA **34**

Figura 74. Espectro de RMN de ^1H de **34**. [CDCl_3 , 400 MHz]

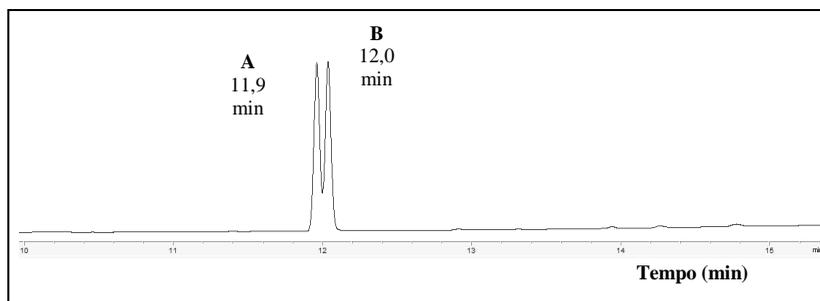
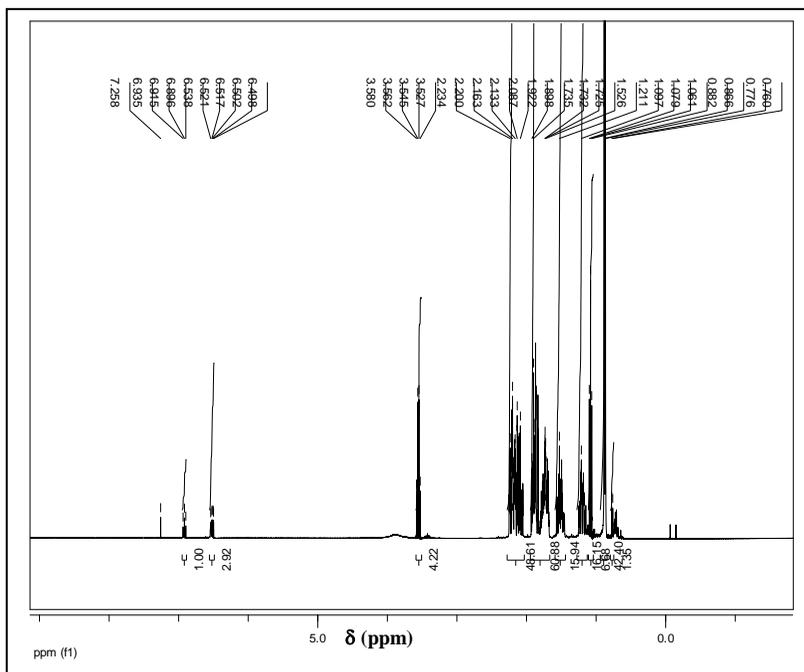


Figura 75. Cromatograma de CG-quiral de **34**. Compostos: (3*R*)-**34** (pico A) e (3*S*)-**34** (pico B). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.4.]

A.4. PREPARAÇÃO DA 3-METIL-CICLO-HEXANONA **36**Figura 76. Espectro de RMN de ^1H de **36**. [CDCl_3 , 400 MHz]

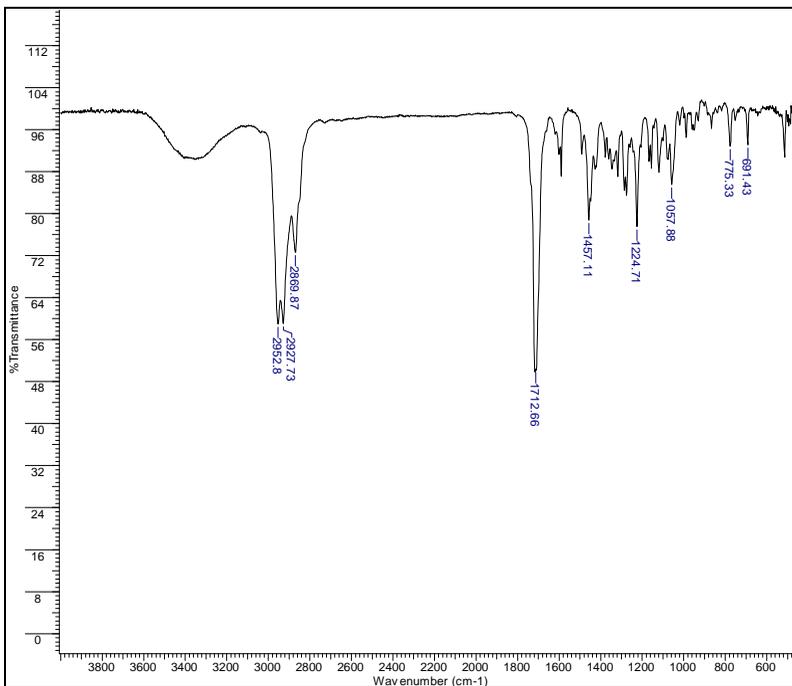


Figura 77. Espectro de IV de **36**. [Filme]

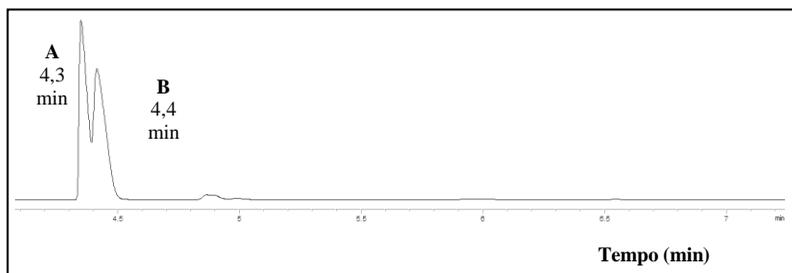


Figura 78. Cromatograma de CG-quiral de **36**. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.6.]

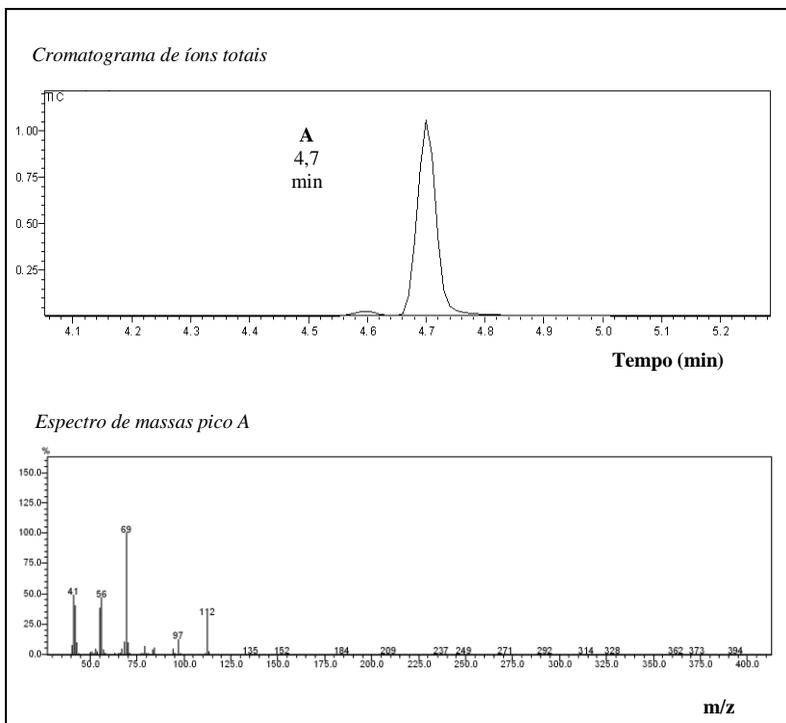


Figura 79. Cromatograma de íons totais e espectro de massas de **36**. [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.6.]

