



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Tese de Doutorado**

**UTILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* NA  
REDUÇÃO DE SUBSTRATOS CARBONÍLICOS**

**Doutoranda: Patrícia Melchionna Albuquerque**

**Orientadora: Dra. Maria da Graça Nascimento**

**Co-orientador: Dr. Boris Ugarte Stambuk**

**Florianópolis, maio de 2007.**

*Para o Jú.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Química pela oportunidade de realizar este trabalho, bem como pelo espaço físico e infraestrutura cedidos, fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Às entidades de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora, Prof. José Augusto R. Rodrigues, Prof. Hernán Terenzi, Prof. Ricardo J. Nunes, Prof. Marcus M. Sá, e em especial à Profa Nádia Krieger, relatora deste trabalho.

Aos meus orientadores, Profa. Maria da Graça Nascimento e Prof. Boris U. Stambuk pela confiança, incentivo e amizade durante estes anos de doutorado.

Aos químicos que trabalharam diretamente na realização deste projeto durante sua iniciação científica, Maria Alice, Alexandre, Vanessa e Aline.

Aos meus queridos colegas de laboratório, doutorandos Marcelo, Damianni, Cristiane, Thiago e Fernanda, minha segunda família.

Aos bolsistas de iniciação científica do laboratório de Biocatálise, Thiago, Isabel e Rosana.

Aos amigos que encontrei durante estes quatro anos de convivência no Departamento de Química.

Aos professores Rosendo A. Yunes, Hernán Terenzi e Dino Zanetti por permitirem a utilização de equipamentos em seus laboratórios.

Aos secretários do Curso de Pós-Graduação em Química, Graça e Jadir, pelos serviços prestados.

À Central de Análises e em especial ao M.Sc. Ângelo Ruzza, pelas análises de HPLC.

Às amadas amigas Sandra, Rosane e Tamara, pela força nos momentos difíceis, pelos sorrisos nas horas alegres.

À minha família, pela confiança, força e amor.

Ao meu lindo Jú, pelo carinho, incentivo, companheirismo e cumplicidade. Por ter me encontrado ao longo deste caminho e compartilhar os meus sonhos. Te amo.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Considerações Gerais.....	18
1.2 Biocatalisadores.....	20
1.3 A Biocatálise e a Obtenção de Compostos Opticamente Ativos.....	24
1.4 Biocatalisadores Envolvidos em Reações de Redução.....	28
1.5 Redução de Carbonilas por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	38
1.6 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	49
1.7 Reações de Redução em Solvente Orgânico.....	52
1.8 Imobilização do Biocatalisador.....	55
1.9 Efeito Protetor da Trealose.....	61
1.10 Métodos Analíticos para a Determinação da Enantiosseletividade.....	64
1.10.1 Métodos Polarimétricos.....	64
1.10.2 Cromatografia Gasosa – CG.....	66
1.10.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....	67
2 OBJETIVOS.....	69
2.1 Geral.....	69
2.2 Específicos.....	69
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	70
3.1 Reagentes.....	70
3.2 Equipamentos.....	70
3.3 Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	71
3.4 Condições de Cultivo.....	71
3.5 Dosagem das Fontes de Carbono e dos Dissacarídeos.....	72
3.6 Imobilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em Mont-K10.....	74
3.7 Substratos e Padrões Racêmicos.....	75
3.8 Reações de Biorredução.....	79
3.9 Determinação da Conversão e do Excesso Enantiomérico.....	79
3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	81
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4.1 Estudos com a Cepa de Laboratório W303-1A.....	82
4.1.1 Curvas de crescimento.....	82
4.1.2 Efeito da adição de trealose.....	86
4.1.3 Efeito da adição de sacarose.....	92
4.1.4 Efeito protetor da imobilização.....	100
4.1.5 Redução de outros substratos carbonílicos.....	103

4.2 Estudos com a Cepa de Panificação L70.....	106
4.2.1 Curvas de crescimento.....	106
4.2.2 Redução de substratos carbonílicos em <i>n</i> -hexano.....	108
4.2.3 Efeito protetor da imobilização.....	113
4.2.4 Experimentos em sistema bifásico.....	117
4.3 Estudos com o Fermento de Pão Comercial.....	118
4.3.1 Reações em <i>n</i> -hexano.....	119
4.3.2 Estudos com o Fermento de Pão Imobilizado.....	125
4.3.3. Reações em sistema bifásico.....	132
5 CONCLUSÕES.....	136
5.1 Cepa W303-1A.....	136
5.2 Cepa L70.....	137
5.3 Fermento de Pão Comercial.....	138
5.4 Redução de $\beta$ -cetoésteres.....	140
5.5 Redução de Acetofenonas.....	140
5.6 Considerações Finais.....	141
6 PERSPECTIVAS.....	142
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
8 PRODUÇÃO ACADÊMICA (2003-2007).....	160
8.1 Artigos.....	160
8.2. Trabalhos em Anais de Congressos.....	160

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade inicial da reação catalisada por enzimas. (A) Gráfico da velocidade inicial da reação <i>versus</i> concentração de substrato. (B) Relação de Lineweaver-Burk.....	22
<b>Figura 2.</b> Reação de redução do ácido 2-oxo-4-fenil-butírico (1).....	23
<b>Figura 3.</b> Exemplos de pares de enantiômeros com atividades biológicas diferentes: (A) carvona e (B) etambutol.....	25
<b>Figura 4.</b> Estrutura da L-carnitina (7) e do Taxol® (8).....	26
<b>Figura 5.</b> Estrutura dos cofatores NAD <sup>+</sup> (9) e NADP <sup>+</sup> (10).....	29
<b>Figura 6.</b> Semelhança entre as estruturas do acetoacetato (11) e piruvato (12) .....	30
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do possível mecanismo de ação da (A) álcool desidrogenase e da (B) lactato desidrogenase na redução de β-cetoésteres.....	30
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática da estrutura tridimensional da unidade da L-lactato ferrocitocromo C oxidoreductase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
<b>Figura 9.</b> Mecanismo da redução do piruvato a L-lactato mediada pela L-lactato desidrogenase.....	33
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do sistema de biorredução com células íntegras de leveduras.....	33
<b>Figura 11.</b> Reduções de cetonas mediadas pelo fungo <i>Diplogelasinospora grovesii</i> .....	36
<b>Figura 12.</b> Biorredução da o-cloroacetofenona (17).....	37
<b>Figura 13.</b> Redução das acetofenonas nitro-substituídas (19, 20 e 21) e desracemização dos álcoois (RS)-1-(nitrofenil)etanol (23 e 24), mediadas por células íntegras de <i>Aspergillus terreus</i> .....	37
<b>Figura 14.</b> Redução de cetonas com NaBH <sub>4</sub> .....	38
<b>Figura 15.</b> Redução do acetoacetato de etila (25) produzindo o (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (26), material de partida para a síntese da (R)-(+)-recifeiolida (27) e do (S)-(+)-sulcatol (28).....	40
<b>Figura 16.</b> Redução da acetofenona (29) mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
<b>Figura 17.</b> Estereosseletividade na redução de carbonilas de cetonas. (A) enantiosseletividade e (B) diastereosseletividade.....	42
<b>Figura 18.</b> Redução do 2-cloroacetoacetato de etila (31) mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	44
<b>Figura 19.</b> Redução do biciclo[2,2,2]octano-2,6-diona (33) ao cetoálcool quiral (1R,4S,6S)-6-hidroxi-biciclo[2.2.2]octano-2-ona (34).....	45
<b>Figura 20.</b> Redução do 2-oxo-4-fenilbutirato de etila (35).....	46
<b>Figura 21.</b> Redução do 4-cloroacetoacetato de etila (37) e do benzoilacetato de	

etila (39).....	48
<b>Figura 22.</b> Substratos testados por Rotthaus e <i>col.</i> ....	53
<b>Figura 23.</b> Redução das $\beta$ - e $\gamma$ -nitroacetonas <b>44</b> e <b>45</b> , produzindo os álcoois quirais <b>46</b> e <b>47</b> .....	55
<b>Figura 24.</b> Métodos de imobilização de biocatalisadores.....	57
<b>Figura 25.</b> Estrutura da montmorilonita.....	58
<b>Figura 26.</b> Redução da 1-fenil-1,2-propanodiona ( <b>48</b> ) e produção do diol <b>49</b> ....	59
<b>Figura 27.</b> Redução da $\alpha$ -azidopropiofenona ( <b>50</b> ) mediada pelo fermento de pão imobilizado em montmorilonita K10.....	59
<b>Figura 28.</b> Reação de redução biocatalítica da $\alpha$ -cloroacetofenona ( <b>52</b> ) mediada pelo fermento de pão comercial.....	60
<b>Figura 29.</b> Estrutura da trealose.....	61
<b>Figura 30.</b> Curva de calibração utilizada para a quantificação da percentagem de sacarose.....	74
<b>Figura 31.</b> Imobilização do biocatalisador em montmorilonita K10.....	74
<b>Figura 32.</b> Estruturas dos substratos carbonílicos utilizados nas reações de biorredução.....	76
<b>Figura 33.</b> Cromatograma obtido por CGQ para uma alíquota de 48 h de reação de redução da $\alpha$ -cloroacetofenona ( <b>52</b> ) (A) com o sistema FP/T. O produto da biotransformação ( <i>R</i> )- <b>53</b> (C) está sobreposto com o padrão racêmico (B).....	81
<b>Figura 34.</b> Variação da concentração celular em função do tempo para o crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1A a 30°C em (A) glicose, (B) lactato ou (C) glicerol- etanol. Biomassa (■) e fonte de carbono (○)....	83
<b>Figura 35.</b> Redução biocatalítica do acetoacetato de etila ( <b>25</b> ).....	86
<b>Figura 36.</b> Conversões a ( <i>S</i> )-(+)-3-hidroxitbutanoato de etila ( <b>26</b> ) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1A cultivada em glicose (A), lactato (B), ou glicerol-etanol (C), e com adição das quantidades indicadas (mL) de solução de trealose a 10%: 0,8 (▲), 1,6 (○), 2,4 (●), ou de água: 0,8 (Δ) e 1,6 (▼).....	87
<b>Figura 37.</b> Redução biocatalítica da $\alpha$ -cloroacetofenona ( <b>52</b> ).....	89
<b>Figura 38.</b> Conversões a 2-cloro-1-feniletanol ( <b>53</b> ) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1A cultivada em glicose (A), lactato (B), ou glicerol- etanol (C), e com adição das quantidades indicadas (mL) de solução de trealose a 10%: 0,8 (▲), 1,6 (○), 2,4 (●), ou de água: 0,8 (Δ) e 1,6 (▼).....	91
<b>Figura 39.</b> Conversões a ( <i>S</i> )-(+)-3-hidroxitbutanoato de etila ( <b>26</b> ) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1A cultivada em glicose (A), lactato (B), ou glicerol-etanol (C), e com adição das quantidades indicadas (mL) de solução de sacarose a 10%: 0,8 (▲), 1,6 (○), 2,4 (●), ou de água: 0,8 (Δ) e 1,6 (▼).....	93
<b>Figura 40.</b> Cromatograma de CGQ para uma alíquota da reação de redução do	



- acetoacetato de etila (**25**) em *n*-hexano a 25°C com células cultivadas em glicerol-etanol e adição de 2,4 mL de sacarose a 10%, após 15 dias. O produto (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) foi obtido com 36% de conversão (ee > 99%).....94
- Figura 41.** Variações nas percentagens de sacarose (■) ou trealose (□) residual no meio reacional durante a biorredução do acetoacetato de etila (**25**) mediada por *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A pré-crescida em glicose (A), lactato (B) ou glicerol-etanol (C), e reações controle contendo sacarose (●) ou trealose (○).....96
- Figura 42.** Conversões a 2-cloro-1-feniletanol (**53**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A cultivada em glicose (A), lactato (B), ou glicerol-etanol (C), e com adição das quantidades indicadas (mL) de solução de sacarose a 10%: 0,8 (▲), 1,6 (○), 2,4 (●), ou com adição de água: 0,8 (Δ) e 1,6 (▼).....99
- Figura 43.** Conversões a (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A crescida em lactato (A) ou glicerol-etanol (B), imobilizada em Mont-K10, e com adição de (▲) 0,8 mL de solução de trealose a 10%, ou 1,2 mL (■) e 3,2 mL (□) de solução de trealose a 20%, ou 0,8 mL de água (Δ).....100
- Figura 44.** Conversões a 2-cloro-1-feniletanol (**53**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A crescida em lactato (A) ou glicerol-etanol (B), imobilizada em Mont-K10, e com adição de (▲) 0,8 mL de solução de trealose a 10%, ou 1,2 mL (■) e 3,2 mL (□) de solução de trealose a 20%, ou 0,8 mL de água (Δ).....101
- Figura 45.** Biorredução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**).....104
- Figura 46.** Variação da concentração celular em função do tempo para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* L70 a 30°C em (A) glicose, (B) lactato e (C) glicerol-etanol. Biomassa (■) e fonte de carbono (○).....106
- Figura 47.** Conversões a (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* L70 cultivada em glicose (A), lactato (B), ou glicerol-etanol (C), e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (●) ou de 2,4 mL de água (▽).....109
- Figura 48.** Conversões a 2-cloro-1-feniletanol (**53**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* L70 cultivada em lactato (A) ou glicerol-etanol (B), e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (●) ou de 2,4 mL de água (▽).....111
- Figura 49.** Biorredução da *p*-nitroacetofenona (**21**).....111
- Figura 50.** Conversões a (S)-(-)-1-(4-nitrofenil)etanol (**24**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* L70 cultivada em lactato (A) ou glicerol-etanol (B), e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (●) ou de 2,4 mL de água (▽).....112
- Figura 51.** Conversões a (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) (A), (R)-(-)-2-

- cloro-1-feniletanol (B) e (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (57) (C) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* L70 crescida em lactato (◊) ou glicerol-etanol (◆), imobilizada em Mont-K10, e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10%.....114
- Figura 52.** Cromatograma de CGQ para uma alíquota da reação de redução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (54) em *n*-hexano a 25°C com células cultivadas em lactato e imobilizadas em Mont-K10, após 15 dias. O produto (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (57) foi obtido com 18% de conversão (ee > 99%).....116
- Figura 53.** Cromatograma de CGQ para uma alíquota da reação de redução da *m*-nitroacetofenona (20) em *n*-hexano a 25°C com fermento de pão comercial protegido por 2,4 mL de solução de trealose a 10%. O produto (S)-(-)-1-(3-nitrofenil)etanol (23) foi obtido com 17% de conversão (ee > 99%) .....120
- Figura 54.** Biorredução da *p*-hidroxiacetofenona (55).....121
- Figura 55.** Biorredução da *p*-metoxiacetofenona (56).....122
- Figura 56.** Conversões a (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (57) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando 2 g (A), 4 g (B), ou 6 g (C) de fermento de pão comercial e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (●), ou 2,4 mL de água (▽), e os correspondentes excessos enantioméricos (%) das reações contendo solução de trealose a 10% (◄) ou água (○).....123
- Figura 57.** Microscopia eletrônica de varredura. (A) Fermento de pão hidratado (1000 x) e (B) 4000 x. (C) Montmorilonita K10 hidratada (4000 x) e (D) sistema FP/K10/G/T, após 48 h de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona em *n*-hexano (1000 x).....128
- Figura 58.** Conversões a (S)-(-)-1-(4-nitrofenil)etanol (24) (A), (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (57) (B) e 1-(4-metoxifenil)etanol (59) (C) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando o fermento de pão comercial imobilizado em Mont-K10, e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (●) ou 2,4 mL de água (▽), e os correspondentes excessos enantioméricos (%) das reações contendo solução de trealose a 10% (◄) ou água (○).....130

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Vantagens e desvantagens do uso de biocatalisadores.....	28
<b>Tabela 2.</b> Percentagens de conversão e excessos enantioméricos da redução de substratos carbonílicos mediada pela cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1A cultivada em glicerol-etanol e protegida por trealose.....	103
<b>Tabela 3.</b> Percentagens de conversão na redução do acetoacetato de etila em sistema bifásico*, mediada pela cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L70 cultivada em lactato ou em glicerol-etanol.....	117
<b>Tabela 4.</b> Percentagens de conversão e excessos enantioméricos (%) da redução de acetofenonas substituídas em <i>n</i> -hexano, mediada pelo fermento de pão comercial e adição de 2,4 mL de trealose a 10%.....	119
<b>Tabela 5.</b> Percentagens de conversão e excessos enantioméricos (%) da redução da $\alpha$ -cloroacetofenona ( <b>52</b> ) em <i>n</i> -hexano a 30°C, mediada pelo FP em diferentes sistemas biocatalíticos.....	126
<b>Tabela 6.</b> Percentagens de conversão e excessos enantioméricos (%) da redução dos substratos carbonílicos em sistema bifásico, mediada pelo fermento de pão comercial.....	132

## LISTA DE ABREVIATURAS

### Siglas

IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
pdb	protein data bank
E.C.	Enzyme Commission

### Abreviaturas

Abs	absorbância
ADP	adenosina difosfato
ADH	álcool desidrogenase
<i>ADH1</i>	gene que codifica para a álcool desidrogenase
ATP	adenosina trifosfato
%c	percentagem de conversão
CCD	cromatografia de camada delgada
CG	cromatografia gasosa
CGQ	cromatografia gasosa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
col.	colaboradores
<i>CYB2</i>	gene que codifica para a L-lactato ferrocitocromo c oxidorreductase
Da	dalton
Det	detector
DEX CB	$\beta$ -ciclodextrina
<i>DLD1</i>	gene que codifica para a D-lactato ferrocitocromo c oxidorreductase
<i>DLD3</i>	gene que codifica para a D-lactato desidrogenase
DNA	ácido desoxirribonucléico
DMSO	dimetilsulfóxido
ee	excesso enantiomérico
ES	complexo enzima-substrato
<i>FAS1</i>	gene que codifica para a ácido graxo sintase
<i>FAS2</i>	gene que codifica para a ácido graxo sintase
FID	detector de ionização de chama
FMN	flavina mononucleotídeo
FP	fermento de pão
G	gelatina
<i>GRE2</i>	gene que codifica para a carbonil reductase
Gre2p	$\alpha$ -acetóxi reductase
<sup>1</sup> HMRN	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
Inj	injetor
IV	infravermelho

$J$	constante de acoplamento
<i>JEN1</i>	gene que codifica para a lactato permease
$k_{cat}$	constante de velocidade
$K_m$	constante de Michaelis-Menten
LDH	lactato desidrogenase
log P	coeficiente de partição octanol-água
MEV	microscopia eletrônica de varredura
M.M	massa molecular
Mont-K10	montmorilonita K10
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ORFs	fases abertas de leitura ( <i>open reading frames</i> )
p. e.	ponto de ebulição
p. f.	ponto de fusão
PH <sub>2</sub>	pressão do gás hidrogênio
RNA	ácido ribonucléico
S	sacarose
[S]	concentração de substrato
T	trealose
T <sub>i</sub>	temperatura inicial
T <sub>f</sub>	temperatura final
TMS	tetrametilsilano
V <sub>máx</sub>	velocidade máxima da reação
YP	peptona de levedura
Ypr1p	aldo-ceto redutase
<i>YPR1</i>	gene que codifica para a aldo-ceto redutase
$[\alpha]_D^T$	rotação óptica específica
$\Delta_{aq}$	taxa de aquecimento

## RESUMO

ALBUQUERQUE, Patrícia Melchionna. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na redução de substratos carbonílicos. Florianópolis, 2007. 161f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós Graduação em Química, UFSC, 2007.