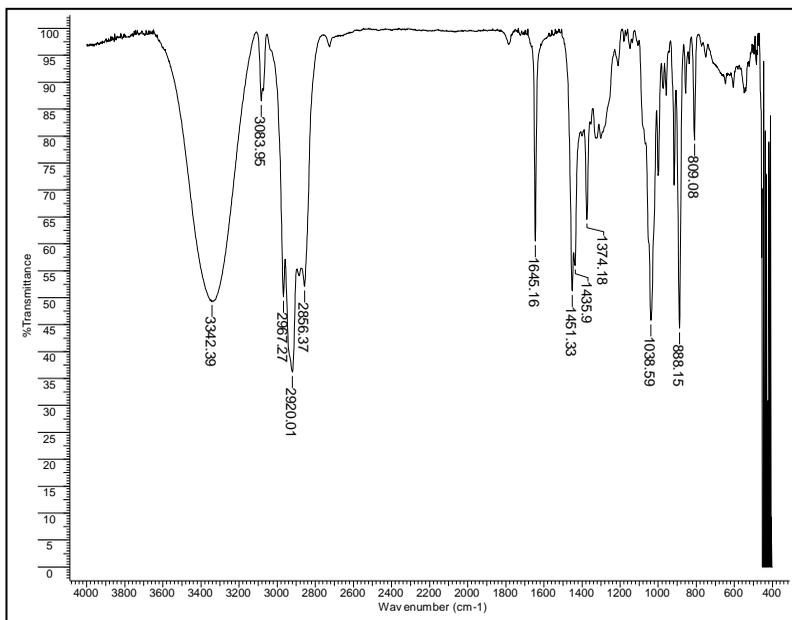


Figura 81. Espectro de IV dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com NaBH_4 . [Filme]

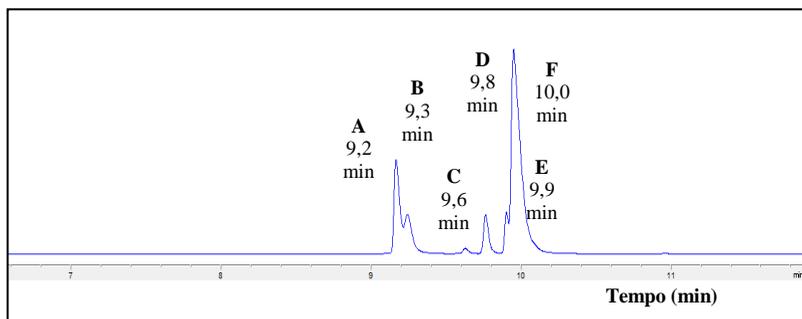


Figura 82. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com NaBH_4 . [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.2.]

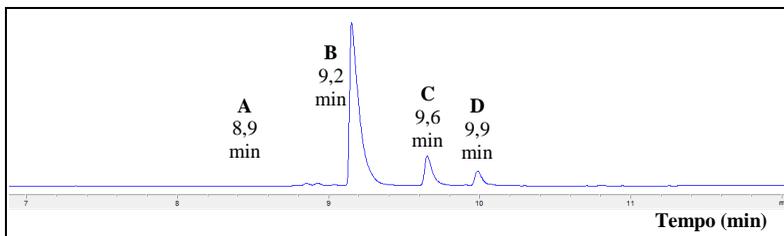


Figura 83. Cromatograma de CG-quiral de **12** (mistura de diastereoisômeros). Compostos: (1*S*,2*R*,4*S*)-**12** (pico A), (1*S*,2*S*,4*S*)-**12** (pico B), (1*R*,2*S*,4*S*)-**12** (pico C) e (1*R*,2*R*,4*S*)-**12** (pico D). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.2.]

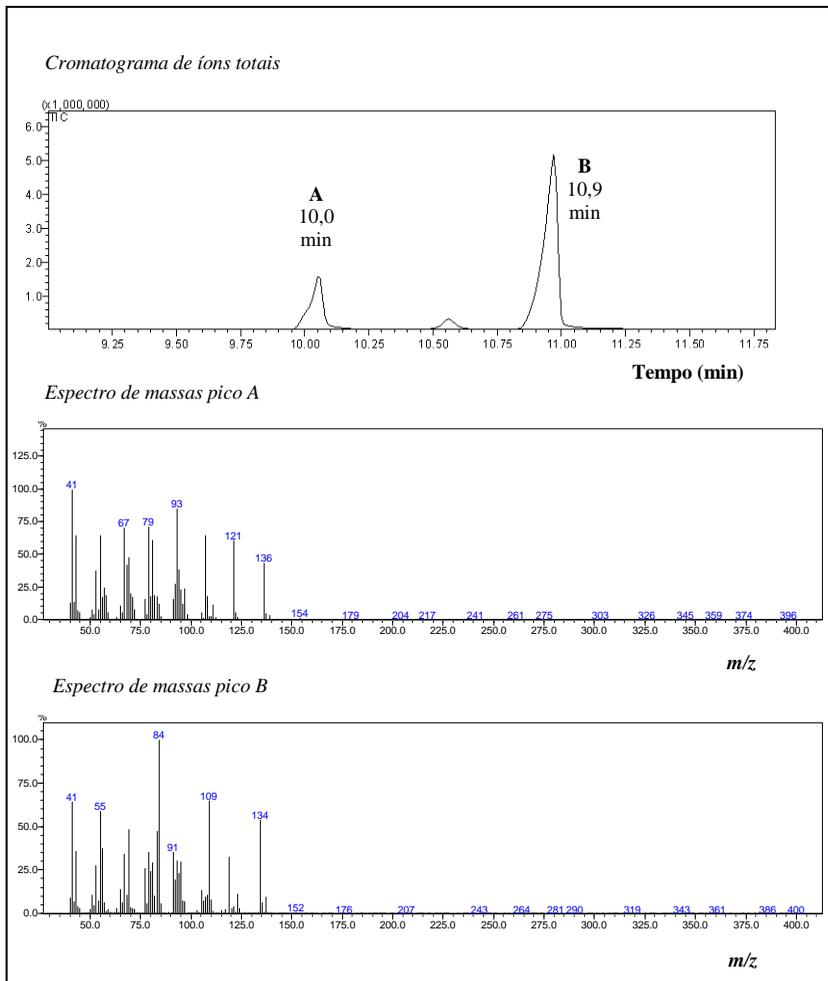
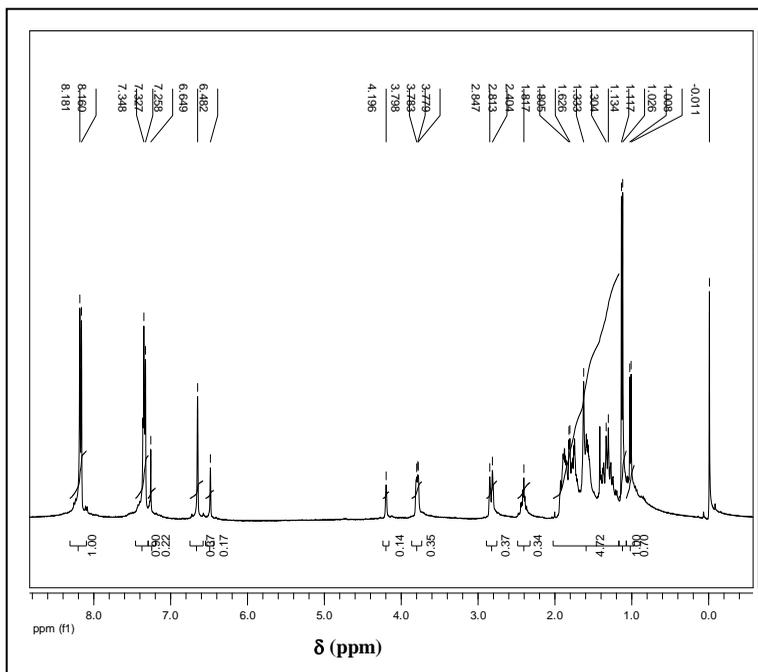


Figura 84. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com NaBH_4 . Compostos: **12** (pico A) e **30** (pico B). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.2.]