Neste trabalho foram utilizadas três cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalisadores em reações de redução enantiosseletivas de substratos carbonílicos em diferentes sistemas biocatalíticos. A fim de verificar a influência do metabolismo nas reações biocatalíticas, a cepa selvagem W303-1A foi cultivada em diferentes fontes de carbono. A proteção destas células utilizadas em meio orgânico foi avaliada através da adição de açúcares (trealose e sacarose) e da imobilização em montmorilonita K10. Na redução do acetoacetato de etila obteve-se 52% de conversão ao álcool quiral (S)-(+)-3-hidroxi-3-butanoato de etila (ee > 99%) com as células cultivadas em glicerol-etanol e com adição de trealose. Com o uso das células cultivadas em glicose e adição de sacarose, observou-se a formação do enantiômero (R) e o consumo do dissacarídeo. A  $\alpha$ -cloroacetofenona não foi eficientemente reduzida por esta cepa em *n*-hexano, mesmo na presença de trealose ou quando imobilizada em K10. Após 15 dias de reação, 10% do *p*-nitrobenzoilacetato de etila foi convertido pela W303-1A ao álcool (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil) propanoato de etila, com ee > 99%. A cepa selvagem não foi capaz de converter as acetofenonas substituídas (*p*-NO<sub>2</sub>, *p*-OH e *p*-OCH<sub>3</sub>) nas condições reacionais testadas. A levedura industrial L70 mostrou-se um biocatalisador mais interessante para fins sintéticos do que a W303-1A. Quando utilizada na forma livre em *n*-hexano, os valores de conversão foram similares aos obtidos pela cepa selvagem na redução do acetoacetato de etila e da  $\alpha$ -cloroacetofenona, porém a L70 foi capaz de reduzir seletivamente 21% da *p*-nitroacetofenona. Quando imobilizada em Mont-K10, a cepa L70 cultivada em lactato reduziu 100% do acetoacetato de etila em 96 h de reação com ee > 99%. As conversões da  $\alpha$ -cloroacetofenona continuaram baixas, mas foi observado um aumento da seletividade com o uso da L70 imobilizada. Com esta cepa, foi testado o uso do sistema bifásico (*n*-hexano/tampão ácido cítrico-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,5) na redução do acetoacetato de etila, onde se verificou um melhor desempenho das células cultivadas em glicerol-etanol, convertendo 88% do substrato (ee > 99%), após 15 dias de reação. Por fim, utilizou-se o fermento de pão comercial na redução dos substratos carbonílicos. Utilizando 6 g do biocatalisador na forma livre em *n*-hexano, e com adição de trealose, as acetofenonas substituídas foram convertidas aos correspondentes álcoois. A *p*-hidroxiacetofenona foi convertida somente após 7 dias, com baixa seletividade, e apenas 10% da *p*-metoxiacetofenona foi convertida após 15 dias de reação. A *p*-nitroacetofenona foi reduzida mais eficientemente, com 41% de conversão. Entretanto, a seletividade do biocatalisador foi muito baixa (ee ~10%), ao contrário do observado na redução da *m*-nitroacetofenona (17% c, ee > 99%). Após o estudo da quantidade de fermento, foram utilizados 6 g do biocatalisador na redução do

*p*-nitrobenzoilacetato de etila, obtendo-se 92% de conversão e ee < 80%. Quando imobilizado em Mont-K10, recoberto por gelatina e com adição de trealose, o fermento de pão converteu a  $\alpha$ -cloroacetofenona seletivamente em 24 h de reação (ee > 99%), mas a conversão foi baixa (15%). A imobilização deste biocatalisador aumentou a seletividade na redução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila, mantendo o ee > 99% durante toda a reação. Porém, as conversões foram menores que as obtidas com o fermento livre. Em sistema bifásico, foi observado a redução de todos os substratos testados. Na conversão da  $\alpha$ -cloroacetofenona, obteve-se 59% de conversão ao álcool quiral (*R*)-(-)-2-cloro-1-feniletanol (ee > 99%). Outro resultado interessante foi obtido na redução da *p*-nitroacetofenona, onde se observou 98% de conversão em 24 h (ee = 93%). Com este sistema biocatalítico, o acetoacetato de etila foi convertido totalmente em 48 h, mantendo a alta seletividade (ee > 99%).

Concluindo, o uso de *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalisador em reações de redução de compostos carbonílicos mostra-se como uma metodologia eficiente para a produção de álcoois quirais com alta pureza enantiomérica.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, biorredução de carbonilas, álcoois quirais, meio orgânico, trealose.

## ABSTRACT

ALBUQUERQUE, Patrícia Melchionna. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na redução de substratos carbonílicos. Florianópolis, 2007. 161f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós Graduação em Química, UFSC, 2007.

In this study three *Saccharomyces cerevisiae* strains were used as biocatalysts for the enantioselective reduction of carbonyl substrates in different biocatalytic systems. In order to verify the influence of the yeast metabolism on bioreduction reactions, the wild type *S. cerevisiae* W303-1A was cultivated in different carbon sources. The protection of these cells with the addition of sugars (trehalose or sucrose) or with immobilization on Mont-K10, in reactions carried out in organic media, were also evaluated. For the reduction of ethyl acetoacetate, conversion of 52% to the chiral alcohol ethyl (S)-(+)-3-hydroxybutanoate (ee > 99%) was obtained with the cells grown in glycerol-ethanol and with trehalose addition. For the cells cultivated with glucose and sucrose addition, the formation of the (R) enantiomer was also observed, along with the sugar consumption. The wild type W303-1A did not reduce efficiently the  $\alpha$ -chloroacetophenone in *n*-hexane, even with the addition of trehalose, or after immobilization on K-10. After 15 days, 10% of ethyl *p*-nitrobenzoylacetate was converted by W303-1A to the chiral alcohol ethyl (S)-(-)-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl)propanoate (ee > 99%). The wild type yeast was not able to convert the substituted acetophenones (*p*-NO<sub>2</sub>, *p*-OH e *p*-OCH<sub>3</sub>) under the tested conditions. The industrial yeast strain L70 was found to be a more interesting biocatalyst for synthetic purposes than the wild type strain W303-1A. When the free cells were used in *n*-hexane, similar results to those obtained with W303-1A were observed for the reduction of ethyl acetoacetate and  $\alpha$ -chloroacetophenone. However, the L70 strain was able to reduce 21% of *p*-nitroacetophenone. When immobilized on Mont-K10, the yeast grown in lactate reduced 100% of ethyl acetoacetate within 96 h (ee > 99%). The  $\alpha$ -chloroacetophenone conversions remained low, but an improvement in the selectivity was observed when L70 was immobilized on Mont-K10. With this strain, a biphasic system was also tested (*n*-hexane/citric acid-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer, pH 4.5) for the reduction of ethyl acetoacetate. The best results were obtained with the yeasts cultivated in glycerol-ethanol, which converted 88% of the substrate (ee > 99%), after 15 days. Finally, commercial baker's yeast was used for the reduction of the carbonyl substrates. Using 6 g of the free biocatalyst in *n*-hexane, and with the addition of trehalose solution (10%), the substituted acetophenones were converted to the corresponding products. The *p*-hydroxyacetophenone was converted only after 7 days, presenting a low selectivity, and only 10% of the *p*-methoxyacetophenone was converted after 15 days. The *p*-nitroacetophenone was reduced more efficiently, furnishing 41% of conversion product. However, the biocatalyst selectivity was very low (ee ~10%) in comparison to that observed in the reduction of *m*-nitroacetophenone (17% conversion, ee > 99%). After evaluating the amount of baker's yeast to be used,



6 g of the biocatalyst were employed for the reduction of ethyl *p*-nitrobenzoylacetate, and 92% of conversion was obtained, with ee < 80%. After immobilization on Mont-K10, covered using gelatin and with the addition of trehalose 10%, the yeast converted the  $\alpha$ -chloroacetophenone with high selectivity in 24 h (ee > 99%), but the conversion was still low (15%). The biocatalyst immobilization improved the enantioselectivity in the reduction of ethyl *p*-nitrobenzoylacetate, and the value of ee > 99% was maintained during the reaction. However, the conversions were lower than those obtained with free baker's yeast. In the biphasic system, all tested substrates were converted to the products. In the reduction of  $\alpha$ -chloroacetophenone, 59% of conversion to the chiral alcohol (*R*)-(-)-2-chloro-1-phenylethanol (ee > 99%) was observed. Another notable result was obtained in the reduction of *p*-nitroacetophenone, where 98% of this substrate was converted in 24 h (ee = 93%). With this biocatalytic system, the ethyl acetoacetate was totally converted in 48 h, maintaining the high selectivity (ee > 99%).

To conclude, the use of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocatalyst in reduction reactions was shown to be an efficient methodology for the production of chiral alcohols with high optical purity.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, carbonyl bioreduction, chiral alcohols organic media, trehalose.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

O desenvolvimento de novas metodologias para a obtenção de compostos enantiomericamente puros é uma das áreas de grande interesse para a síntese orgânica.<sup>[1,2]</sup> A obtenção de compostos opticamente puros é de fundamental importância para a síntese de produtos naturais e de substâncias biologicamente ativas.<sup>[2,3]</sup> O preparo de fármacos e moléculas precursoras com alta pureza enantiomérica tem contribuído para o crescente desenvolvimento de novos processos, especialmente aqueles que se utilizam da biocatálise e de metodologias ambientalmente corretas.<sup>[1,4-6]</sup>

O emprego de enzimas e microrganismos como catalisadores quirais proporcionou um avanço significativo para a química sintética. Os biocatalisadores possuem sítios catalíticos seletivos, favorecendo a formação de produtos enantiomericamente puros; possuem alta especificidade, eficiência e atuam em condições reacionais brandas.<sup>[3]</sup> Diferentes enzimas e microrganismos vêm sendo utilizados e muitos são os sistemas de biotransformação disponíveis, capazes de catalisar uma ampla variedade de reações orgânicas.<sup>[7]</sup>

A redução assimétrica de compostos carbonílicos mediada por leveduras tornou-se uma valiosa ferramenta para a preparação de álcoois quirais, importantes intermediários para a indústria farmacêutica. Metodologias simplificadas para a preparação dessas moléculas em sua forma enantiomericamente pura são de grande interesse, pois a partir delas, moléculas mais complexas, de alto valor comercial podem ser obtidas.<sup>[4,8]</sup>

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada como fermento de pão e na produção de bebidas alcoólicas, tem sido o microrganismo mais empregado pelos químicos sintéticos, principalmente na redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos. Esta levedura tem sido reportada há muito tempo como catalisador de transformações que geram

produtos quirais e pode ser considerada como um biocatalisador ideal pelo fato de estar amplamente disponível e ser de fácil manuseio.<sup>[4,9-11]</sup>

O meio aquoso tem sido o mais freqüentemente utilizado nas reações de redução mediadas por *S. cerevisiae*, pois dessa forma as condições ambientais ideais para a sobrevivência do microrganismo são mantidas.<sup>[12-14]</sup> Entretanto, a solubilização do substrato carbonílico no meio reacional e a posterior extração do produto formado tornam-se fatores limitantes ao processo, e podem ser superados com o uso de um meio orgânico.<sup>[15,16]</sup>

Para que as células mantenham sua atividade catalítica em solvente orgânico torna-se necessário protegê-las, e o emprego de técnicas de imobilização e proteção celular deve ser estudado para cada sistema em particular. O biocatalisador imobilizado pode ainda ser reutilizado, com pouca perda de atividade catalítica, o que é mais uma vantagem do processo.<sup>[17,18]</sup>

O aumento na enantiosseletividade de muitas reações biocatalíticas é um desafio para os pesquisadores da área. A fim de conseguir um sistema reacional com rendimento satisfatório e elevada pureza óptica, muitas estratégias podem ser traçadas, desde a otimização do meio e das condições reacionais até a escolha do biocatalisador. A engenharia genética e as técnicas de biologia molecular são hoje ferramentas poderosas na construção de biocatalisadores mais eficientes.<sup>[19,20]</sup>

Com o conhecimento do genoma de *S. cerevisiae*<sup>[21]</sup> e a disponibilidade de informações existentes sobre o metabolismo e a fisiologia desta levedura, modificações genéticas específicas podem ser realizadas e os mais diferentes substratos orgânicos são convertidos em produtos de interesse, com alta pureza enantiomérica.<sup>[19]</sup>

Considerando os aspectos abordados, o presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de metodologias para o uso de *S. cerevisiae* na redução de compostos carbonílicos, onde algumas estratégias para o aumento da enantiosseletividade foram avaliadas.

## 1.2 Biocatalisadores

As enzimas são, em geral, proteínas de grande complexidade estrutural que atuam como catalisadores na maioria das reações químicas do metabolismo celular. São constituídas por resíduos de aminoácidos, unidos através de ligações peptídicas, e possuem massa molar que pode variar de milhares a milhões de Daltons (g/mol). Estas macromoléculas altamente especializadas exercem funções vitais nos organismos vivos e, dependendo de sua atividade biológica e do organismo que as sintetizou, podem ter características bastante distintas.<sup>[22]</sup>

Assim como todo catalisador, as enzimas aumentam a velocidade das reações através da diminuição da barreira energética existente entre reagentes (substratos) e produtos sem sofrer alterações permanentes em sua estrutura. As enzimas aproximam os substratos com orientação espacial favorável dentro de uma cavidade, denominada sítio ativo, formando um complexo enzima-substrato (ES). A formação deste complexo conduz a uma diminuição da energia de ativação, multiplicando a velocidade da reação em pelo menos  $10^6$  vezes.<sup>[23]</sup>

Muitos modelos de ligação “enzima-substrato” têm sido propostos a fim de elucidar o mecanismo da catálise enzimática. O modelo “chave-fechadura” é o mais conhecido deles, e foi proposto por E. Fischer em 1894. Neste mecanismo, o substrato correto encaixa-se perfeitamente no sítio ativo da enzima, como uma chave em sua fechadura, revelando a alta especificidade das reações enzimáticas.<sup>[22]</sup> Entretanto, este modelo não é mais aceito atualmente, visto que implicaria na formação de um complexo ES de elevada estabilidade, tornando a reação termodinamicamente desfavorável.<sup>[4]</sup>

Um modelo mais adequado para descrever a formação do complexo ES foi desenvolvido por Koshland Jr. em 1958 e denominado “encaixe induzido”.<sup>[4]</sup> A aproximação do substrato ao sítio ativo induz uma mudança conformacional da enzima, alinhando os orbitais dos substratos e dos grupos catalíticos corretamente, facilitando a reação.<sup>[22]</sup>

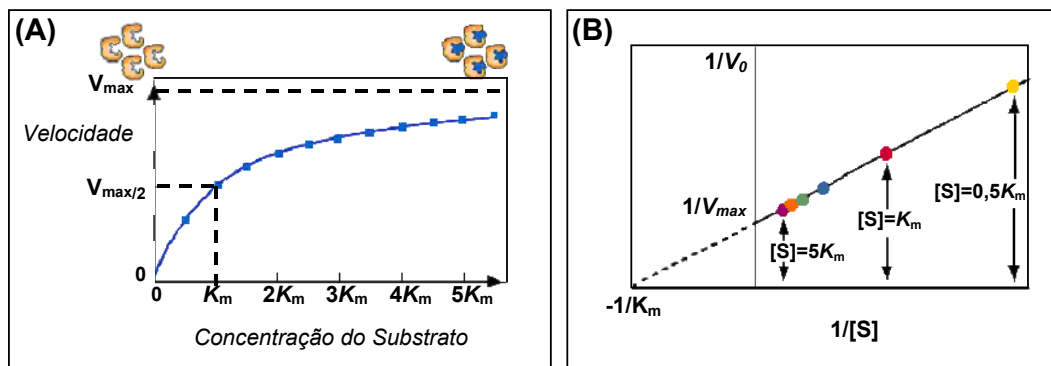
Mais recentemente, em 1986 Dewar propôs a teoria da dessolvatação, sugerindo que as reações enzimáticas são semelhantes às que ocorrem em fase gasosa, pois quando um substrato entra no sítio ativo da enzima ele substitui todas as moléculas de água ali presentes, dessolvatando-o. Warshel e *col.* expandiram esta teoria em 1989 para o modelo de “solvatação-substituição”, baseando-se no fato de que seria energeticamente desfavorável para a enzima expulsar a água em torno do substrato no sítio ativo, sugerindo que a água seria substituída por outro meio, fornecido pelo sítio ativo, causando uma substituição na solvatação.<sup>[4]</sup>

A regra dos três pontos, todavia, é a que vem sendo utilizada para explicar a seletividade enzimática. Criado por Ogston em 1948, este modelo sugere que para a enzima ser altamente enantiosseletiva o substrato deve ser mantido fixo no espaço tridimensional, necessitando de três pontos de ligação distintos com o sítio catalítico.<sup>[4]</sup> Logo, a conformação e a composição química do sítio ativo determinam a especificidade e a eficiência da catálise.

O complexo ES resulta das ligações formadas entre o substrato e as cadeias laterais de vários aminoácidos dentro do sítio ativo. Estas interações são principalmente não covalentes, como as eletrostáticas, íon-dipolo, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, transferência de carga, interações hidrofóbicas e dispersões de London. As ligações não covalentes são, em geral, interações de natureza fraca, e dessa forma o substrato e produto podem ser liberados do sítio ativo sem comprometer a estrutura da enzima.<sup>[22]</sup>

Uma vez que o substrato está ligado ao sítio ativo da enzima através das possíveis interações acima mencionadas, as enzimas podem utilizar vários mecanismos para catalisar a conversão do substrato a produto. Os mais comuns são: aproximação, catálise covalente, catálise ácida/básica, catálise eletrostática, dessolvatação, e torção. Todos os mecanismos atuam na estabilização da energia do estado de transição ou na desestabilização do estado fundamental.<sup>[22]</sup>

A atividade catalítica de uma enzima varia com diversos fatores, sendo o mais importante a própria concentração do substrato ( $[S]$ ). A atividade enzimática aumenta com o aumento da  $[S]$  até uma concentração de saturação, a partir da qual a velocidade da reação é máxima ( $V_{max}$ ). Todas as enzimas mostram o efeito de saturação, porém este varia amplamente em relação à  $[S]$  necessária para produzi-lo. O gráfico da velocidade da reação enzimática *versus* concentração de substrato é uma hipérbole para enzimas que obedecem à lei de Michaelis-Menten, e permite determinar a  $[S]$  correspondente à metade de  $V_{max}$ , denominada  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten). Esta constante expressa a afinidade da enzima pelo substrato, ou seja, quanto menor o valor de  $K_m$ , maior a afinidade da enzima pelo substrato. O gráfico do inverso da velocidade inicial em função de  $1/[S]$  lineariza a curva, facilitando a determinação de  $K_m$  (relação de Lineweaver-Burk) (Figura 1).<sup>[23]</sup>



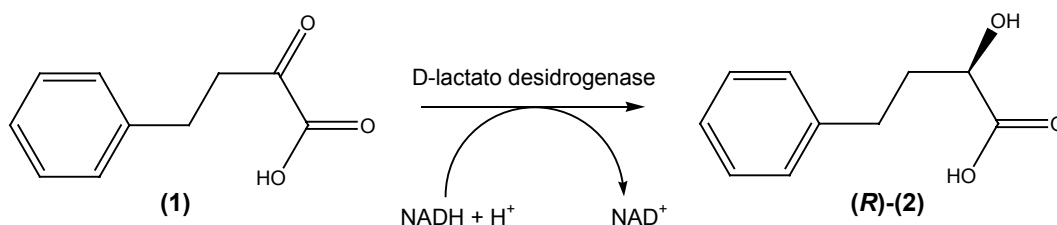
**Figura 1.** Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade inicial da reação catalisada por enzimas. (A) Gráfico da velocidade inicial da reação *versus* concentração de substrato. (B) Relação de Lineweaver-Burk.<sup>[23]</sup>

As enzimas também têm as atividades alteradas em função do pH, temperatura, força iônica e polaridade do meio, apresentando atividade máxima quando estes parâmetros são ótimos, o que depende da origem do organismo que sintetiza determinada proteína. A atividade de cada enzima na célula está sujeita a muitos mecanismos de regulação. A indução ou inibição da produção enzimática vai depender do desempenho das atividades celulares, estimulando

ou inibindo a expressão dos genes envolvidos na biossíntese destas macromoléculas.<sup>[23]</sup>

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) as enzimas são divididas em seis classes principais, conforme o tipo de reação que catalisam: oxidorredutases, transferases, hidrolases, isomerases, liases e ligases. As enzimas que mediam as reações de oxidação-redução são as oxidorredutases, responsáveis pela oxigenação de ligações C-H, C-C, C=C, ou pela remoção de átomos de hidrogênio.<sup>[4,23]</sup>

Certas enzimas atuam somente com o auxílio de substâncias não protéicas, as quais são chamadas de cofatores quando são íons ou moléculas inorgânicas, e coenzimas quando são moléculas orgânicas. As oxidorredutases necessitam da presença de coenzimas como NADH e NADPH, ou de outras moléculas orgânicas, que atuem como aceptores ou doadores de elétrons nas reações de redução e oxidação.<sup>[23]</sup> Por exemplo, na reação de redução do ácido 2-oxo-4-fenilbutírico (**1**) para formar o álcool (*R*)-(**2**), mediada pela D-lactato desidrogenase, o NADH é oxidado a NAD<sup>+</sup> (**Figura 2**).<sup>[24]</sup>



**Figura 2.** Reação de redução do ácido 2-oxo-4-fenilbutírico (**1**).<sup>[24]</sup>

A crescente aplicação de enzimas em síntese orgânica baseia-se na especificidade com que estas catalisam as diferentes reações.<sup>[25]</sup> Os biocatalisadores apresentam os principais tipos de seletividade desejados,<sup>[4]</sup> tais como quimiosseletividade, pois reagem apenas com um tipo de grupo funcional presente no substrato; régio e diastereosseletividade, considerando que as enzimas são capazes de distinguir entre grupos funcionais posicionados

em diferentes regiões do mesmo substrato; e enantiosseletividade, pois as enzimas são catalisadores quirais.<sup>[4,22]</sup>

As enzimas mais interessantes para serem utilizadas na química sintética são aquelas capazes de catalisar reações seletivamente, atuando sobre grupos de substratos que possuem estruturas diferentes.<sup>[4,10]</sup> Muitas são as fontes de enzimas utilizadas industrialmente. Embora algumas sejam extraídas de tecidos animais e vegetais, as enzimas usadas na indústria são geralmente obtidas de microrganismos.

A grande variedade e disponibilidade de bactérias, leveduras e fungos, aliada ao domínio das técnicas de cultivo, tornam as enzimas de origem microbiana as mais utilizadas em processos industriais.<sup>[3-5,24,25]</sup> As enzimas termoestáveis, isoladas de microrganismos termofílicos, têm recebido grande destaque. Estes biocatalisadores são bastante estáveis a altas temperaturas, e suportam condições extremamente ácidas ou alcalinas, e portanto, possuem um enorme potencial para serem utilizados em diferentes aplicações industriais.<sup>[26]</sup>

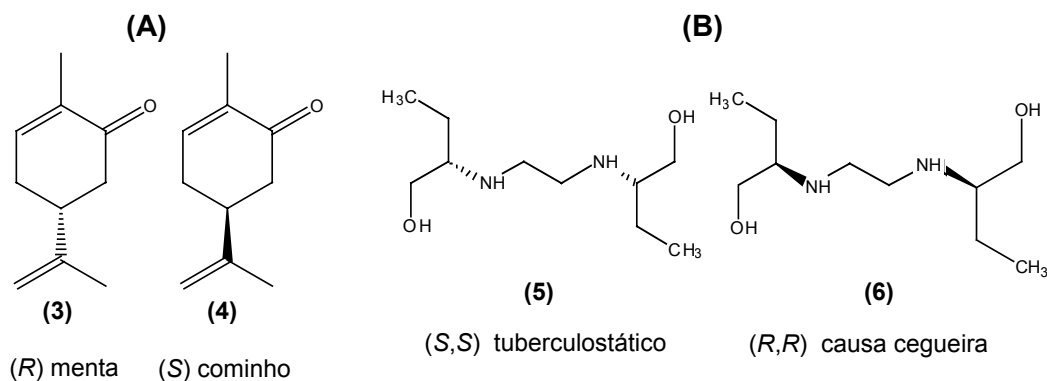
### **1.3 A Biocatálise e a Obtenção de Compostos Opticamente Ativos**

Toda molécula ou objeto não superponível à sua imagem especular é denominada quiral.<sup>[23,27]</sup> Apesar de muito semelhantes, com propriedades químicas idênticas, as substâncias quirais apresentam atividade biológica distinta e podem ser reconhecidas por organismos vivos, os quais sintetizam e metabolizam uma grande variedade de moléculas quirais, como por exemplo, os aminoácidos de configuração L e os açúcares de configuração D.<sup>[2,4,22,28]</sup>

A indústria química vem utilizando os biocatalisadores há muito tempo graças à capacidade de reconhecimento quiral das enzimas.<sup>[1,3,6]</sup> Atualmente sabe-se que substâncias biologicamente ativas usadas como princípio ativo de medicamentos não devem ser empregadas na forma de racematos, já que a



diferença existente entre as formas espaciais de um par de enantiômeros significa diferença entre suas propriedades, o que influencia diretamente a atividade do fármaco.<sup>[15,23,27-29]</sup> A obtenção destes compostos em sua forma enantiomericamente pura é, sem dúvida, uma das principais aplicações da biocatálise.<sup>[1]</sup> Dois exemplos de pares de enantiômeros com atividades biológicas diferentes estão apresentados na **Figura 3**.<sup>[4]</sup>

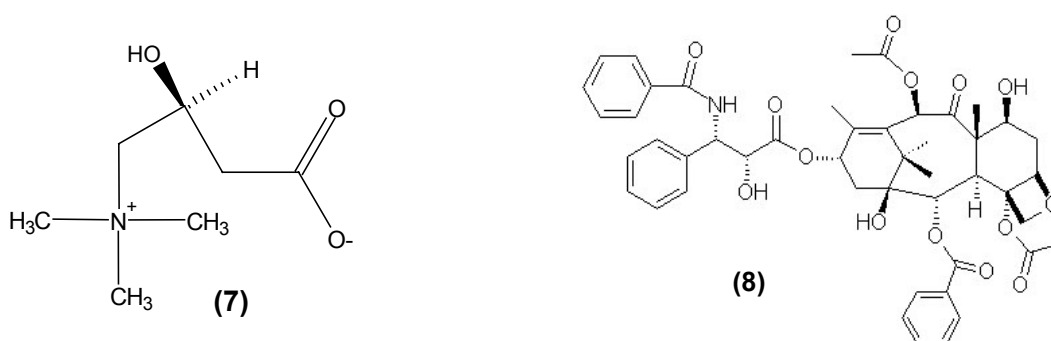


**Figura 3.** Exemplos de pares de enantiômeros com atividades biológicas diferentes: (A) carvona e (B) etambutol.<sup>[4]</sup>

Considerando a importância da quiralidade na eficiência de muitos fármacos, a redução de compostos carbonílicos (cetonas, dicetonas e cetoésteres) catalisada por células de leveduras surge como uma rota simplificada na preparação de álcoois quirais opticamente puros, que são importantes blocos de construção para a indústria farmacêutica.<sup>[20,30,31]</sup> Os álcoois enantiomericamente puros são intermediários valiosos para a síntese de vários compostos comercialmente importantes e de alto valor agregado como, por exemplo, a L-carnitina (7)<sup>[32]</sup> utilizada para acelerar a oxidação lipídica; e o Taxol® (8),<sup>[19]</sup> fármaco utilizado no tratamento de cânceres de ovário, mama e de pulmão<sup>[33]</sup> (**Figura 4**).

Embora a catálise enzimática seja reconhecida pela sua especificidade e eficiência há muito tempo, apenas recentemente tem sido aplicada na transformação seletiva de substratos não naturais, tornando-se uma técnica

rotineira em síntese orgânica,<sup>[15,18,34]</sup> especialmente no desenvolvimento de reagentes estereosseletivos para a síntese de compostos quirais.<sup>[3]</sup> O número de biotransformações empregadas na síntese de compostos orgânicos vem aumentando recentemente, assim como o número de enzimas e microrganismos disponíveis para estes processos.<sup>[35,36]</sup> Os avanços da bioquímica, química de proteínas, biologia celular e molecular, além da tecnologia de fermentações, têm disponibilizado um número ilimitado de enzimas e culturas microbianas como ferramentas valiosas na transformação de diferentes materiais sintéticos.<sup>[1,3,20,37]</sup>



**Figura 4.** Estrutura da L-carnitina<sup>[32]</sup> (7) e do Taxol®<sup>[19]</sup> (8).

A aplicação de enzimas e microrganismos em reações químicas tem sido objeto de muitos estudos devido às vantagens que estes apresentam quando comparados aos catalisadores convencionais, como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos.<sup>[18,20]</sup> As vantagens das reações catalisadas por microrganismos são principalmente a alta estereosseletividade dos produtos obtidos e o uso de condições reacionais brandas (temperatura ambiente e pressão atmosférica), as quais minimizam problemas de isomerização, racemização, epimerização e rearranjos que podem ocorrer durante os processos químicos.<sup>[3,20]</sup>

As enzimas são compatíveis entre si e diversas reações biocatalíticas podem ser realizadas simultaneamente, em um mesmo meio reacional.<sup>[4]</sup> Além disso, as enzimas e células microbianas são catalisadores muito eficientes que

podem ser imobilizados e reutilizados por muitas vezes, contribuindo assim para a obtenção de metodologias limpas, ambientalmente favoráveis.<sup>[1,38-41]</sup>

Enzimas isoladas ou células inteiras, na forma livre ou imobilizada, têm sido usadas como biocatalisadores.<sup>[3,32,36,42]</sup> O sistema de biotransformação a ser empregado dependerá do tipo de reação, do uso de cofatores, bem como da escala em que ocorrerá a biocatálise, entre outros parâmetros relevantes ao processo.<sup>[4]</sup>

Do ponto de vista econômico, o uso de células inteiras é particularmente interessante na redução de carbonilas, pois fornece alta seletividade e elimina a necessidade de fornecer quantidades equimolares de coenzimas (NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H) ao sistema. A reação de redução pode ser realizada com a adição do substrato às células em crescimento ou em repouso, que fornecerão as desidrogenases e as coenzimas.<sup>[8,32,43]</sup>

Por outro lado, o uso de enzimas purificadas elimina as competições com outras redutases de estereosseletividades diferentes, bem como a ocorrência de reações paralelas, o que pode ser um problema no emprego de células íntegras.<sup>[3,4,8,19,44]</sup>

A **Tabela 1** apresenta uma comparação entre o uso de enzimas isoladas e de células íntegras em biocatálise.<sup>[4]</sup>

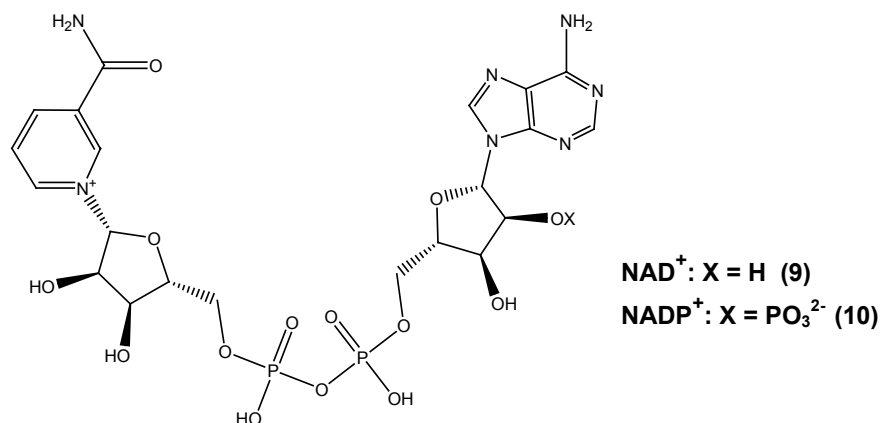
**Tabela 1.** Vantagens e desvantagens do uso de biocatalisadores.<sup>[4]</sup>

<b>Biocatalisador</b>	<b>Forma</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Enzima Isolada</b>	Geral	Aparelhagem simples, fácil isolamento do produto, boa produtividade, tolerância a altas [S]	Algumas enzimas necessitam de reciclagem de cofator
	Suspensa em meio aquoso	Alta atividade enzimática	reações paralelas, insolubilidade do substrato, requer extração da enzima
	Suspensa em meio orgânico	Reações fáceis de conduzir e de extrair o produto, solubilização do substrato e fácil recuperação da enzima	Baixa atividade enzimática
	Imobilizada	Fácil recuperação	Perda de atividade
<b>Células inteiras</b>	Geral	Não necessita de reciclagem do cofator	Isolamento trabalhoso do produto, baixa produtividade, baixa tolerância à alta [S] e a solventes orgânicos, reações paralelas
	Células em crescimento	Alta atividade enzimática	Grande quantidade de biomassa, muitos subprodutos, processo difícil de controlar
	Células em repouso	Fácil isolamento do produto, poucos subprodutos	Baixa atividade enzimática
	Células Imobilizadas	Possibilidade de reutilização do sistema	Baixa atividade enzimática

#### 1.4 Biocatalisadores Envolvidos em Reações de Redução

As reações de redução que ocorrem nas células vivas são catalisadas por enzimas intracelulares, denominadas oxidoredutases.<sup>[23]</sup> Estas enzimas são componentes fundamentais em todos os processos respiratórios, e portanto, vêm sendo estudadas intensamente.<sup>[45]</sup>

As oxidorredutases são, em geral, auxiliadas pela forma reduzida dos nucleotídeos de purina e piridina NADH ou NADPH, coenzimas hidrossolúveis que sofrem oxidações e reduções reversíveis em muitas das reações de transferência de elétrons do metabolismo (**Figura 5**).<sup>[27,46]</sup>

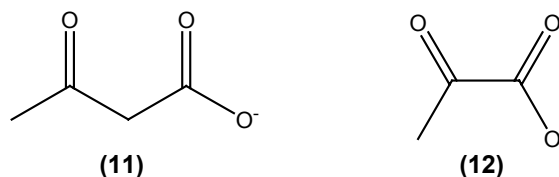


**Figura 5.** Estrutura das coenzimas NAD<sup>+</sup> (9) e NADP<sup>+</sup> (10).<sup>[46]</sup>

As oxidorredutases são classificadas dentro de três categorias: desidrogenases (ou redutases), oxigenases e oxidases.<sup>[4,45,47]</sup> Devido à capacidade de converter grupos carbonílicos pró-quirais em álcoois opticamente puros, as desidrogenases têm sido valiosas ferramentas para a síntese orgânica,<sup>[19,48]</sup> e tem sido amplamente utilizadas na redução de grupamentos carbonílicos de aldeídos ou cetonas e de duplas ligações carbono-carbono.<sup>[4]</sup> Estas enzimas vêm sendo bastante utilizadas na síntese de compostos quirais, tais como aminoácidos e álcoois, pelas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e de insumos para a agricultura.<sup>[49]</sup> A obtenção de condições que propiciem a atuação de uma única redutase (ou de diversas com mesma especificidade) sobre um determinado substrato carbonílico, resulta no enantiômero opticamente puro.<sup>[19,43]</sup>

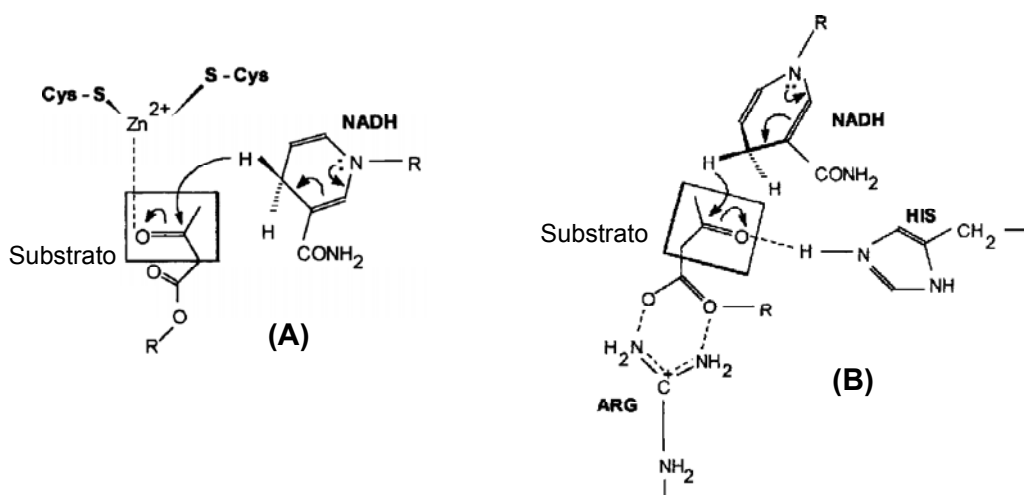
Pereira sugeriu que duas desidrogenases, em particular, parecem estar envolvidas nas reduções enantiosseletivas de carbonilas de β-cetoésteres; a L-lactato desidrogenase (E.C.1.1.1.27, LDH) e a álcool desidrogenase (E.C.1.1.1.1, ADH). Observando as estruturas, nota-se que o piruvato (12),

substrato natural da L-lactato desidrogenase é homólogo ao acetoacetato (11) (a diferença é de um grupo CH<sub>2</sub>). Portanto, a enzima metabolizaria o substrato artificial (11) devido à semelhança entre suas estruturas<sup>[46]</sup> (Figura 6).