A.5.2. (1*R,S*)-(6*E*)-2-Metil-6-[(4-nitrofenil)metileno]-ciclo-hexanol **26**Figura 85. Espectro de RMN de ^1H de **26**. [CDCl_3 , 400 MHz]

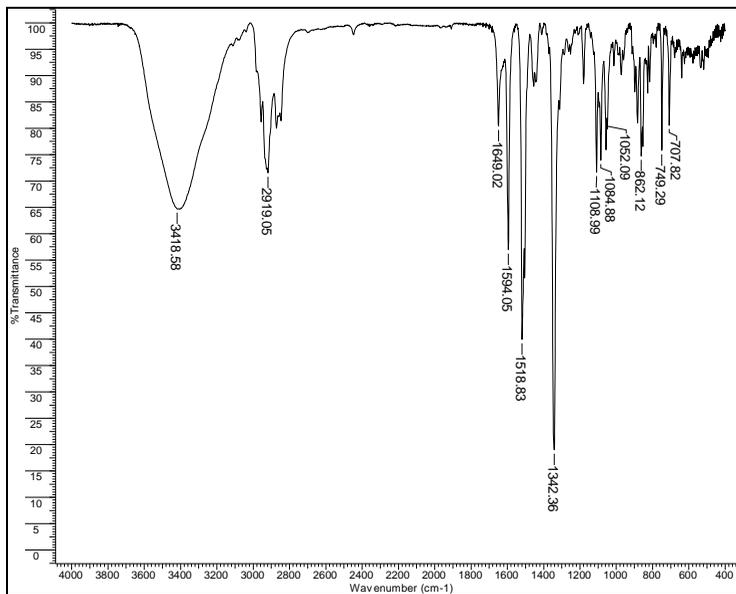


Figura 86. Espectro de IV de **26**. [Filme]

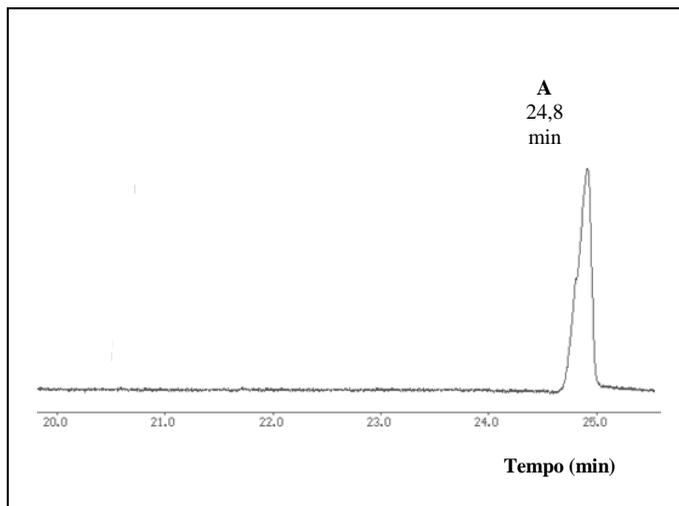
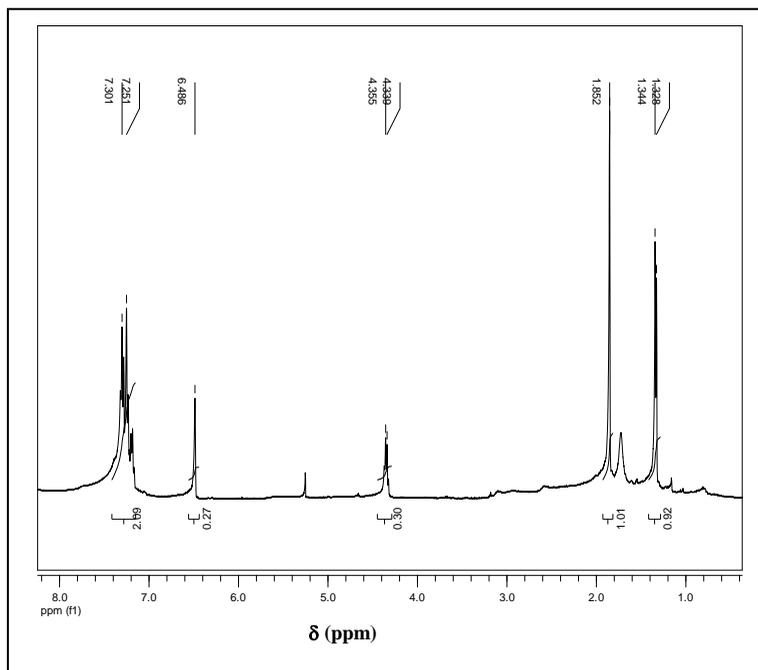
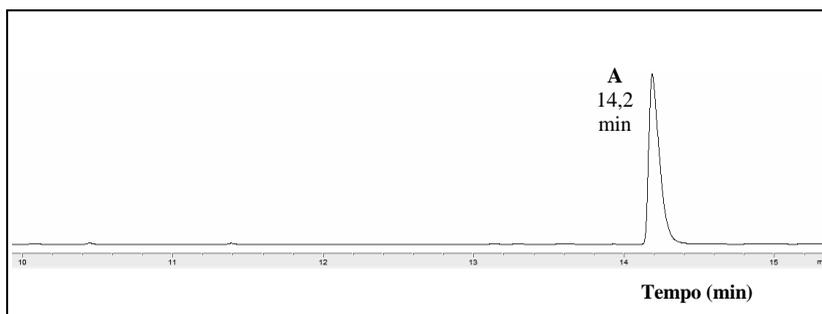


Figura 87. Cromatograma de CG-quiral de **26**. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.3.]

A.5.3. (1*R,S*)-(3*E*)-3-Metil-4-fenil-3-buten-2-ol **27**Figura 88. Espectro de RMN de ^1H de **27**. [CDCl_3 , 400 MHz]Figura 89. Cromatograma de CG-quiral de **27**. [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.4.]

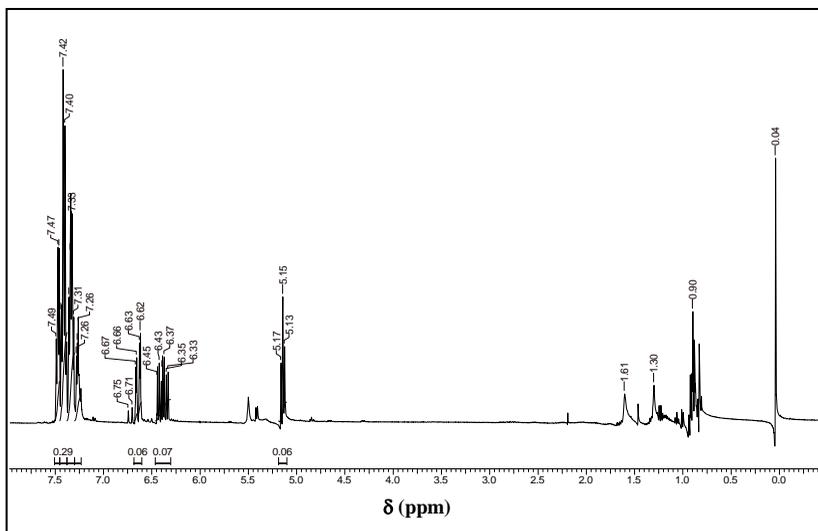
A.5.4. (1*R,S*)-(2*E*)-1,3-Difenil-2-propen-1-ol **28**

Figura 90. Espectro de RMN de ^1H de **28**. [CDCl_3 , 400 MHz]

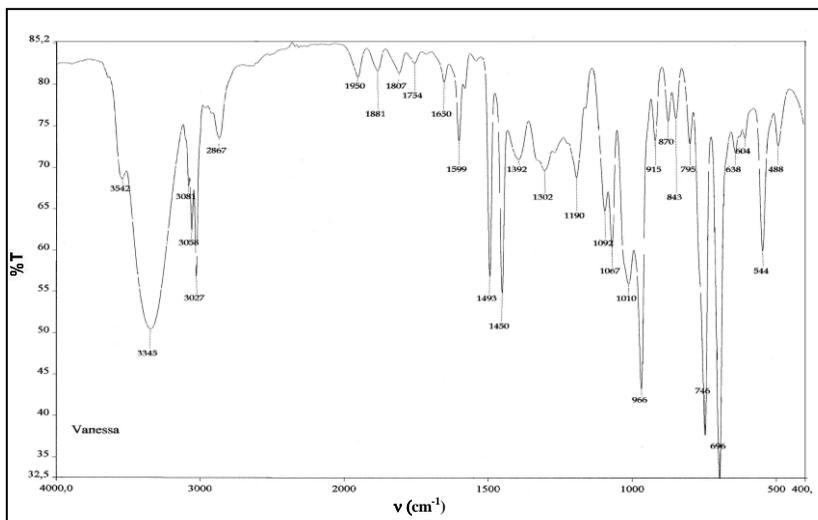


Figura 91. Espectro de IV de **28**. [Pastilha de KBr]