**Figura 6.** Semelhança entre as estruturas do acetoacetato (11) e piruvato (12).

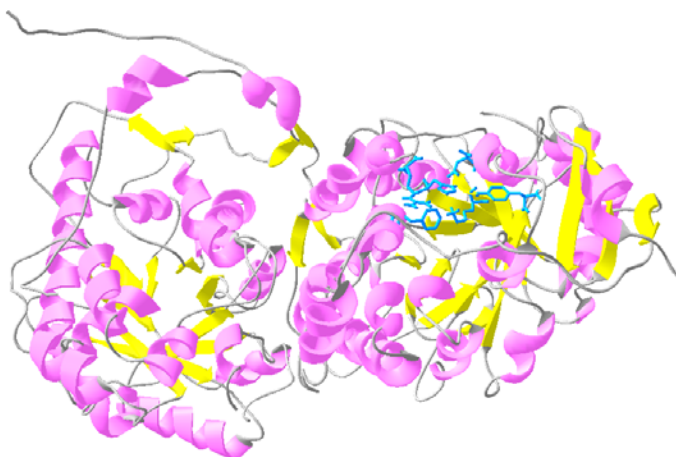
Em um estudo utilizando modelagem molecular, Pereira e *col.* verificaram a interação de β-cetoésteres com o sítio ativo da álcool desidrogenase e da lactato desidrogenase. Os autores concluíram que a ADH fornece o produto *R*, pois o C3 pró-quiral do substrato fica posicionado no sítio ativo da enzima de tal forma que o oxigênio carbonílico coordena com o cátion Zn<sup>2+</sup> (cofator da ADH), e desse modo, o ataque do hidreto só pode ocorrer pela face pró-*R* da carbonila (Figura 7A).<sup>[50]</sup>



**Figura 7.** Representação esquemática do possível mecanismo de ação da (A) álcool desidrogenase e da (B) lactato desidrogenase na redução de β-cetoésteres.<sup>[50]</sup> R = etil, octil ou dodecil.

Já a LDH produz somente o álcool S, seguindo a regra de Prelog, pois o  $\beta$ -cetoéster se liga ao sítio ativo dessa enzima com orientação oposta à que ocorre na ADH, ocorrendo uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico e a histidina 195 (**Figura 7B**).<sup>[50]</sup> De modo geral, a configuração absoluta dos produtos das reações de redução mediadas por *S. cerevisiae* pode ser racionalizada pela regra de Prelog, onde o modo preferencial de redução é estabelecido pelo tamanho dos substituintes ligados à carbonila.<sup>[4]</sup>

As células de microrganismos são as fontes mais comuns de desidrogenases e diferentes espécies de microrganismos expressam diferentes números e tipos destas enzimas.<sup>[19,44]</sup> Na **Figura 8**, pode-se observar a representação esquemática da estrutura tridimensional da unidade da L-lactato ferrocitocromo C oxidoreductase (E.C.1.1.2.3) de *S. cerevisiae*, destacando os resíduos de aminoácidos participantes do sítio ativo.<sup>[51,52]</sup> Esta estrutura está depositada no pdb (*protein data bank*) sob o código 1LDC.<sup>[53]</sup>



**Figura 8.** Representação esquemática da estrutura tridimensional da unidade da L-lactato ferrocitocromo C oxidoreductase de *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>[53]</sup>

Esta enzima, localizada no espaço entre as membranas da mitocôndria da levedura, catalisa a transferência de elétrons entre o L-lactato e o citocromo C. A proteína funcional é um tetrâmetro (4 x 58 kDa) e cada sub-unidade

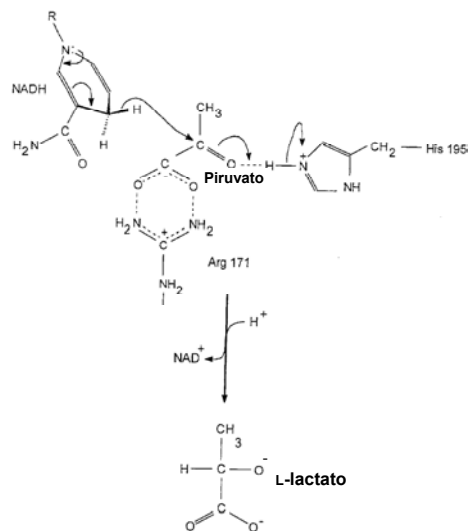
possui uma flavina mononucleotídeo (FMN) e um grupo heme. Tegoni e *col.* verificaram que a participação do grupo OH da tirosina 143, formando ligações de hidrogênio com grupos carboxílicos, é fundamental na orientação do substrato, atuando como um “cabo” eletrônico na transferência de elétrons da FMN para o grupo heme, através da nuvem eletrônica  $\pi$ .<sup>[51]</sup>

Recentemente, Mowat e *col.* estudaram a especificidade da L-lactato ferrocitocromo C oxidoreductase pelo substrato. Foi verificado que a alanina 198 e a leucina 230 estão em contato com o grupo metila do piruvato, sendo responsáveis pela especificidade da enzima pelo L-lactato. Quando a leucina 230 foi substituída através de mutagênese sítio-dirigida por uma alanina, a enzima mutante tornou-se mais eficiente na utilização de substratos maiores, indicando a importância desse aminoácido na especificidade da L-lactato ferrocitocromo C oxidoreductase pelo substrato.<sup>[52]</sup>

Durante a redução biocatalítica, as redutases contidas nas células de microrganismos transferem um hidreto da coenzima (NADH ou NADPH) para a carbonila, transformando o composto carbonílico em álcool, e a coenzima em sua forma oxidada (NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>). Se o composto a ser reduzido for pró-quiral, o hidreto se ligará ao carbono carbonílico criando um centro assimétrico, formando assim um álcool quiral.<sup>[20,48]</sup> O mecanismo de redução do piruvato a L-lactato pela L-lactato desidrogenase pode ser observado na **Figura 9**, onde são mostrados os resíduos de aminoácidos que participam do sítio ativo da enzima.<sup>[46]</sup>

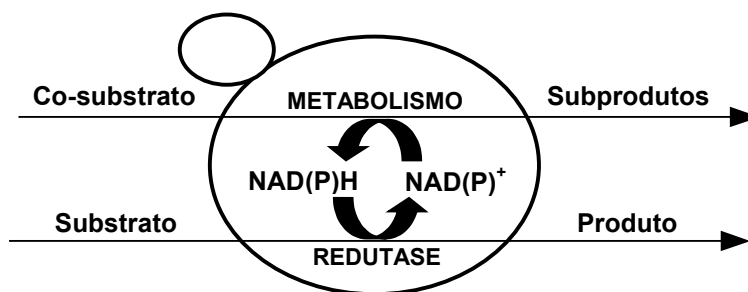
Quando operados em condições não otimizadas, os sistemas de biorredução com células íntegras de leveduras sofrem alguns problemas, como baixos rendimentos, inibição pelo substrato carbonílico e baixa velocidade da reação. A redução de carbonilas pode ser afetada pelo pH, aeração, temperatura, concentração inicial de substrato, razão entre levedura/co-substrato/substrato, tipo de biorreator (batelada ou batelada alimentada) e pela escolha da espécie de levedura.<sup>[30]</sup>





**Figura 9.** Mecanismo da redução do piruvato a L-lactato mediada pela L-lactato desidrogenase.<sup>[46]</sup>

Com exceção da ADH, a grande maioria das redutases de *S. cerevisiae* é NADPH-dependente. Portanto, a coenzima na forma reduzida deve ser regenerada através do metabolismo de um co-substrato, geralmente glicose, sacarose ou etanol.<sup>[20]</sup> De uma maneira simplificada, a biorredução estereosseletiva com células íntegras de leveduras pode ser representada como mostrado na **Figura 10.**<sup>[20,30]</sup>



**Figura 10.** Representação esquemática do sistema de biorredução com células íntegras de leveduras.<sup>[20,30]</sup>

O substrato carbonílico entra no citosol da levedura por difusão onde é reduzido, através da ação de redutases, ao produto quiral. O produto formado

sai da célula por difusão para o meio aquoso. Pode-se verificar então que a biorredução estereosseletiva é composta por duas reações paralelas: (i) a redução enzimática estereosseletiva do composto carbonílico catalisada por uma ou mais redutases, e a concomitante oxidação das coenzimas reduzidas, NADH e NADPH a  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$ ; e (ii) a regeneração da coenzima reduzida através da metabolização de um co-substrato.<sup>[30]</sup> A regeneração das coenzimas representa um papel fundamental nas reações de oxidorredução de interesse sintético de cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, bem como de álcoois, aminas e fenóis.<sup>[54]</sup>

O mecanismo da reciclagem das coenzimas nas reduções estereosseletivas ainda não foi bem elucidado e representa um desafio no entendimento destas reações. Já que os cofatores estão presentes em pequenas quantidades catalíticas nas células microbianas, estes devem ser regenerados após a transferência do hidreto. Substratos auxiliares ou doadores de elétrons são necessários para a reciclagem do cofator. Estes, junto com certas enzimas e os cofatores formam um sistema de reciclagem que garante a transferência de hidreto do doador de elétrons para o cofator<sup>[48]</sup> (**Figura 10**).

Na maioria das vezes os doadores de elétrons são carboidratos, como glicose ou sacarose, mas outras moléculas orgânicas, tais como etanol e formiato, também podem ser utilizadas. A redução também pode ocorrer sem adição de co-substrato, mas ainda não está bem claro como ocorre a regeneração dos cofatores.<sup>[48]</sup>

Zhang e Pionnier estudaram o mecanismo da transferência de hidreto na regeneração do cofator em reduções biocatalíticas mediadas por leveduras. Quando a glicose foi utilizada como co-substrato, o NADH envolvido na glicólise foi consumido para a formação de etanol, e não na formação do produto da biorredução, indicando que a regeneração das coenzimas durante a redução não é acoplada à via glicolítica. O etanol não foi um bom doador de elétrons quando utilizado como substrato auxiliar. Apenas uma pequena quantidade de hidrogênio foi transferida desta molécula, sendo a água a

principal fonte de hidrogênio durante a reação. Quando nenhum co-substrato é adicionado ao meio reacional, a levedura dispõe dos doadores de elétrons contidos em suas células. Portanto, nesse caso os autores observaram que a principal fonte de hidrogênio para reciclar o cofator era a água.<sup>[48]</sup>

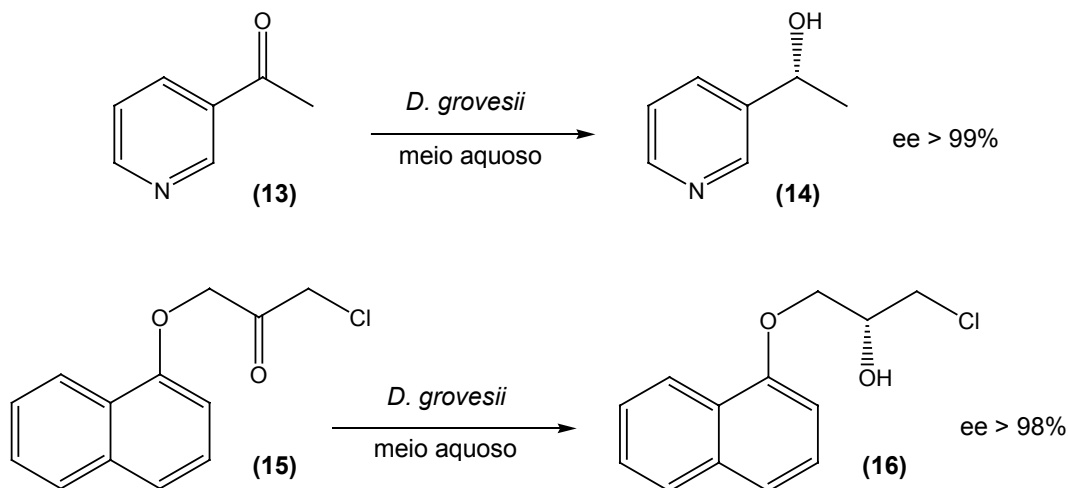
A regeneração eletroquímica dos cofatores também tem sido estudada recentemente. Este método consiste no uso de um eletrodo como fonte de equivalentes redox, a fim de viabilizar o uso de oxidorreduções isoladas. Dessa forma, as desvantagens em se utilizar células íntegras seriam superadas. Entretanto, o uso da bioeletroquímica ainda é pouco difundida.<sup>[54]</sup>

Os métodos enzimáticos para regeneração dos cofatores são mais eficientes, quando comparados aos químicos. Eles podem ser subdivididos em dois tipos: (i) o processo acoplado ao substrato, onde o cofator requerido para a redução do substrato carbonílico é constantemente regenerado através da adição de um co-substrato (doador) o qual é oxidado pela mesma enzima; e (ii) o sistema acoplado à enzima, onde duas reações redox ocorrem paralelamente – redução do substrato e regeneração do cofator – catalisadas por duas enzimas diferentes. Para garantir bons resultados, ambas as enzimas devem possuir alta especificidade por seus respectivos substratos, de forma que as duas reações enzimáticas procedam independentemente, sem competição pelo sítio ativo.<sup>[4]</sup>

Recentemente, Bai e Yang utilizaram uma L-lactato desidrogenase recombinante para converter o ácido 2-oxo-4-fenilbutírico ao ácido (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutírico, importante precursor na síntese de fármacos reguladores da pressão sanguínea. Neste sistema, a coenzima NADH foi regenerada através da redução concomitante do NAD<sup>+</sup> pela formato desidrogenase, presente nas células íntegras de *Candida boidinii*. A enzima e as células foram co-imobilizadas em tecido de algodão e mantiveram sua atividade catalítica superior a 95% até a terceira reutilização.<sup>[49]</sup>

Na busca pelo biocatalisador ideal, inúmeros estudos de triagem de microrganismos, potenciais produtores de redutases, vêm sendo

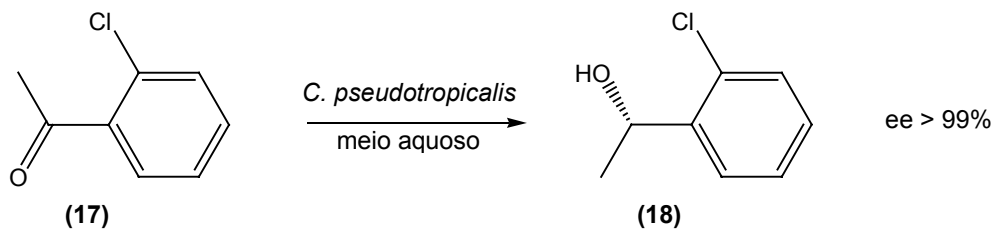
realizados.<sup>[6,20]</sup> Carballeira e *col.* selecionaram a cepa não patogênica de *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018 dentre 416 cepas testadas como um microrganismo produtor de redutases sem expressão de oxidases, para a redução de cetonas. O fungo reduziu as cetonas **13** e **15** entre outras, produzindo os álcoois quirais **14** e **16** com elevada pureza óptica, tolerando altas concentrações de substrato (**Figura 11**).<sup>[35]</sup>



**Figura 11.** Reduções de cetonas mediadas pelo fungo *Diplogelasinospora grovesii*.<sup>[35]</sup>

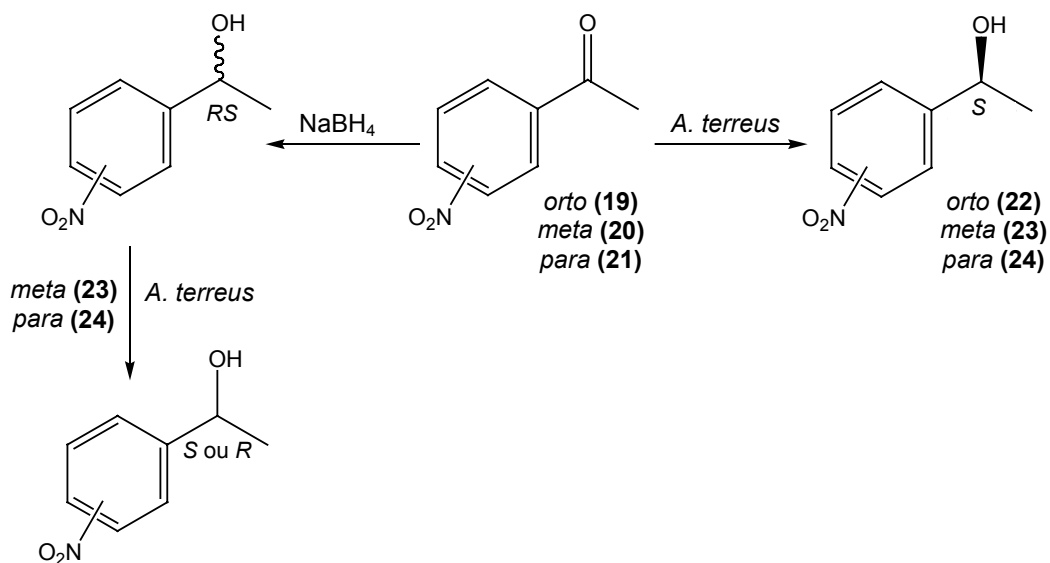
As acetofenonas e seus derivados, são também substratos de grande interesse sintético, e inúmeros estudos biocatalíticos vêm sendo realizados recentemente visando à obtenção de álcoois quirais opticamente puros a partir da redução destes substratos.<sup>[55-58]</sup>

Xie e *col.* utilizaram as células íntegras da levedura *Candida pseudotropicalis* em meio aquoso na redução assimétrica da *o*-cloroacetofenona (**17**). Apesar da alta toxicidade do substrato para as células, a levedura foi capaz de tolerar até 36 g/L da cetona, e o álcool (*S*)-1-(2-clorofenil) etanol (**18**) foi obtido com alta enantiosseletividade (**Figura 12**).<sup>[57]</sup>



**Figura 12.** Biorredução da *o*-cloroacetofenona (17).<sup>[57]</sup>

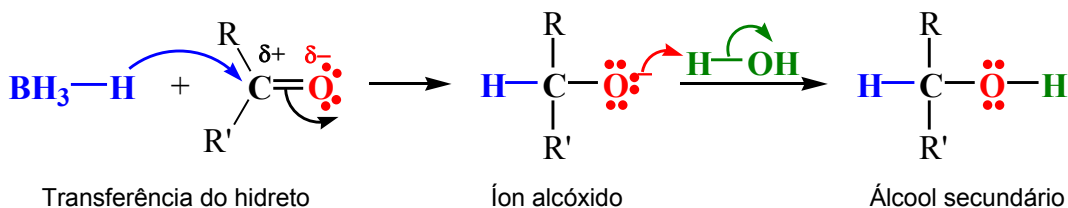
Utilizando o fungo *Aspergillus terreus* em meio aquoso, Comasseto e *col.* obtiveram a partir da redução de acetofenonas nitro-substituídas (19-21) conversões de 98% aos álcoois quirais, com ee > 98%. Os autores também verificaram a resolução dos álcoois racêmicos, obtidos a partir da redução com NaBH<sub>4</sub>, na presença das células íntegras do fungo, variando o pH do meio reacional. Condições ácidas favoreceram o processo de desracemização e o álcool (*S*)-(-)-1-(*m*-nitrofenil)etanol (23) foi obtido com alta enantiosseletividade (ee > 98%) e conversões da ordem de 98% (Figura 13).<sup>[56]</sup>



**Figura 13.** Redução das acetofenonas nitro-substituídas (19, 20 e 21) e desracemização dos álcoois (*RS*)-1-(nitrofenil)etanol (23 e 24), mediadas por células íntegras de *Aspergillus terreus*.<sup>[56]</sup>

## 1.5 Redução de Carbonilas por *Saccharomyces cerevisiae*

Álcoois podem ser obtidos a partir da redução de compostos carbonílicos. O grupamento carbonila, presente em aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres, caracteriza-se pela presença do carbono carbonílico, de hibridização  $sp^2$  e geometria trigonal plana. A adição de um hidreto ao carbono carbonílico leva à formação de um álcool, onde o carbono passa então a ter hibridização  $sp^3$  e geometria tetraédrica. O agente redutor mais comumente utilizado na redução de cetonas é o borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). O mecanismo da reação pode ser observado na **Figura 14**.<sup>[27]</sup>



**Figura 14.** Redução de cetonas com  $\text{NaBH}_4$ .<sup>[27]</sup>

O  $\text{NaBH}_4$  é um agente redutor aquiral, e portanto, a transferência do hidreto ocorre dos dois lados do plano da carbonila, gerando um produto racêmico. O uso de reagentes quirais leva à seleção de um dos lados da geometria trigonal plana da carbonila durante a transferência do hidreto, e assim, se obtém um estereocentro.<sup>[2,27,28]</sup> A modificação de agentes redutores aquirais,<sup>[59]</sup> bem como o uso de ligantes quirais<sup>[60]</sup> vêm sendo reportados recentemente na literatura como catalisadores assimétricos em reações de redução.<sup>[2]</sup> Entretanto, tais metodologias utilizam compostos que podem ser tóxicos, além de possuírem um custo elevado, e de necessitarem de condições reacionais extremas, como alta temperatura e meios ácido ou básico, sem mencionar o árduo trabalho sintético, em inúmeras etapas.<sup>[3,18,20,28,61]</sup>

A utilização de biocatalisadores em reações de redução de compostos carbonílicos surge como a melhor estratégia para a obtenção de álcoois com alta enantiosseletividade, considerando que as enzimas possuem sítios

catalíticos com reconhecimento quiral. Dentre os muitos biocatalisadores utilizados na redução de carbonilas, as células íntegras de *S. cerevisiae* são, sem dúvida, as mais utilizadas.<sup>[4,7-11,43]</sup>

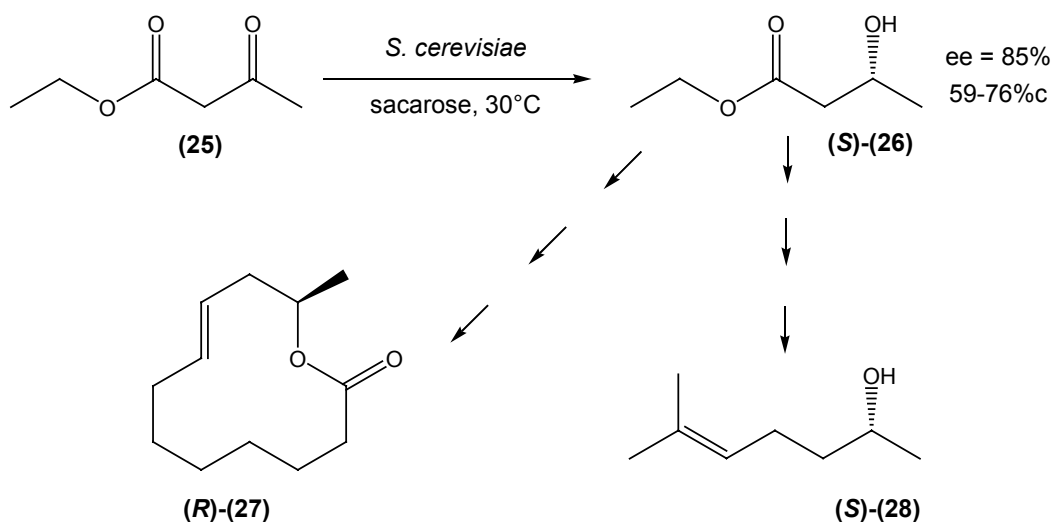
A levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo amplamente utilizado industrialmente na produção de biomassa, etanol, alimentos, proteínas recombinantes, fármacos, vacinas entre outros produtos de interesse comercial.<sup>[62]</sup> Recentemente, a utilização deste microrganismo vem recebendo grande destaque devido a sua importante participação na obtenção do bioetanol. Muitos estudos vêm sendo realizados no país visando a redução dos custos de produção nas usinas de açúcar e álcool, otimizando o processo de fermentação da cana-de-açúcar através do uso de novas cepas de *S. cerevisiae*. Leveduras com maior capacidade floculante, que crescem de maneira agrupada, vêm sendo selecionadas das próprias usinas sucroalcooleiras. Com o uso destas cepas, elimina-se a necessidade de centrifugação ao final da fermentação, reduzindo custos na produção do biocombustível. A caracterização de cepas industriais também vem sendo realizada a fim de avaliar o potencial cinético e determinar a composição celular das leveduras.<sup>[63]</sup>

O uso de *S. cerevisiae* para mediar reações orgânicas tem sido explorado há aproximadamente um século<sup>[19]</sup> e suas células íntegras têm sido o biocatalisador mais popularmente utilizado na redução assimétrica de compostos carbonílicos.<sup>[4]</sup> A ação redutora desta levedura foi observada primeiramente por Dumas em 1874, que adicionou enxofre a uma suspensão de fermento biológico em solução de açúcar e verificou o desprendimento de sulfeto de hidrogênio.<sup>[64]</sup>

O fermento de pão é um biocatalisador particularmente valioso, pois possui certa tolerância a compostos orgânicos e a ocorrência de reações colaterais é praticamente inexistente.<sup>[19,65]</sup> As proteínas produzidas por esta levedura que catalisam reduções de cetonas e aldeídos possuem freqüentemente alta eficiência e estereosseletividade. O procedimento destas

reduções é simples de ser realizado, as células são de baixo custo e a técnica pode ser aplicada a vários compostos carbonílicos.<sup>[66]</sup>

Um dos compostos mais comumente reduzidos por *S. cerevisiae* é o acetoacetato de etila (**25**), formando o (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**). Este composto é um bloco de construção quiral para a síntese de inúmeros produtos naturais. A **Figura 15** ilustra alguns destes produtos naturais (**27** e **28**) que são obtidos a partir da redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila.<sup>[9]</sup>



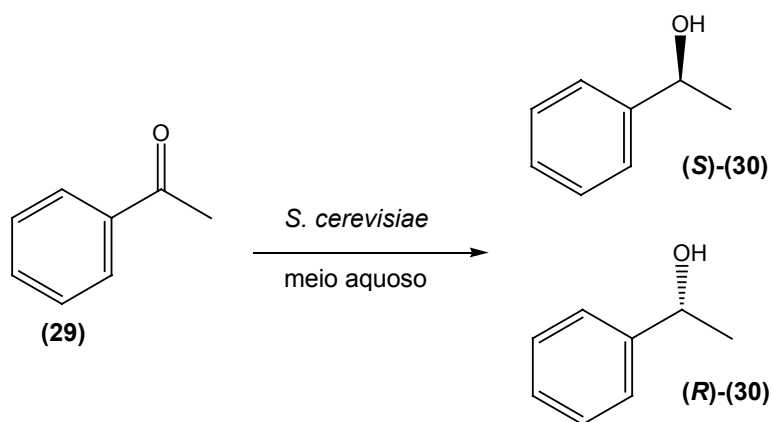
**Figura 15.** Redução do acetoacetato de etila (**25**) produzindo o (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**), material de partida para a síntese da (R)-(+)-recifeolida (**27**) e do (S)-(+)-sulcatol (**28**).<sup>[9]</sup>

A fim de obter um biocatalisador enantiosseletivo e de fácil manuseio para reduzir cetonas, Molinari e *col.* compararam a eficiência das células de *S. cerevisiae* e de outras leveduras quando utilizadas na forma fresca ou liofilizada, na redução do acetoacetato de etila (**25**) e da acetofenona (**29**), entre outras cetonas de interesse sintético. As reações foram realizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. As células frescas do fermento de pão reduziram o β-cetoéster **25** com 90% de conversão ao álcool quiral (S)-**26** (ee > 98%), enquanto as células liofilizadas converteram apenas 20% do substrato **25**, produzindo o álcool (S)-**26** com ee = 75%. Somente as células



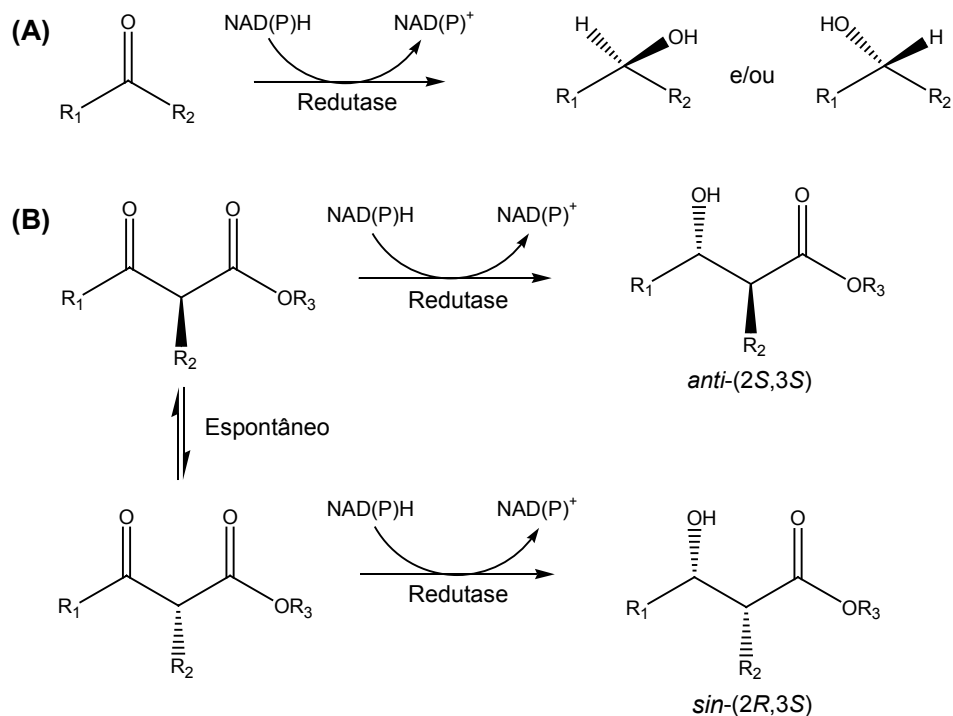
frescas reduziram a acetofenona (**29**), convertendo menos de 5% do substrato, indicando que o processo de liofilização comprometeu a atividade catalítica da levedura.<sup>[67]</sup>

Utilizando as células íntegras de *S. cerevisiae*, Brzezinská-Rodak e *col.* reduziram a acetofenona (**29**) em meio aquoso. Variando o tipo e a quantidade de co-solvente no meio reacional, foi possível obter em reações diferentes os dois álcoois quirais (*S*)- e (*R*)-1-feniletanol (**30**) com alta seletividade (*ee* > 98%), e com conversões entre 40 e 80% (**Figura 16**).<sup>[55]</sup>



**Figura 16.** Redução da acetofenona (**29**) mediada por *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>[55]</sup>

Dois tipos de estereosseletividade podem ser relevantes na redução de cetonas. A enantioseletividade é governada pela geometria da adição do hidreto e é reconhecida pela configuração do álcool formado. Já a diastereosseletividade se refere à relação entre o álcool formado e o centro quiral já existente na molécula. No caso de  $\beta$ -cetoésteres com um substituinte no C2, ocorre racemização espontânea nesta posição, de forma que uma redutase diastereosseletiva pode converter um  $\beta$ -cetoéster inicialmente racêmico em um único  $\beta$ -hidroxiéster diastereoisomérico (**Figura 17**).<sup>[19]</sup>



**Figura 17.** Estereosseletividade na redução de carbonilas de cetonas. (A) enantiosseletividade e (B) diastereosseletividade.<sup>[19]</sup>

Em geral, as redutases de leveduras possuem estereosseletividade bastante alta e a maioria é específica para NADPH. Quando uma única enzima domina a redução de um composto carbonílico em particular, o uso das células de fermento de pão pode fornecer o correspondente álcool quiral com elevada pureza óptica.<sup>[19]</sup> Entretanto, em muitos casos, diversas redutases presentes nas células do biocatalisador podem estar participando na redução de determinadas cetonas. Por possuírem diferentes enantiosseletividades, as várias redutases diminuem a pureza óptica dos produtos e misturas de estereoisômeros podem resultar das reações catalisadas por células íntegras.<sup>[66,68]</sup>

Shieh e *col.* purificaram três enzimas dependentes de NADPH do citosol de *S. cerevisiae* capazes de reduzir ésteres 4-cloroacetoacéticos com elevada pureza enantiomérica (ee > 97%). Duas delas forneceram álcoois de configuração D e foram caracterizadas como ácido graxo sintase e enzima D. A

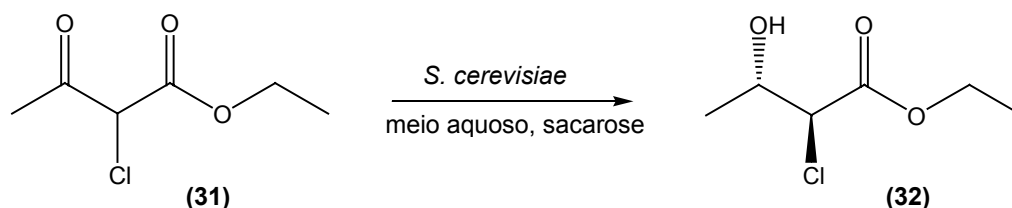
outra foi caracterizada como enzima L, produtora de álcoois com configuração L. Um estudo cinético foi realizado com estes biocatalisadores, sendo determinada a constante de velocidade ( $k_{cat}$ ) e o  $K_m$  para diferentes  $\beta$ -cetoésteres. Os resultados indicaram que o aumento da cadeia carbônica do éster diminui o valor de  $k_{cat}/K_m$  da ácido graxo sintase. Ao contrário, para a enzima L, a relação  $k_{cat}/K_m$  aumenta com o aumento da cadeia carbônica, indicando uma maior especificidade desta enzima por  $\beta$ -cetoésteres de cadeia maior.<sup>[69]</sup>

Algumas estratégias visando melhorar a estereosseletividade da redução de cetonas mediadas pelo fermento de pão têm sido exploradas, normalmente através da redução seletiva da atividade catalítica das redutases que fornecem produtos indesejáveis.<sup>[68]</sup> Os exemplos incluem a modificação do substrato carbonílico, mudanças da fonte de carbono ou das condições de cultivo do microrganismo, tratamentos térmicos, uso de inibidores enzimáticos ou o uso de sistemas bifásicos.<sup>[19]</sup> Outra estratégia é a de reduzir a concentração do substrato carbonílico no meio reacional, evitando a morte celular causada pela toxicidade do excesso de substrato, favorecendo as enzimas com menor  $K_m$ .<sup>[23,70]</sup>