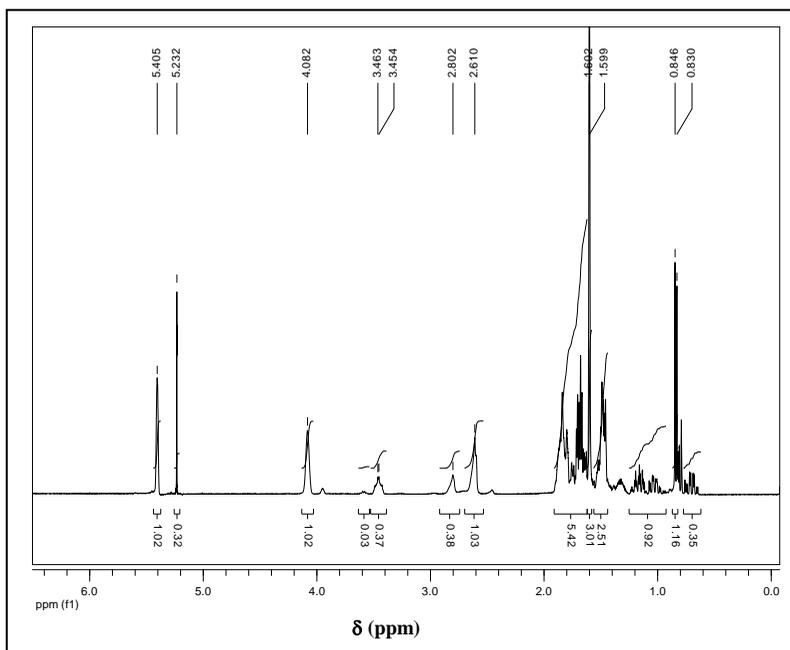
A.5.5. (1*R*,*S*)-3-Metil-2-ciclo-hexen-1-ol **31**

Figura 92. Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com NaBH_4 . [CDCl_3 , 400 MHz]

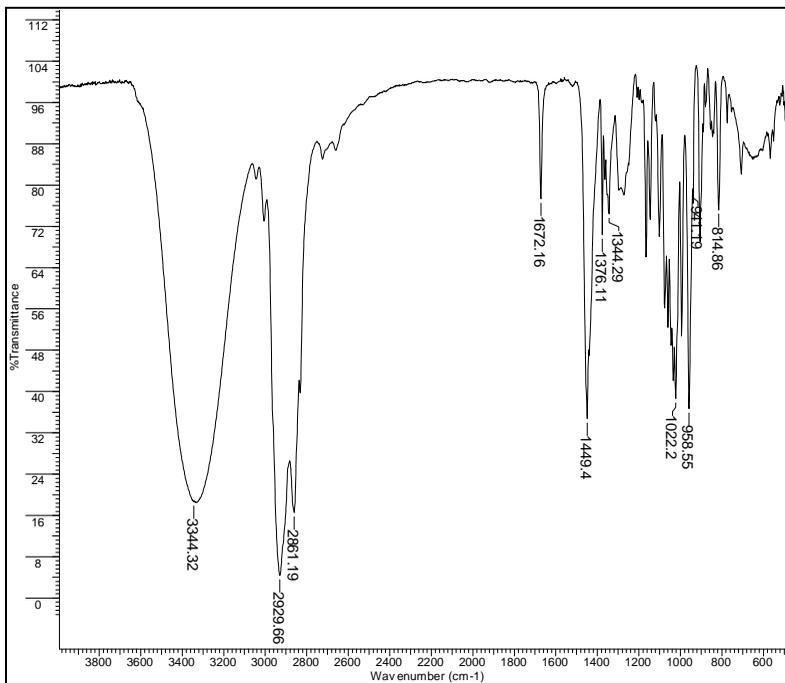


Figura 93. Espectro de IV dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com NaBH_4 . [Filme]

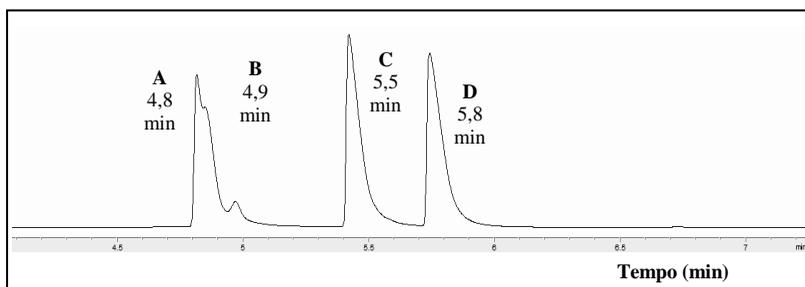


Figura 94. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com NaBH_4 . Compostos: **37** (picos A e B) e **31** (picos C e D). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.6.]

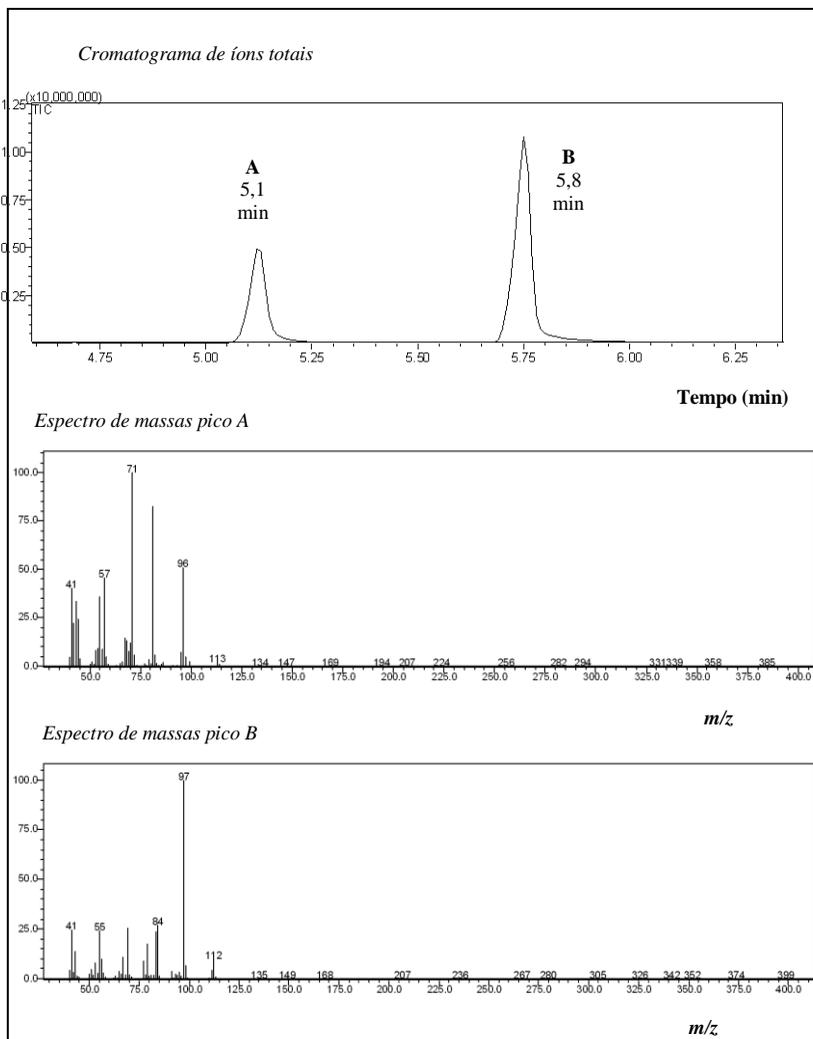


Figura 95. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com NaBH_4 . Compostos: **37** (Pico A) e **31** (pico B). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.6.]