Várias metodologias vêm sendo desenvolvidas atualmente para superar esses problemas de seletividade. O uso de enzimas purificadas na redução de carbonilas evitaria os problemas associados à catálise competitiva e, por isso, muitas redutases de *S. cerevisiae* vêm sendo purificadas.<sup>[3,20]</sup> Porém, a álcool desidrogenase de levedura purificada disponível comercialmente aceita somente um número limitado de cetonas como substrato<sup>[66]</sup> e, além disso, as redutases requerem cofatores reduzidos que devem ser fornecidos em quantidades estequiométricas - tornando o sistema economicamente inviável - ou através de um sistema de regeneração com adição de co-substratos.<sup>[4,20,48]</sup>

A ocorrência de reações paralelas durante a redução também pode ser um problema associado ao uso de células íntegras. Recentemente, Jörg e *col.* investigaram a biotransformação do 2-cloroacetoacetato de etila (**31**) mediada

por *S. cerevisiae*. Devido ao estresse causado pela toxicidade do substrato às células, reações competitivas foram observadas, tais como desalogenação, hidrólise do grupamento éster e condensação *retro*-Claisen. A obtenção do produto de redução (2*R*,3*S*)-2-cloro-3-hidroxiacetato de etila (**32**) foi bastante comprometida (**Figura 18**).<sup>[71]</sup>



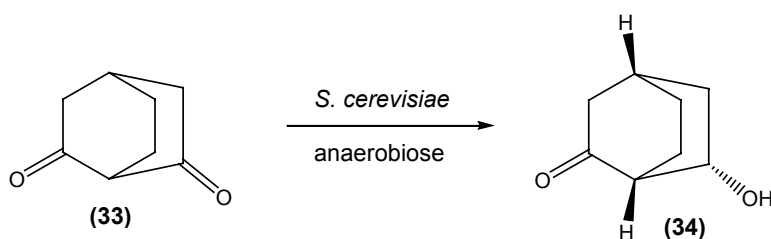
**Figura 18.** Redução do 2-cloroacetoacetato de etila (**31**) mediada por *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>[71]</sup>

Estas complicações experimentais têm inspirado a busca por métodos que melhorem a enantiosseletividade de reduções de carbonilas utilizando células íntegras de leveduras, já que estas fornecem a fonte de enzima e de cofator. Uma tendência emergente na aplicação do fermento de pão em síntese orgânica é a criação de novas cepas expressando enzimas heterólogas, simplificando o uso das proteínas dependentes de cofatores.<sup>[19]</sup> Entretanto, o importante para melhorar a seletividade de reduções mediadas por células íntegras é garantir condições onde somente poucas enzimas sejam capazes de reduzir o substrato carbonílico.<sup>[66]</sup>

Atingir simultaneamente alta enantiosseletividade e uma ampla especificidade por substratos distintos, assim como alta velocidade e rendimento, são os aspectos mais importantes da catálise quiral<sup>[6]</sup> e um desafio atual para os pesquisadores.<sup>[20,72]</sup> A engenharia genética representa um método alternativo para melhorar a estereosseletividade de reduções mediadas por células íntegras de leveduras. Comparada às estratégias como mudanças nas condições de cultivo ou inibição e ativação de enzimas específicas, o aumento da estereosseletividade através de técnicas de DNA recombinante requer o investimento de um tempo inicial maior para a construção da cepa,

mas, em compensação, uma vez modificada, é utilizada de forma simples como a levedura selvagem.<sup>[66]</sup>

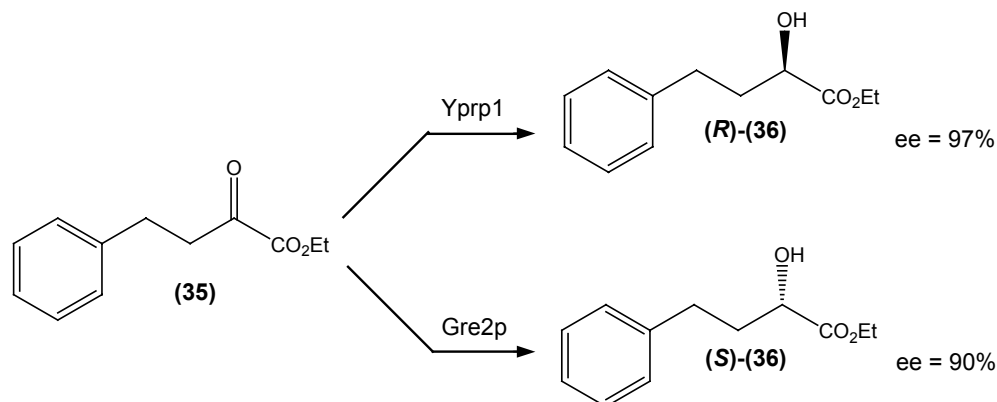
Katz e *col.* identificaram as principais redutases de *S. cerevisiae* envolvidas na redução do biciclo[2,2,2]octano-2,6-diona (**33**). As redutases foram expressas (sozinhas ou combinadas) com o uso de um promotor constitutivo forte em cepas com baixa atividade glicolítica, resultando em um sistema rápido de biorredução estereosseletivo com células íntegras (**Figura 19**), em batelada e em anaerobiose. A velocidade da via glicolítica decresceu através da diminuição da atividade da glicose-6-fosfato isomerase e da deleção da álcool desidrogenase (*ADH1*).<sup>[30]</sup>



**Figura 19.** Redução do biciclo[2,2,2]octano-2,6-diona (**33**) ao cetoálcool quiral (1*R*,4*S*,6*S*)-6-hidróxiciclo[2.2.2]octano-2-ona (**34**).<sup>[30]</sup>

Rodríguez e *col.* postularam que as principais redutases envolvidas na redução de  $\beta$ -cetoésteres são: ácido graxo sintase (*FAS1*), que aceita somente  $\beta$ -cetoésteres sem substituição na posição  $\alpha$ , fornecendo o álcool (*R*) correspondente; aldo-ceto redutase (*Ypr1p*); e a  $\alpha$ -acetóxi redutase (*Gre2p*). As duas últimas aceitam  $\beta$ -cetoésteres  $\alpha$ -substituídos e produzem o álcool (3*S*) correspondente. Entretanto, elas diferem na diastereosseletividade. A *Ypr1p* fornece o produto *sin* e a *Gre2p* o *anti* para a maioria dos substratos.<sup>[66]</sup>

Kaluzna e *col.* realizaram uma triagem a fim de identificar as desidrogenases de *S. cerevisiae* responsáveis pela redução do 2-oxo-4-fenilbutirato de etila (**35**) na presença de NADH e de NADPH. Duas enzimas reduziram rapidamente o  $\alpha$ -cetoéster (**35**), *Ypr1* e *Gre2p*, fornecendo os álcoois (*R*)- e (*S*)-**36**, respectivamente, com alta seletividade (**Figura 20**).<sup>[73]</sup>



**Figura 20.** Redução do 2-oxo-4-fenilbutirato de etila (**35**).<sup>[73]</sup>

Rodríguez e *col.* testaram o aumento na enantiosseletividade associada às cepas modificadas geneticamente na redução de β-cetoésteres derivados do acetoacetato de etila (**25**). A alteração da concentração de ácido graxo sintase (genes *FAS1* e *FAS2*) dentro da célula causou uma grande mudança na estereosseletividade da reação. Quando a enzima foi sobreexpressa, o álcool (*R*)-**36** foi obtido com ee de 88%, bem maior quando comparado ao ee obtido com a cepa selvagem (70%). Quando o gene que codifica para esta enzima foi deletado, o isômero (*S*) é que foi produzido com alta pureza óptica (ee de 88%), invertendo a enantiosseletividade da reação. Quando o gene da aldeto redutase (*YPR1*) foi deletado, observou-se apenas uma pequena diminuição da quantidade do álcool (*S*)-**36** produzido (ee de 78%), indicando que essa enzima pouco contribui para a redução desse substrato nas cepas selvagens. Por outro lado, quando esse gene foi sobreexpresso, observou-se uma produção do álcool (*S*)-**36** bem maior (ee de 64%) do que com a cepa selvagem (ee de 30%).<sup>[68]</sup>

Apesar da grande capacidade e aparente simplicidade do uso de uma coleção de cepas deletadas para determinar qual enzima da levedura tem maior participação na redução de uma cetona específica, os resultados podem ser complicados pelo alto grau de redundâncias no genoma da levedura e pelas mudanças compensatórias de outras enzimas que mascaram o efeito da deleção de um único gene.<sup>[74]</sup> Analisando o genoma de *S. cerevisiae*, foram

identificadas 49 ORFs (*open reading frames*) cujas proteínas poderiam catalisar a redução de carbonilas. Cepas de leveduras que sobrepõem enzimas com estereosseletividade desejada fornecem uma estratégia complementar para aumentar a estereosseletividade de reduções mediadas por células íntegras.<sup>[19]</sup>

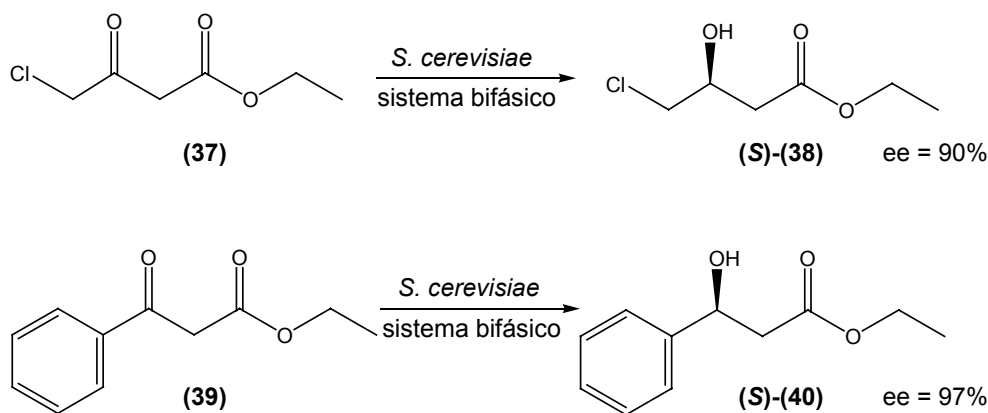
Outra alternativa para usar as redutases de *S. cerevisiae* na síntese orgânica assimétrica, evitando a formação de produtos indesejáveis de redutases competitivas, é usar uma célula hospedeira de um organismo com poucas redutases endógenas, como a bactéria *Escherichia coli*.<sup>[75]</sup>

A fim de avaliar a enantioseletividade das enzimas isoladas, Kaluzna e *col.*, superproduziram 18 redutases de *S. cerevisiae* em *E. coli*, e as utilizaram na redução de  $\beta$ -e  $\alpha$ -cetoésteres. Diversos substratos foram testados e os resultados obtidos demonstram claramente que a baixa seletividade obtida com as células íntegras de *S. cerevisiae* para alguns substratos ocorre devido à atuação de muitas redutases simultaneamente, sobrepondo as estereosseletividades individuais. As 18 enzimas isoladas forneceram álcoois com ee  $\geq 90$  %, mostrando-se altamente seletivas na redução dos diferentes  $\beta$ -e  $\alpha$ -cetoésteres. Os autores também observaram que duas redutases (YNL274c e YPL275w) convertem somente os substratos menores, enquanto as demais enzimas aceitaram uma maior variedade de moléculas, embora possuam estereosseletividades diferentes. Para um dos substratos, o acetobutanoato de etila, três redutases forneceram o álcool de configuração D, enquanto a redução do mesmo composto com as células íntegras de *S. cerevisiae* fornece o álcool L.<sup>[76]</sup>

Estes resultados indicaram que outras redutases produzidas pela levedura ainda devem ser isoladas e identificadas, a fim de se empregar a mais específica redutase para cada substrato, fornecendo blocos de construção quirais de elevada pureza óptica.<sup>[76]</sup>

Ema e *col.* identificaram, clonaram e expressaram em *E. coli* o gene que codifica para a carbonil redutase de *S. cerevisiae* (*GRE2*). Esta enzima mostrou-se bastante versátil, apresentando alta enantiosseletividade para uma grande variedade de cetonas. A bactéria recombinante produtora de carbonil redutase e de glicose desidrogenase (usada na regeneração do cofator) aparece como um biocatalisador simples de ser utilizado e reduziu 8 das 16 cetonas testadas com ee > 98%.<sup>[77]</sup>

Recentemente, uma cepa recombinante de *S. cerevisiae*, sobreexpressando a ácido graxo sintase da própria levedura e a glicose desidrogenase de *Bacillus subtilis*, foi utilizada na redução enantiosseletiva do 4-cloroacetoacetato de etila (**37**), produzindo o álcool (S)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de etila (**38**), e do benzoilacetato de etila (**39**), produzindo o (S)-3-hidroxi-fenilpropanoato de etila (**40**), precursor da fluoxetina. As condições reacionais foram otimizadas, e 100% de conversão do substrato **37** foi obtida com apenas 8 h de reação em sistema bifásico (água/acetato de *n*-butila), produzindo o álcool (S)-**38** com 94% de rendimento e ee = 90%. Sem adição de solvente orgânico, o benzoilacetato de etila (**37**) foi quase totalmente convertido, em 48 h de reação, e o produto de configuração (S)-**40** foi obtido com 74% de rendimento bruto e 97% de ee (**Figura 21**).<sup>[78]</sup>



**Figura 21.** Redução do 4-cloroacetoacetato de etila (**37**) e do benzoilacetato de etila (**39**).<sup>[78]</sup>



Em um outro estudo, Milagre e *col.* utilizaram as células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio na redução do benzoilacetato de etila (**39**) em tampão fosfato (pH 4,5). Glicose foi adicionada ao meio reacional como doador de elétrons para a regeneração dos cofatores. O álcool S-(**40**) foi obtido com conversões > 97% e ee > 95%.<sup>[79]</sup>

## 1.6 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Em *S. cerevisiae* a síntese de proteínas mitocondriais, como as desidrogenases, é influenciada pelas condições de cultivo, como a disponibilidade de oxigênio e o tipo de fonte de carbono. Durante o crescimento anaeróbico ou na presença de fontes de carbono fermentáveis (especialmente a glicose) sua síntese é reprimida. Na presença de oxigênio e na ausência de açúcares repressores, a transcrição de genes envolvidos na síntese dessas proteínas é induzida.<sup>[80-84]</sup>

O habitat da levedura *S. cerevisiae* é rico em nutrientes, e durante o seu crescimento este microrganismo modifica as condições desse habitat, consumindo nutrientes e excretando produtos. A célula de levedura encontra-se bem adaptada para manter uma alta velocidade de crescimento mesmo após estas mudanças, o que está diretamente relacionado à capacidade de regular a expressão de genes apropriados ao regime nutricional em que a célula se encontra. A expressão de genes e a consequente síntese de proteínas são diretamente influenciadas pelas condições nutricionais.<sup>[84]</sup>

A função reguladora da glicose no metabolismo de carboidratos em *S. cerevisiae* é particularmente importante. Quando este açúcar está presente, a expressão de enzimas que degradam outros açúcares (incluindo a  $\alpha$ -glicosidase), assim como a gliconeogênese, passam a ser inibidas, e este mecanismo é conhecido como repressão catabólica ou repressão pela glicose. A análise da repressão causada pela glicose revela o envolvimento de diversas proteínas, e tanto o transporte deste açúcar como a fosforilação durante a

glicólise, são etapas importantes nas vias de sinalização e utilização da glicose.<sup>[81]</sup>

Em cultivo contínuo, *S. cerevisiae* exibe dois comportamentos de crescimento distintos sob condições aeróbicas. Quando a vazão de alimentação é baixa e uma menor concentração de substrato é fornecida às células, o crescimento é totalmente oxidativo, sendo os principais produtos CO<sub>2</sub> e biomassa. Quando o meio de cultura passa a ser fornecido com maior vazão, o crescimento passa a exibir um perfil fermentativo, com produção de etanol. Este fenômeno é chamado de efeito *Cabtree* e acredita-se que a ocorrência de fermentação alcoólica, apesar das condições aeróbicas, é função da inibição da cadeia respiratória e de diversas enzimas do ciclo de Krebs, causada pela glicose (repressão catabólica).<sup>[82]</sup> O efeito Pasteur, onde o microrganismo prefere respirar na presença de oxigênio a fim de obter mais ATP, não ocorre em *S. cerevisiae*<sup>[83]</sup> e inclusive células cultivadas em baixas concentrações de glicose, com metabolismo completamente oxidativo, apresentam uma notável capacidade fermentativa quando submetidas a altas concentrações de açúcar. Este comportamento permite que a levedura possa responder rapidamente a flutuações na quantidade de oxigênio disponível.<sup>[85]</sup>

A levedura *S. cerevisiae* é capaz de utilizar diferentes fontes de carbono, dependendo da presença de genes específicos que codificam para as enzimas necessárias para a captação, bem como para o metabolismo destas fontes de carbono.<sup>[81]</sup> O metabolismo do lactato tem sido extensamente estudado neste microrganismo.<sup>[86]</sup> Em condições aeróbicas a levedura pode metabolizar diferentes ácidos carboxílicos de cadeia curta, como o láctico. A primeira etapa no metabolismo do L e do D-lactato é o seu transporte através da membrana plasmática, um processo de co-transporte com entrada de prótons, mediado pela lactato permease, proteína codificada pelo gene *JEN1*.<sup>[87]</sup>

O L e o D-lactato são então oxidados estereoespecificamente a piruvato, e esta reação é mediada por duas enzimas mitocondriais; a L-(+)-lactato ferrocitocromo C oxidorreductase (ou citocromo b2; E.C. 1.1.2.3), codificada pelo

gene *CYB2* e localizada na matriz mitocondrial, e a D-lactato ferrocitocromo C oxidorreductase (ou D-LCR; E.C. 1.1.2.4), codificada pelo gene *DLD1*, localizada na membrana interna e que gera ATP a partir do D-lactato.<sup>[88]</sup> Esta reação está intimamente ligada à cadeia respiratória via citocromo C, acceptor final de elétrons na oxidação do lactato. A expressão dos genes *CYB2* e *DLD1* é regulada pela disponibilidade de oxigênio, pelo grupo heme e pela fonte de carbono.<sup>[87]</sup>

A síntese de D-lactato no citosol, onde está localizada a D-lactato desidrogenase codificada pelo gene *DLD3* (E.C. 1.1.1.28), foi reportada em leveduras, mas sua função ainda não foi esclarecida.<sup>[88]</sup> As D- e L-lactato desidrogenases são estereoespecíficas em sua atividade catalítica e induzidas por D e L-lactato, respectivamente. Ambas são controladas pela repressão catabólica da glicose e não estão presentes nas células crescidas sob condições anaeróbicas, sendo fortemente induzidas durante a aerobiose e na presença de substratos “respiráveis” como etanol e lactato.<sup>[86]</sup> Células crescidas em glicose também não expressam o gene *JEN1*, mas quando incubadas em meio contendo ácido láctico, o RNA mensageiro correspondente a esse gene é detectado. Da mesma forma, a adição de glicose em culturas crescidas em ácido láctico promove um rápido declínio dos níveis de RNA mensageiro de *JEN1* e a conseqüente inativação irreversível da lactato permease.<sup>[89]</sup>

Atualmente a levedura *S. cerevisiae* é reconhecida como um organismo modelo,<sup>[21,74,81]</sup> pois trata-se de um eucarioto simples cujo genoma pode ser facilmente manipulado. Estudos sobre a função de genes de mamíferos são freqüentemente feitos em *S. cerevisiae*, que ao contrário da maioria dos microrganismos, pode ser haplóide, diplóide ou poliplóide. Algumas propriedades que tornam as leveduras bastante adequadas para estudos biológicos incluem o rápido crescimento celular, a facilidade no isolamento de mutantes, além de possuir um sistema de transformação de DNA bastante versátil.<sup>[90]</sup>

Diferentes modificações metabólicas podem ser realizadas em células de *S. cerevisiae*, obtendo-se assim cepas específicas da levedura, para a produção de substâncias de valor comercial interessante, além das leveduras utilizadas na produção de vinhos e cervejas, que há muito tempo vêm sendo selecionadas geneticamente. Por exemplo, o ácido láctico pode ser produzido em grandes quantidades por *S. cerevisiae* expressando um gene da lactato desidrogenase de mamífero.<sup>[62]</sup>

### 1.7 Reações de Redução em Solvente Orgânico

A biocatálise em meio orgânico foi desenvolvida devido à baixa solubilidade em água de muitos compostos orgânicos de interesse comercial com potencial para serem transformados por enzimas e microrganismos.<sup>[91]</sup> A principal vantagem associada ao uso de solventes orgânicos em reações biocatalíticas, substituindo o ambiente aquoso tradicionalmente utilizado, é a simplicidade com a qual o produto pode ser recuperado.<sup>[92,93]</sup> Além disso, a redução em meio orgânico pode fornecer rendimentos mais altos quando comparados ao sistema aquoso,<sup>[94,95]</sup> bem como diminuir a possibilidade de reações colaterais e a formação de subprodutos.<sup>[96,97]</sup>

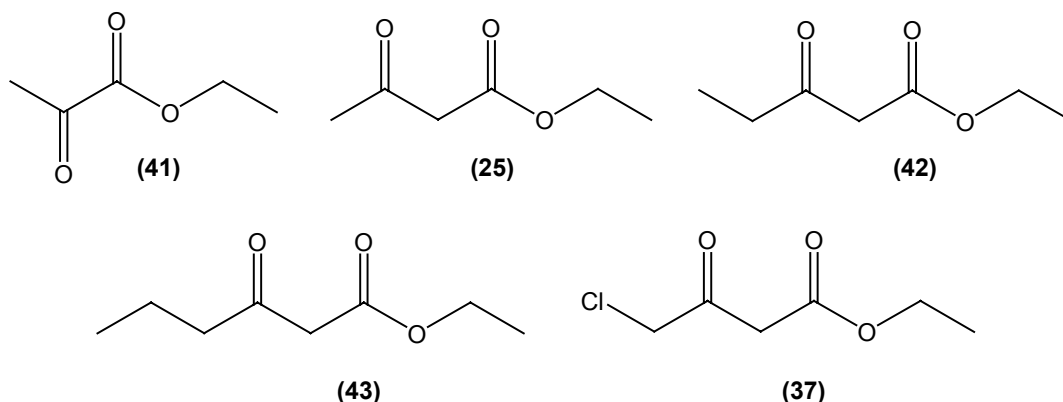
Enzimas hidrolíticas como lipases e proteases são conhecidas por reter sua atividade em solvente orgânico.<sup>[34,37]</sup> As oxidoredutases, ao contrário das hidrolases, precisam da assistência de coenzimas em quantidades estequiométricas,<sup>[4]</sup> e quando ocorrem danos à membrana hidrofílica do microrganismo, a regeneração dos cofatores pode não ser garantida.

A membrana celular de *S. cerevisiae* é uma estrutura complexa e dinâmica, composta por lipídios, glicoproteínas e polissacarídeos.<sup>[98]</sup> Os solventes orgânicos podem causar danos irreversíveis à esta estrutura, pois se incorporam às membranas lipídicas comprometendo suas principais funções, interrompendo mecanismos de transporte, além de causar a inativação de enzimas ligadas à membrana.<sup>[91]</sup>

A forma de garantir a viabilidade celular em meio orgânico está na adição de uma pequena quantidade de água, capaz de proteger a integridade das células, mantendo a estrutura tridimensional das enzimas de interesse, já que nenhum processo de redução ocorre na completa ausência de água. Entretanto, a quantidade de água adicionada deve ser controlada, pois o excesso também diminui a eficiência da redução.<sup>[99]</sup>

Em um estudo pioneiro, North utilizou uma suspensão de *S. cerevisiae* em éter de petróleo para a redução de  $\beta$ -cetoésteres. O fermento de pão reduziu todos os substratos testados com alta estereoespecificidade e o uso do éter de petróleo como meio reacional forneceu um dos produtos com enantiosseletividade invertida, quando comparado com a reação realizada em água.<sup>[93]</sup>

Rotthaus e *col.* investigaram a redução de uma série de  $\alpha$ - e  $\beta$ -cetoésteres (**25**, **37**, **41-43**) mediada por *S. cerevisiae* em éter dietílico, tolueno, *n*-hexano e acetato de etila, e compararam com as reações realizadas em água (**Figura 22**).<sup>[100]</sup>



**Figura 22.** Substratos testados por Rotthaus e *col.*<sup>[100]</sup>

Os autores observaram mudanças significativas na enantiosseletividade das células de *S. cerevisiae* quando utilizadas em meio orgânico. Na redução do composto **37**, o álcool (*R*)-**38** foi obtido em solvente orgânico enquanto o

(S)-**38** foi formado em meio aquoso. Na redução do acetoacetato de etila (**25**), os maiores excessos enantioméricos foram obtidos em meio orgânico apolar, com ee > 99% em *n*-hexano e tolueno. Nestes dois solventes as conversões foram de 100%, assim como em meio aquoso, para a redução de todos os substratos.<sup>[100]</sup>

Estes resultados indicam que o uso de solventes apolares na redução de compostos carbonílicos mediada por *S. cerevisiae* é o mais adequado, evidenciando que mudanças desejadas na enantiosseletividade de algumas reações podem ser alcançadas com a mudança do meio reacional.<sup>[100]</sup>

Os critérios mais importantes na seleção do solvente orgânico para ser utilizado em reações biocatalíticas são a capacidade de recuperação do produto e a biocompatibilidade. Os parâmetros utilizados para classificar os solventes em termos de sua biocompatibilidade estão relacionados com sua polaridade.<sup>[91]</sup>

Laane e *col.* demonstraram a existência de uma correlação entre a atividade biocatalítica e o logaritmo do coeficiente de partição do solvente orgânico no sistema bifásico octanol-água (log P). De forma geral, a eficiência dos biocatalisadores em solventes orgânicos é normalmente baixa em solventes polares, com log P < 2, moderada em solventes com log P entre 2 e 4, e apresentam alta eficiência em solventes não polares com log P > 4. Esta correlação entre a polaridade do meio e atividade catalítica, relaciona a capacidade do solvente orgânico em alterar a camada de água que permanece ao redor do biocatalisador, essencial para a manutenção de sua atividade catalítica.<sup>[96]</sup>

Em outro estudo, Molinari e *col.* empregaram diversos microrganismos na redução das  $\beta$ - e  $\gamma$ -nitroacetonas **44** e **45** em água, em solventes orgânicos (*n*-hexano, benzeno, éter dibutílico) e em sistemas bifásicos. Os melhores resultados foram obtidos com as cepas de *Pichia minuta*, *P. etchellsii*, e *Kluyveromyces marxianus*, bem como com o fermento de pão, em sistema

bifásico, formando produtos com excessos enantioméricos mais altos (97%) do que com as reações realizadas em água (85-97%) (**Figura 23**).<sup>[101]</sup>



**Figura 23.** Redução das  $\beta$ - e  $\gamma$ -nitroacetonas **44** e **45**, produzindo os álcoois quirais **46** e **47**.<sup>[101]</sup>

Qun e *col.* investigaram a tolerância do fermento de pão livre e imobilizado em alginato de cálcio frente a oito solventes orgânicos diferentes: etanol, álcool *sec*-butílico, acetato de butila, *n*-hexano, *n*-heptano, *n*-octano, *n*-decano e dodecano. Os resultados indicaram que a tolerância do fermento imobilizado foi maior que a das células livres, aumentando com o aumento da hidrofobicidade do solvente. A retenção da atividade metabólica do FP imobilizado foi bastante baixa em solventes com  $\log P < 2$ , aumentando em 20-30% em solventes com  $\log P$  entre 2 e 4, como *n*-hexano e *n*-heptano. Em solventes com  $\log P > 4$ , as células mostraram-se ainda mais eficientes. Neste mesmo estudo, os autores verificaram que a 30°C a tolerância ao meio orgânico foi maior.<sup>[102]</sup>

## 1.8 Imobilização do Biocatalisador

Uma maneira eficiente de proteger as células do meio orgânico é através da imobilização.<sup>[39]</sup> As enzimas e os microrganismos estão sujeitos à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, como decorrência da estocagem ou mesmo durante o uso. Há assim, uma necessidade de estabilizar estes biocatalisadores, como meio de evitar sua inativação quando a reação ocorre em meio orgânico.<sup>[18]</sup> Portanto, para a manutenção da atividade catalítica, a

técnica de imobilização em diferentes suportes é uma das mais utilizadas na biocatálise, sendo bastante aplicada para mediar reações de interesse sintético em solventes orgânicos. A imobilização do biocatalisador, sem prejuízo de sua atividade por um razoável período de tempo, pode assegurar sua reciclagem e o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais.<sup>[4,40,103]</sup>

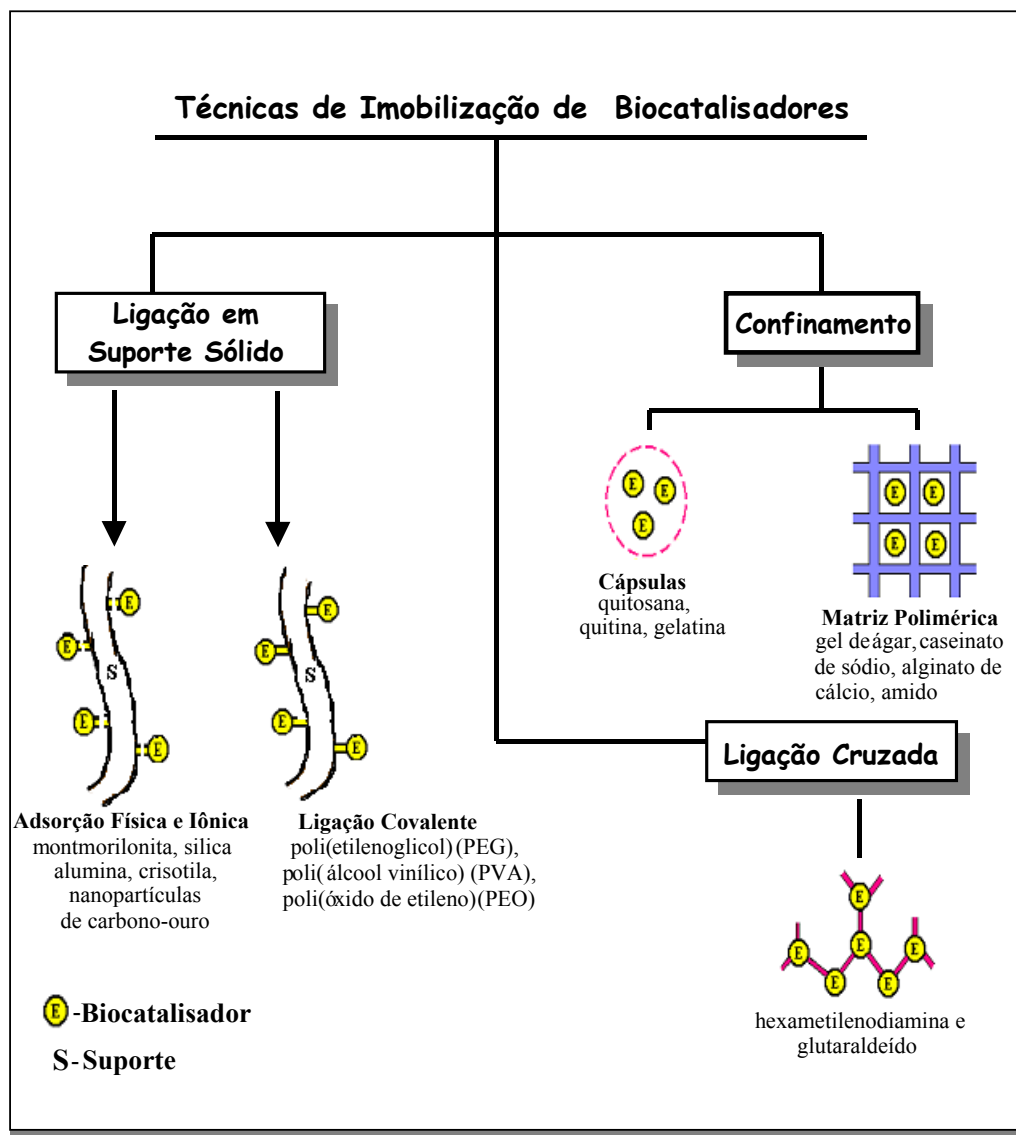
A fim de manter a máxima atividade biocatalítica, a imobilização deve ser realizada sob condições amenas.<sup>[104]</sup> Os materiais utilizados como suporte podem ser orgânicos ou inorgânicos, com diferentes propriedades e têm sido empregados com sucesso a fim de viabilizar a atuação dos biocatalisadores em meio orgânico.<sup>[4,38,41,105]</sup> Recentemente, foi reportado a imobilização de lipases em nanopartículas de sílica funcionalizada, nanocompósitos de sílica-ouro e em  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .<sup>[106-108]</sup> A utilização de líquidos iônicos, com formação de sistemas bi e trifásicos, também tem sido relatada como alternativa muito interessante para reações biocatalíticas.<sup>[37,109-114]</sup>

Muitos métodos de imobilização de biocatalisadores estão disponíveis. Os principais são os sistemas bifásicos, enzimas em suspensão (método de Klibanov), em micelas reversas, em géis, microencapsulados ou confinados em matrizes poliméricas, fisicamente imobilizados (adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel), ou ainda através de ligações cruzadas com o uso de um reagente multifuncional.<sup>[39-41,115]</sup> Os principais métodos de imobilização de enzimas estão esquematizados na **Figura 24**.<sup>[4]</sup>

A adsorção do biocatalisador em suporte macroscópico insolúvel em água é o método mais simples de imobilização<sup>[116]</sup> e pode ser aplicado para enzimas isoladas assim como para células íntegras.<sup>[18]</sup> As forças de adsorção são bastante variadas (forças de van der Waals, interações iônicas e ligações de hidrogênio) e relativamente fracas,<sup>[104]</sup> geralmente não interferindo na atividade enzimática.<sup>[4]</sup> Entretanto, o desprendimento do suporte pode ocorrer se pequenas mudanças reacionais são feitas, como a variação na concentração do substrato, temperatura ou no pH.<sup>[38,104]</sup> Diferentes materiais,



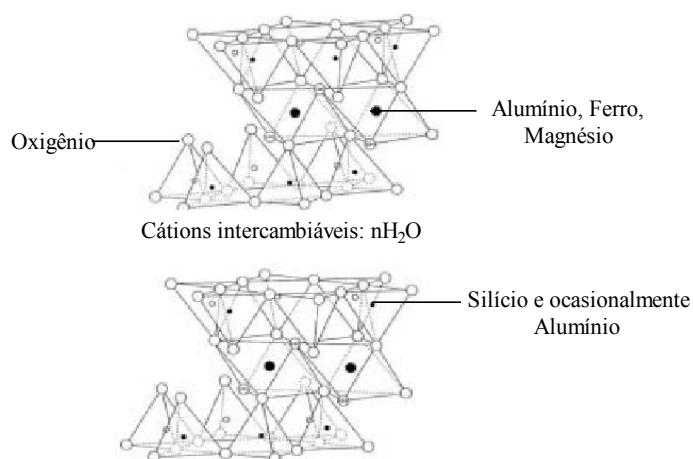
orgânicos e inorgânicos, podem ser empregados como suporte neste tipo de imobilização, tais como carvão ativado, silicatos, óxido de alumínio, géis poliméricos, terra diatomácea e celulose, entre outros.<sup>[39,41]</sup>



**Figura 24.** Métodos de imobilização de biocatalisadores (adaptada da referência 4).

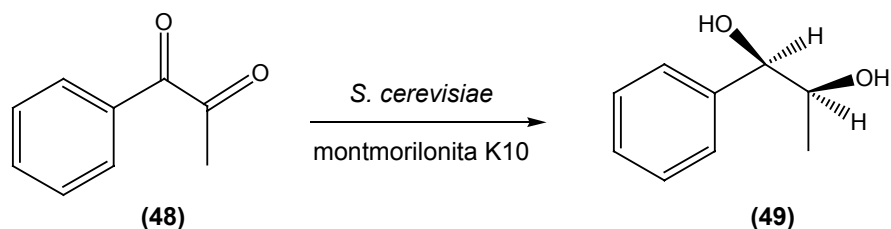
Os silicatos, formados naturalmente em camadas, são materiais cristalinos finamente particulados (comumente  $< 2 \mu\text{m}$ ), e são denominados argilas minerais.<sup>[117]</sup> A montmorilonita ( $M_x[Al_{2-x}M_{gx}](Si_4)O_{10}(OH)_2$ ), é uma argila também conhecida como bentonita, sendo o principal componente das cinzas

vulcânicas. Disponível comercialmente pela denominação Mont-K10, composta por camadas de aluminosilicatos, a montmorilonita é considerada um polieletrólito, pois entre as camadas, existem cátions intercambiáveis, normalmente com a água de hidratação. Esta argila é insolúvel em água, mas uma vez hidratada, tem uma enorme área superficial e aumenta até doze vezes seu tamanho, abrindo-se como uma esponja porosa.<sup>[118]</sup> As qualidades de adsorção da montmorilonita são a chave para suas inúmeras aplicações. Industrialmente, a montmorilonita é um dos silicatos mais comumente utilizados, em diferentes áreas, como farmacologia, armazenamento nuclear e catálise.<sup>[119]</sup> **(Figura 25).**<sup>[118]</sup>