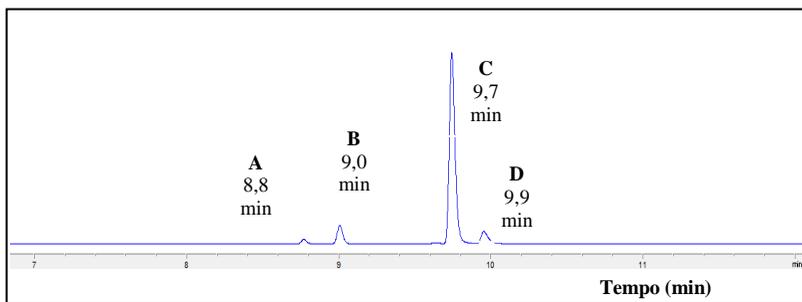
A.6. REDUÇÃO VIA ENZIMÁTICA DE **8**, **22**, **23**, **24** E **25**.A.6.1 Redução de **8** com FP

Figura 96. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com FP. Compostos: **10** (picos A e B), **8** (pico C) e **12** (pico D). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.2.]

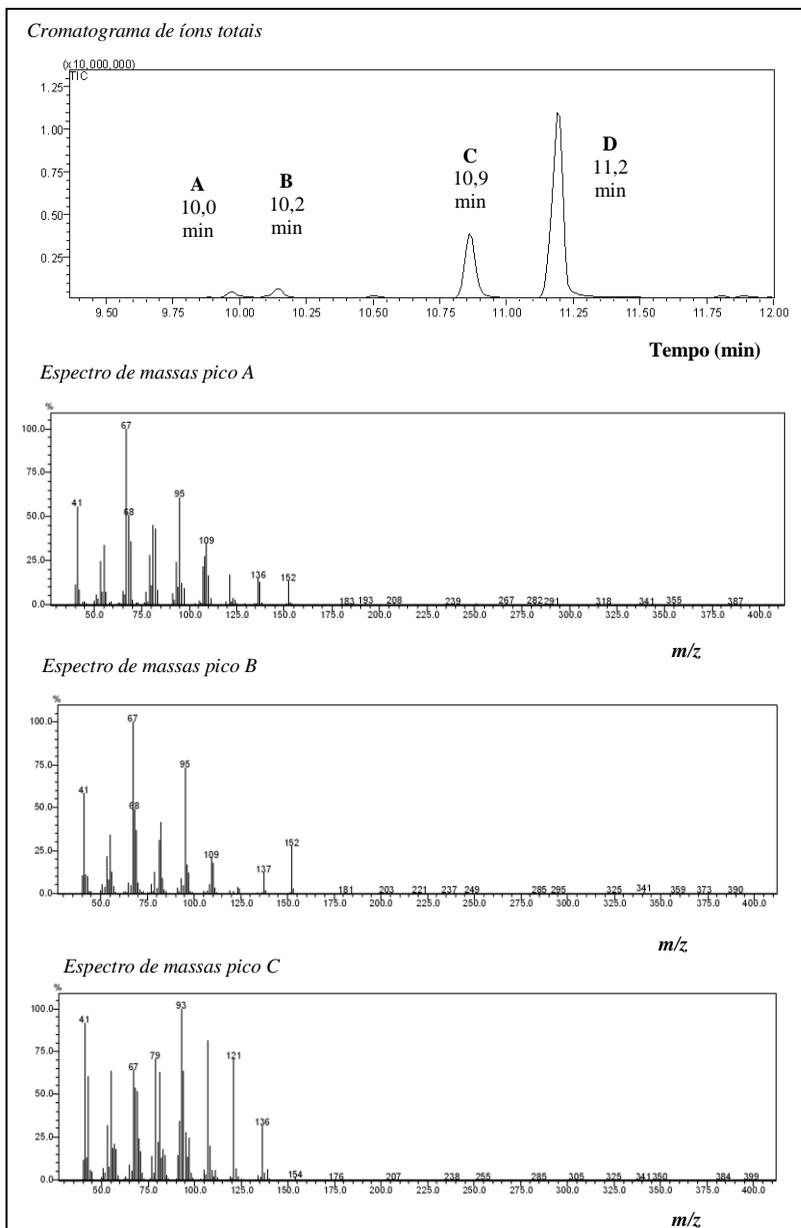


Figura 97. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com FP. Compostos: **10** (picos A e B) e **12** (pico C). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.2.]

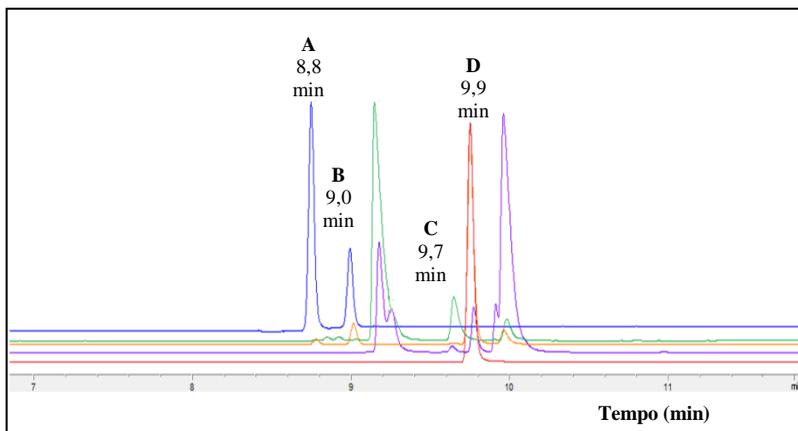


Figura 98. Sobreposição dos cromatogramas dos produtos obtidos na reação de redução de **8** com zinco metálico (azul), reação de redução de **8** com NaBH_4 (lilás), biotransformação de **8** mediada por FP (laranja), mistura dos 4 diastereoisômeros **12** (verde) e substrato **8** (vermelho). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.2.]

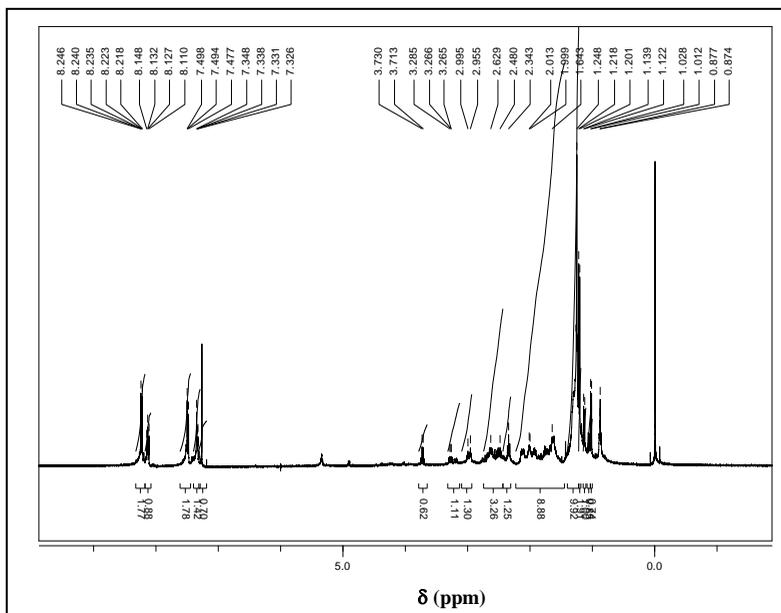
A.6.2 Redução de **22** com FP

Figura 99. Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na reação de redução de **22** com FP. [CDCl_3 , 400 MHz]

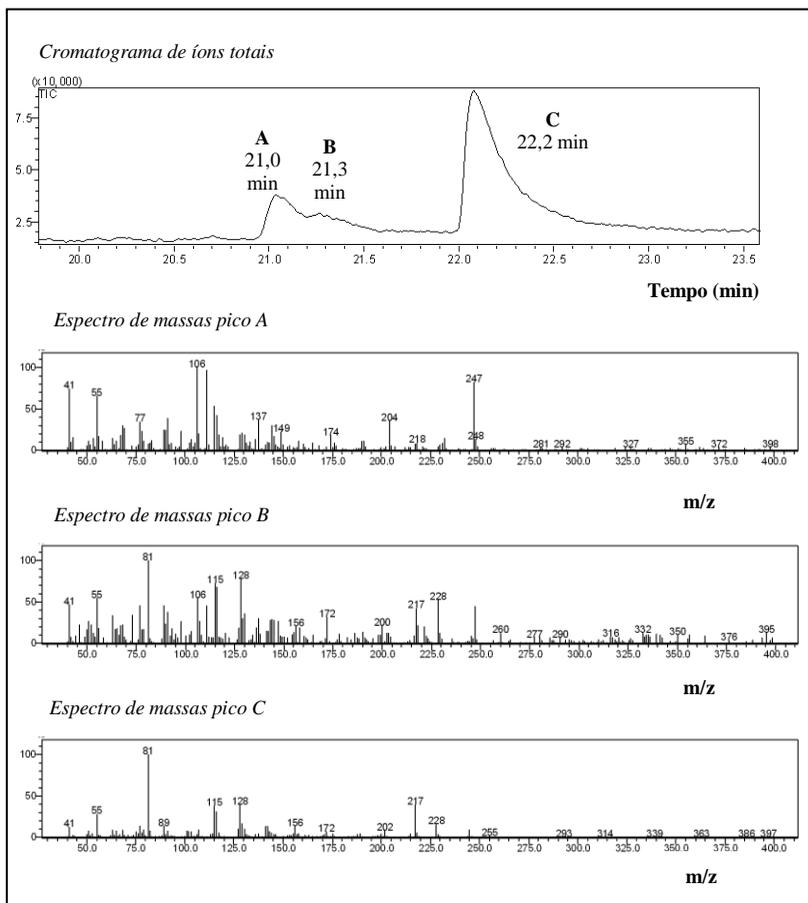


Figura 100. Cromatograma de íons totais e espectro de massas dos produtos obtidos na reação de redução de **22** com FP. Compostos: **33** (pico A), **32** (pico B) e **22** (pico C). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.3.]

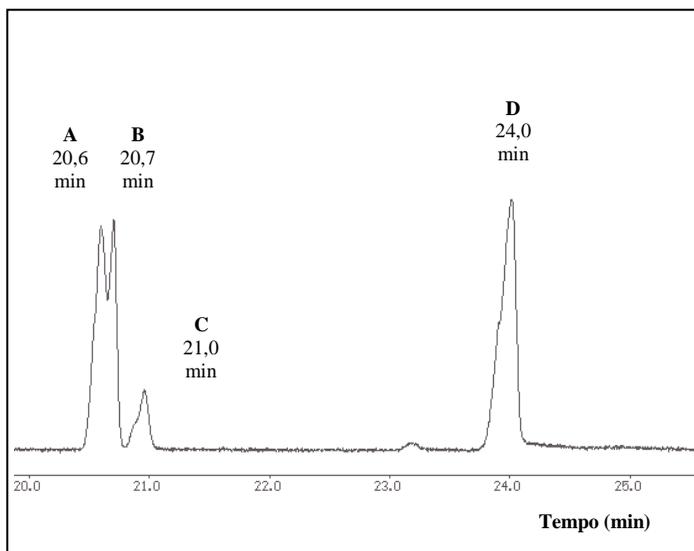


Figura 101. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **22** com FP. Compostos: **33** (picos A e B), **32** (pico C) e **22** (pico D). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.3.]

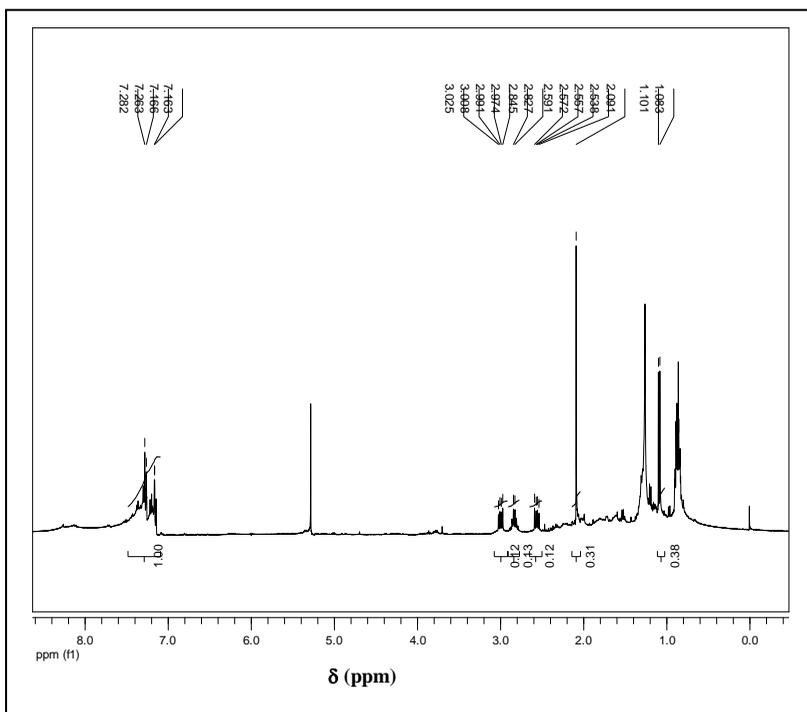
A.6.3. Redução de **23** com FP

Figura 102. Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na reação de redução de **23** com FP. [CDCl_3 , 400 MHz]

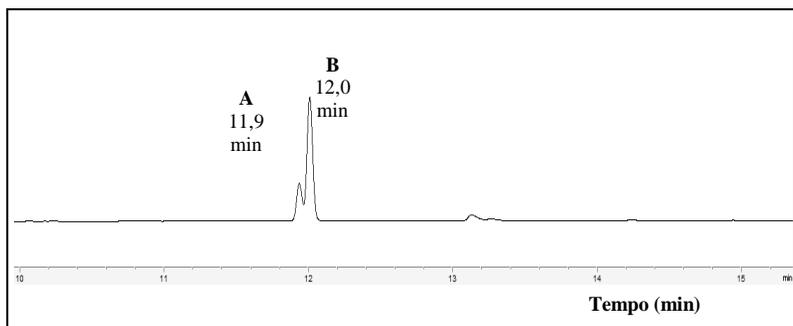


Figura 103. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **23** com FP. Composto: **34** (picos A e B). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.4.]

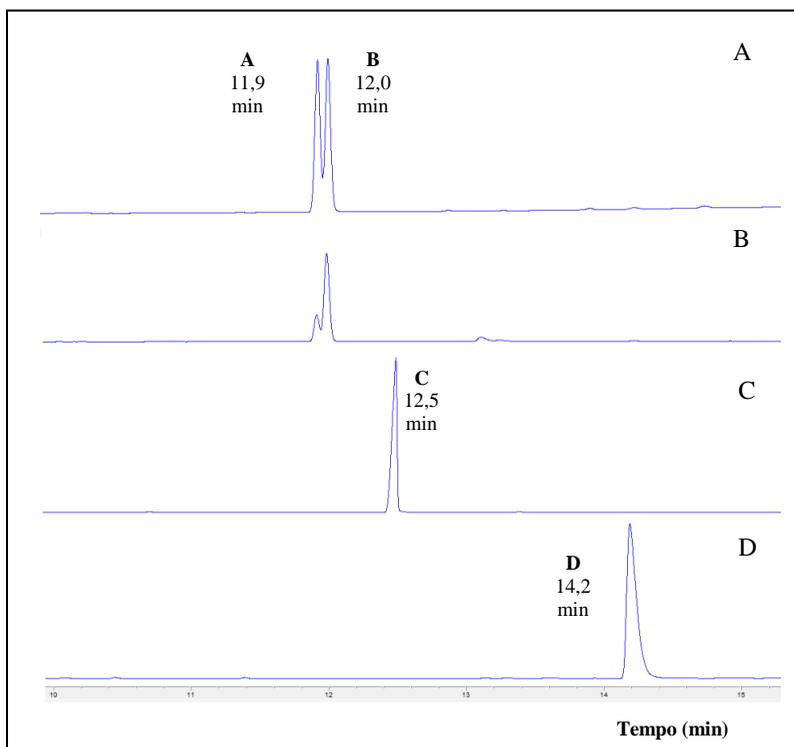


Figura 104. Sobreposição dos cromatogramas dos produtos obtidos na reação de redução de **23** com zinco metálico (A), biotransformação de **23** mediada por FP (B), substrato **23** (C) e reação de redução de **23** com NaBH_4 (D). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.4.]

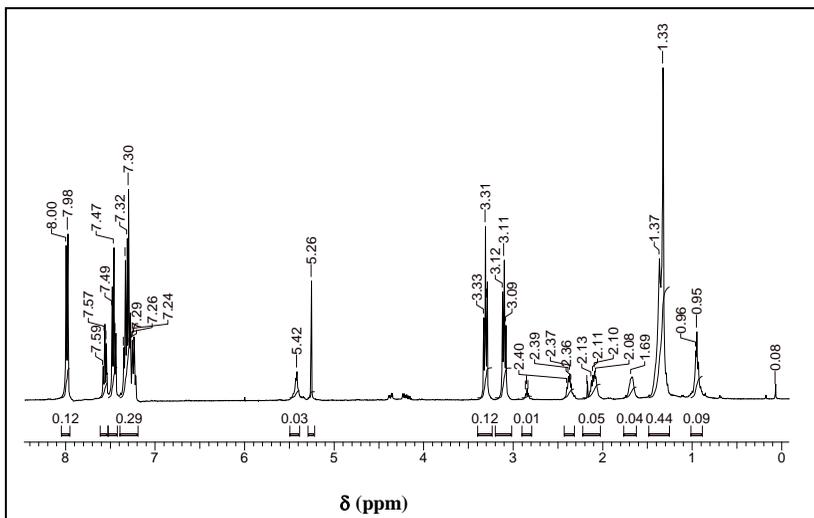
A.6.4. Redução de **24** com FP

Figura 105. Espectro de RMN de ^1H do produto obtido na reação de redução de **24** com FP. [CDCl_3 , 400MHz]

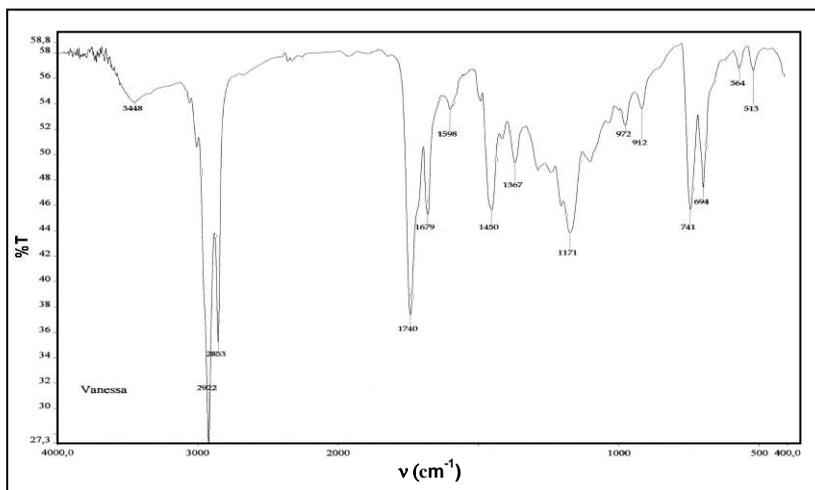


Figura 106. Espectro de IV do produto obtido na reação de redução de **24** com FP. [pastilha de KBr]

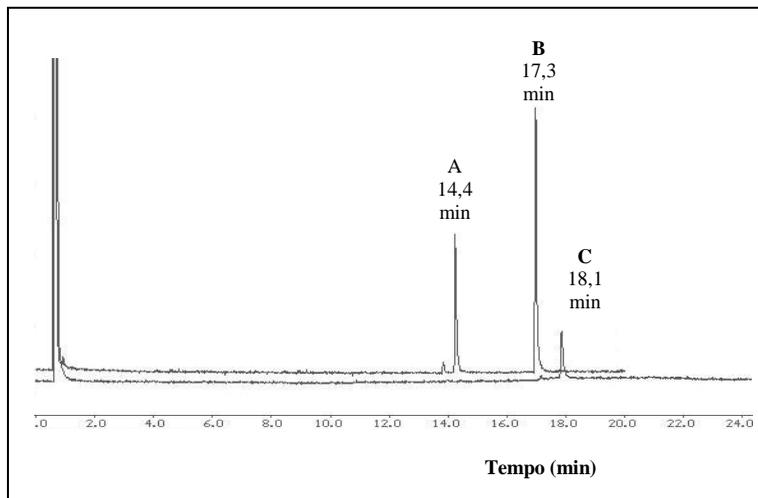


Figura 107. Sobreposição dos cromatogramas de **24** (pico B), do álcool **28** (pico C) e do produto da reação biocatalisada **35** (pico A). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.5.]

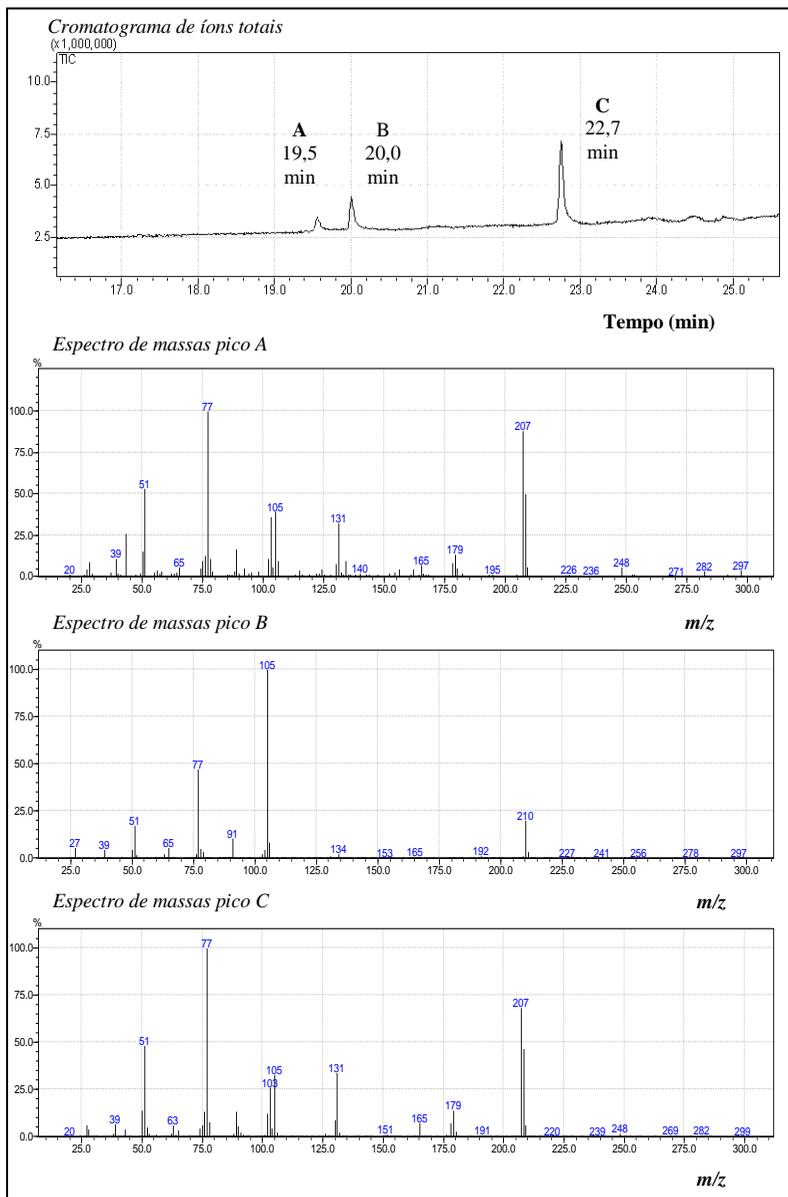


Figura 108. Cromatograma e espectro de massas do produto obtido na reação de redução de **24** com FP. Compostos: (*Z*)-**24** (pico A), **35** (pico B) e (*E*)-**24** (pico C). [Condições de programação de CG/EM: descritas no item 3.12.5.]

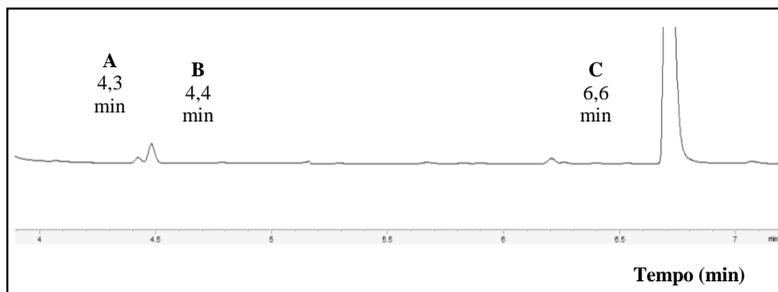
A.6.5. Redução de **25** com FP

Figura 109. Cromatograma de CG-quiral dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com FP. Compostos: **36** (picos A e B) e **25** (pico C). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.6.]

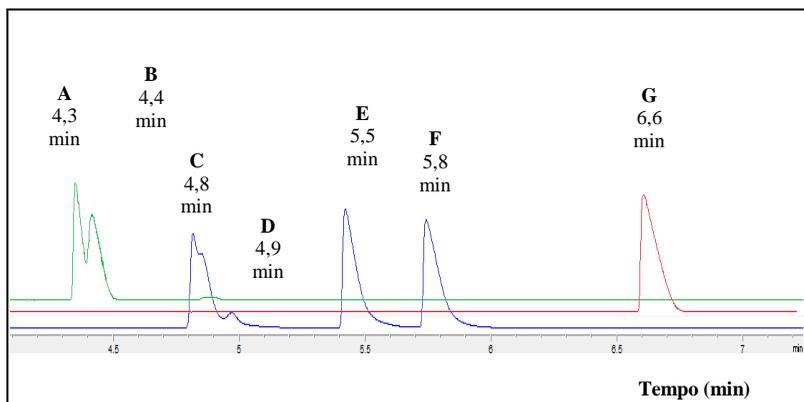


Figura 110. Sobreposição dos cromatogramas dos produtos obtidos na reação de redução de **25** com H_2 , Pd/C (verde), reação de redução de **25** com $NaBH_4$ (azul) e substrato **25** (vermelho). [Condições de programação de CG-quiral: descritas no item 3.12.6.]

APÊNDICE B – PRODUÇÃO ACADÊMICA DURANTE O PERÍODO DE 2009 - 2013

Artigos completos publicados em periódicos

1. Silva, Vanessa Dutra, Stambuk, Boris Ugarte, Nascimento, Maria da Graça. Asymmetric reduction of (4*R*)-(-)-carvone catalyzed by Baker's yeast in aqueous mono- and biphasic systems. *Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic*, v. 77, p. 98-104, 2012.
2. Hoffmann, Isabel, Silva, Vanessa Dutra, Nascimento, Maria da Graça. Enantioselective Resolution of (*R,S*)-1-Phenylethanol Catalyzed by Lipases Immobilized in Starch Films. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 1559-1567, 2011.
3. Silva, Vanessa Dutra, Stambuk, Boris Ugarte, Nascimento, Maria da Graça. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. *Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic*, v. 63, p. 157-163, 2010.

Capítulo de livro

1. Nascimento, Maria da Graça, Silva, Vanessa Dutra, Henriques, Rosana Oliveira, Ledra, Carlos Geovanni Alves, Sebrão, Damianni. Imobilização de enzimas em materiais poliméricos: Aplicações sintéticas em meio orgânico. *Biocatálise e Biotransformação Fundamentos e Aplicações*, 2ª Série de textos do Workshop de Biocatálise e Biotransformação. Cap.2. pag. 45-83.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos)

1. Silva, Vanessa Dutra, Carletto, Jeferson Schneider, Carasek, Eduardo, Prompt, Alice Heidrich, Stambuk, Boris Ugarte, Nascimento, Maria da Graça. Biotransformação da (4*S*)-(+)-carvona mediada por leveduras em meio aquoso: Novo método de extração. VI Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2012, Fortaleza, CE.
2. Silva, Vanessa Dutra, Stambuk, Boris Ugarte, Nascimento, Maria da Graça. Biotransformação da (2*E*)-6-(4-nitrobenziledene)-2-metilciclo-hexen-1-ona mediada por fermento de pão em sistema bifásico In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis, SC.

3. Silva, Vanessa Dutra, Stambuk, Boris Ugarte, Nascimento, Maria da Graça. Influência da adição de co-solvente na biotransformação da (*R*)-carvona mediada por fermento de pão In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis, SC.
4. Schaefer, César Agostinho, Silva, Vanessa Dutra, Nascimento, Maria da Graça. Influência do meio reacional na biotransformação da (*1E,4E*)-1,5-(4-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-ona mediada por fermento de pão In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis, SC.
5. Schaefer, César Agostinho, Silva, Vanessa Dutra, Stambuk, Boris Ugarte, Nascimento, Maria da Graça. Biotransformação da (*1E,4E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada por leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* In: V Workshop de Biocatálise e biotransformação, 2010, Maringá, PR.
6. Schaefer, César Agostinho, Silva, Vanessa Dutra, Stambuk, Boris Ugarte, Nascimento, Maria da Graça. Biotransformação da (*2E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por leveduras em sistema bifásico In: XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010, Curitiba, PR.
7. Schaefer, César Agostinho, Silva, Vanessa Dutra, Nascimento, Maria da Graça. Efeito da adição de co-solvente na biotransformação da (*1E,4E*)-1,5-(4-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-ona mediada por fermento de pão In: XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010, Curitiba, PR.
8. Hoffmann, Isabel, Silva, Vanessa Dutra, Nascimento, Maria da Graça, Moecke, Elisa. H. S. Resolução do (*R,S*)-1-feniletanol catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em filmes de amido de gengibre In: V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2010, Maringá, PR.
9. Maguerroski, Kamila S, Silva, Vanessa Dutra, Nascimento, Maria da Graça. Bio-hidrogenação da 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* In: XVII Encontro de Química da Região Sul, 2009, Rio Grande, RS.
10. Mundstock, Flávia. L. S., Silva, Vanessa Dutra, Nascimento, Maria da Graça. Biohidrogenação quimiosseletiva da chalcona (*2E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona In: 10 Congresso Brasileiro de Polímeros, 2009, Foz do Iguaçu, PR.
11. Silva, Vanessa Dutra Stambuk, Boris Ugarte, Nascimento, Maria da Graça. Biotransformação da 1,3-difenil-2-propen-1-ona mediada por leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* In: XVII Encontro de Química da

Região Sul, 2009, Rio Grande, RS.

12. Queiroz, Gustavo, Silva Vanessa Dutra, Nascimento, Maria da Graça. Catalise heterogênea: uma abordagem alternativa para experimentos em química orgânica In: XVII Encontro de Química da Região Sul, 2009, Rio Grande, RS.

13. Chiaradia, L. D., Mascarello, A, Silva Vanessa Dutra,, Salvatori, M. P., Grandi, B. S., Stumpf, T. R., Cordeiro, M. N. S., Nascimento, Maria da Graça, Yunes, R. A., Nunes, R. J. Influência da insaturação no efeito antimicrobiana da (*E*)-chalcona e da 1,3-difenilpropanona In: 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza, CE.