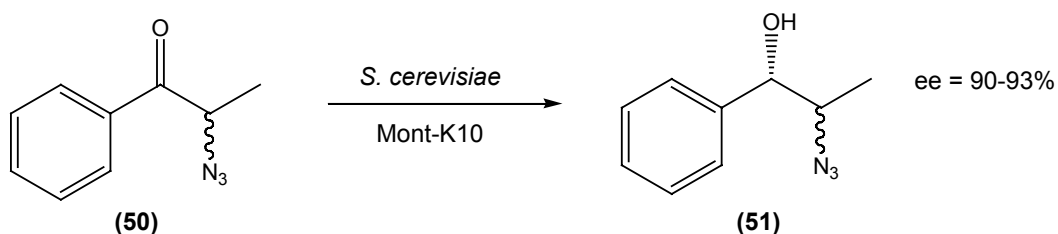
**Figura 25.** Estrutura da montmorilonita.<sup>[118]</sup>

Sorrilha e *col.* realizaram os primeiros estudos utilizando a montmorilonita como suporte para imobilização do fermento de pão na redução de fenilcetonas. Os autores também utilizaram a crisotila, um silicato magnésiano, para a imobilização deste microrganismo. Com a montmorilonita K10 (Mont-K10), foi possível reutilizar o biocatalisador por até oito vezes na reação de redução da 1-fenil-1,2-propanodiona (**48**) em meio aquoso **(Figura 26).**<sup>[120]</sup>



**Figura 26.** Redução da 1-fenil-1,2-propanodiona (48) e produção do diol 49.<sup>[120]</sup>

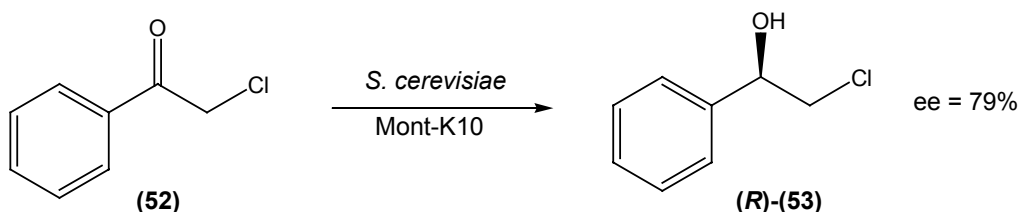
O mesmo grupo de pesquisa aplicou a metodologia na redução da  $\alpha$ -azidopropiofenona (50), gerando um azidoálcool quiral (51), precursor do aminoálcool correspondente. O rendimento químico das reações de redução e o ee aumentaram significativamente com o uso do biocatalisador imobilizado, quando comparado ao fermento livre. A Mont-K10 favoreceu a reutilização do sistema por até seis vezes, e a levedura manteve a mesma atividade catalítica. Já o biocatalisador imobilizado em crisotila manteve a atividade redutora até a terceira reutilização (Figura 27).<sup>[121]</sup>



**Figura 27.** Redução da  $\alpha$ -azidopropiofenona (50) mediada pelo fermento de pão imobilizado em montmorillonita K10.<sup>[121]</sup>

A redução enantiosseletiva de  $\alpha$ -haloacetofenonas apresenta grande potencial para a obtenção de halodrinhas quirais, blocos de construção para alguns produtos naturais e fármacos opticamente ativos.<sup>[122]</sup> Entretanto, a redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (52) mediada pelo fermento de pão tem sido freqüentemente realizada em meio aquoso.<sup>[120-123]</sup>

Recentemente, o nosso grupo de estudo utilizou a montmorilonita K10 como suporte na imobilização do fermento de pão em reações de redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila (**25**) e da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) em *n*-hexano.<sup>[17,18]</sup> Neste estudo, as células de FP foram recobertas ou não com gelatina, e utilizadas na presença ou ausência de solução de sacarose ou trealose. As células imobilizadas, recobertas por gelatina e com adição de solução de açúcar, mostraram-se mais estáveis em meio orgânico e formaram menos subprodutos. Na redução do acetoacetato de etila (**25**), o álcool (S)-(+)**(26)** foi obtido com ee > 99% até a quarta reutilização, com percentagem de conversão de 20%. Na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) obteve-se o (R)-(-)-2-cloro-1-feniletanol (**53**) após 72 h de reação com ee de 79% (**Figura 28**).<sup>[17]</sup>



**Figura 28.** Reação de redução biocatalítica da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) mediada pelo fermento de pão comercial.<sup>[17]</sup>

Um outro método de imobilização que vem sendo utilizado em biocatálise, apesar de não apresentar ligações e nem confinar fisicamente o biocatalisador, é o sistema bifásico.<sup>[4,124]</sup> Este sistema é formado por uma fase aquosa onde as células são suspensas, e por uma fase orgânica onde o substrato é solúvel, necessitando de agitação mecânica contínua para que a reação ocorra.<sup>[105]</sup> As principais vantagens deste método incluem a facilidade na separação do biocatalisador do produto obtido, a minimização da inibição da atividade biocatalítica causada pelo substrato e a presença da fase aquosa, mais favorável ao biocatalisador do que o meio orgânico.<sup>[125,126]</sup>

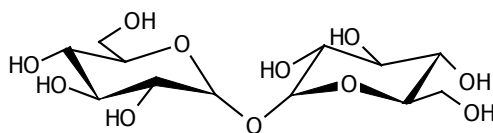
O sistema bifásico foi primeiramente utilizado por Cremonesi e *col.* em 1973, onde os autores testaram a atividade catalítica da  $\beta$ -hidroxiesteróide

desidrogenase na redução de esteróides. O biocatalisador manteve sua atividade por longo período em solventes orgânicos, tais como 1-butanol, diclorometano e éter etílico.<sup>[127]</sup> Em um estudo recente, Gröger e *col.* utilizaram o sistema bifásico na redução assimétrica de cetonas pouco solúveis em água, mediada pela (S)-álcool desidrogenase de *Rhodococcus erythropolis* superexpressa em *E. coli*, em presença da formato desidrogenase de *C. boidinii*. Com este sistema, o biocatalisador suportou altas concentrações de substrato (10-200 mM) e os excessos enantioméricos dos álcoois (S) foram superiores a 99%.<sup>[126]</sup>

Embora a maior parte dos estudos utilizando sistema bifásico tenha sido realizado com enzimas, o uso de células íntegras tem adquirido grande importância, especialmente em reações onde a regeneração do cofator é necessária.<sup>[91]</sup> Recentemente, um sistema de biorredução altamente seletivo, realizado em sistema bifásico composto por tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5 e dibutilftalato, foi utilizado por He e *col.* O substrato 4-cloroacetato de etila (**39**) (vide **Figura 21**) foi reduzido pelas células íntegras do fungo *Aureobasidium pullulans* ao correspondente álcool (S)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de etila (**40**) com ee de 97,7%.<sup>[128]</sup>

### 1.9 Efeito Protetor da Trealose

A trealose ( $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo) é um dissacarídeo não-redutor composto por duas moléculas de glicose unidas por ligações  $\alpha,\alpha$ -1,1-glicosídicas,<sup>[23,129,130]</sup> amplamente encontrado em bactérias, fungos e plantas<sup>[131-133]</sup> mas aparentemente ausente em vertebrados<sup>[134]</sup> (**Figura 29**).



**Figura 29.** Estrutura da trealose.

A síntese e a degradação de trealose são processos regulados por diversos mecanismos que se sobrepõem, tanto no que se refere à expressão de genes, quanto ao controle da atividade enzimática e disponibilidade de substratos.<sup>[135]</sup> Além disso, o metabolismo deste dissacarídeo tem um papel importante no controle da glicólise, atuando também como um sistema de ajuste fino na relação ATP/ADP em células sob estresse.<sup>[132]</sup>

Este dissacarídeo é a principal reserva de carboidratos em *S. cerevisiae* e pode representar até 23% do peso seco da célula, dependendo da fase de crescimento e das condições de cultivo,<sup>[130,131]</sup> podendo estar presente em grandes quantidades também em esporos fúngicos.<sup>[132]</sup>

Durante muito tempo acreditou-se que a trealose era um carboidrato de reserva.<sup>[130]</sup> Entretanto, o papel mais importante que a trealose desempenha nas células de levedura é de estabilizar a membrana celular em condições de estresse.<sup>[130,136]</sup> Demonstrada a sua relação com a termotolerância de fungos e leveduras, o estudo deste açúcar ganhou importância. Mais recentemente, verificou-se que os processos celulares nos quais a via biossintética da trealose está envolvida incluem até mecanismos de patogenicidade.<sup>[134]</sup>

Em leveduras a síntese e o acúmulo de trealose estão diretamente relacionados com o aumento de sua sobrevivência quando submetidas a diferentes situações de estresse, como desidratação, congelamento, alta concentração de etanol, oxigenação e carbonização.<sup>[135,137-140]</sup>

Na fabricação do fermento de pão, a trealose presente nas células protege-as da autólise, melhorando a atividade do fermento,<sup>[131,135]</sup> Na indústria cervejeira, o acúmulo de trealose facilita a adaptação das leveduras ao meio fermentativo.<sup>[137]</sup>

Sano e *col.* demonstraram que cerca de 2 a 3% de trealose é indispensável para a sobrevivência de leveduras de panificação. Os autores sugerem que a quantidade de trealose necessária para a desidratação é aquela capaz de cobrir completamente as células, substituindo toda água

anteriormente ligada. Também afirmam que este açúcar atua na reestruturação das células em água quando hidratadas, sendo este comportamento essencial na resistência de leveduras.<sup>[131]</sup>

Muitos mono e dissacarídeos possuem a habilidade de evitar a desnaturação térmica de proteínas.<sup>[141,142]</sup> Os grupos OH equatoriais presentes nas moléculas de açúcar são responsáveis por ordenar as moléculas de água, aumentando sua estruturação, protegendo as membranas protéicas quando expostas a altas temperaturas. A trealose possui um maior número de grupos OH equatoriais dentre os açúcares mais conhecidos, e apresenta um efeito protetor superior aos demais sacarídeos, polióis e aminoácidos.<sup>[131,136]</sup>

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito protetor da trealose. Na hipótese da substituição pela água, a estabilização da membrana seria devido à formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas do dissacarídeo e os grupos polares de fosfolipídios, substituindo as moléculas de água.<sup>[131,141]</sup> Estudos utilizando espectroscopia de infravermelho confirmam que a interação entre a trealose e o retículo sarcoplasmático ocorre devido a ligações de hidrogênio entre os grupos OH e os componentes polares da membrana (proteínas e fosfolipídios), similar ao que ocorre na interação de membranas com a água.<sup>[129,143]</sup> Assim, a integridade estrutural de membranas e proteínas pode ser mantida.

A hipótese da vitrificação baseia-se na habilidade da trealose de formar uma estrutura vítrea quando submetida à secagem sob certas condições.<sup>[138]</sup> A água livre é removida e uma solução aquosa concentrada de açúcar permanece. Se esta mistura é vitrificada, as membranas celulares serão encapsuladas e, conseqüentemente, protegidas.<sup>[131]</sup> O estado vítreo, caracterizado pela baixa mobilidade molecular, seria o responsável pela longa estabilidade dos materiais biológicos protegidos por trealose.<sup>[138]</sup>

Lodato e *col.* demonstraram que a adição de trealose ou maltose aumenta a resistência das células ao tratamento térmico. Eles verificaram que os fatores críticos para a sobrevivência de leveduras submetidas ao tratamento

térmico são a presença e a concentração de dissacarídeos durante os processos de desidratação e congelamento, bem como a quantidade de umidade do sistema.<sup>[138]</sup>

A partir do que vem sendo reportado na literatura sobre a estreita relação da trealose com mecanismos de proteção de leveduras, quando submetidas a diferentes situações de estresse, pode-se considerar que este dissacarídeo apresenta um excelente potencial para ser utilizado na proteção das células de *S. cerevisiae* em reações biocatalíticas em meio orgânico. A interação dos grupos OH do açúcar com a membrana celular do biocatalisador formaria uma camada protetora, evitando o contato direto com o solvente orgânico, mantendo assim a atividade catalítica.

### **1.10 Métodos Analíticos para a Determinação da Enantiosseletividade**

Os enantiômeros possuem propriedades físicas idênticas (ponto de ebulição e fusão, solubilidade), exceto o desvio da luz plano polarizada.<sup>[144]</sup> Apresentam propriedades químicas idênticas (comportamento cromatográfico e espectroscópico), com exceção das reações com outros compostos opticamente ativos, ou seja, quando se tem uma influência quiral externa. Portanto, a separação de enantiômeros de uma mistura representa um desafio, sendo necessário um ambiente quiral capaz de reconhecer e diferenciar as duas moléculas. A cromatografia gasosa e métodos espectroscópicos de análise devem ser modificados para se ter uma influência quiral externa.<sup>[144-147]</sup> Somente assim os enantiômeros terão comportamentos diferentes um do outro e a análise será possível.<sup>[146]</sup>

#### **1.10.1 Métodos Polarimétricos**

O método clássico de determinação da pureza enantiomérica de uma amostra é medir sua pureza ótica usando um polarímetro. Determina-se assim



o ângulo de rotação ótica experimental da amostra e este é convertido para a rotação ótica específica  $[\alpha]_D^T$ , grandeza característica de cada substância óticamente ativa (**Equação 1**).<sup>[146]</sup>

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad (1)$$

onde:

$[\alpha]_D^T$  = rotação ótica específica

$\alpha$  = rotação ótica observada

$l$  = comprimento da cela polarimétrica, em dm

$c$  = concentração da solução, em g de soluto por cm<sup>3</sup> de solvente

$T$  = temperatura em °C

$D$  = comprimento de onda de emissão da linha D do sódio (589 nm)

A medida da rotação ótica de uma amostra deve ser realizada sob condições definidas de temperatura, solvente, concentração e em um dado comprimento de onda de incidência da luz plano polarizada. Estes valores podem ser comparados com rotações conhecidas de amostras enantiomericamente puras de alguns compostos, medidos sob condições idênticas. Este valor é comumente denominado de pureza ótica. Se a medida for realizada sob condições rigorosamente controladas e calibrações apropriadas, o valor pode ser igualado com o de pureza enantiomérica.<sup>[146]</sup>

A porcentagem de pureza enantiomérica é freqüentemente chamada de excesso enantiomérico (ee) e ele é igual à porcentagem de pureza ótica. Deve-se sempre considerar que o termo pureza ótica é aplicado para um único enantiômero ou mistura deles e não deverá ser aplicado para misturas na qual outro composto estiver presente. Pode-se, portanto, definir ee em termos da rotação específica. (**Equação 2**).<sup>[27,146]</sup>

$$ee (\%) = \frac{\text{rotação específica observada}}{\text{rotação específica do enantiômero puro}} \times 100 \quad (2)$$

Existem dois grandes problemas com este método de análise. A pureza ótica e a pureza enantiomérica não são necessariamente equivalentes. Por exemplo, a rotação ótica não varia linearmente com a composição enantiomérica do ácido 2-metil-2-etil-butanodióico em vários solventes apolares e existem relatos de variações não lineares até mesmo em solventes polares. Uma segunda limitação é que a literatura mostra muitos exemplos de valores de rotação ótica incorretos para compostos que eram considerados enantiomericamente puros.<sup>[146]</sup>

### 1.10.2 Cromatografia Gasosa - CG

Um método atrativo para a análise de mistura de enantiômeros é a cromatografia gasosa quiral (CGQ). Este método sensível não é afetado por traços de impurezas e é rápido e simples de ser realizado. Está baseado 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 de forma precisa e quantitativa. Tais medidas podem ser realizadas com um alto grau de precisão.<sup>[147-149]</sup>

O método utiliza uma fase estacionária quiral, a qual tem um agente que auxilia na resolução de alta pureza enantiomérica. 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.<sup>[147-150]</sup>

Muitas fases quirais foram desenvolvidas para a separação de enantiômeros por cromatografia gasosa, tais como as baseadas em derivados

de aminoácidos, na complexação com metais, além das fases quirais derivadas de ciclodextrinas.<sup>[147]</sup>

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos contendo 6, 7 ou 8 unidades de glicose, sendo denominadas de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrina, respectivamente. As unidades de glicose, unidas por ligações  $\alpha(1,4)$ , estão espacialmente arranjadas na forma de um cone cortado. A cavidade da ciclodextrina é relativamente apolar, e a superfície polar, devido aos grupos hidroxila, os quais podem sofrer reações químicas, formando derivados. O mecanismo de separação está baseado na formação de complexos de inclusão entre o soluto quiral e a ciclodextrina, devido à inclusão da parte hidrofóbica da molécula quiral na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina e interação dos grupos hidrofílicos com as hidroxilas ou com os grupos resultantes da derivação.<sup>[151,152]</sup>

Existem certamente limitações para o método, algumas das quais são peculiares para a cromatografia gasosa. As amostras deverão ser suficientemente voláteis e termicamente estáveis e, é claro, deverá ser quantitativamente resolvida na fase quiral do CG.<sup>[144,147,153]</sup>

### 1.10.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

Para que um racemato seja separado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), este, assim como na CG, deve reagir com um composto quiral ou promover a interação dos enantiômeros com uma fase quiral, de modo a formar dois diastereoisômeros ou complexos diastereoisoméricos. Os diastereoisômeros podem possuir propriedades físicas e químicas diferentes, podendo ser então separados.<sup>[144]</sup>

Existem três procedimentos para a separação de enantiômeros por CLAE. Na derivação quiral, uma molécula quiral reage com um agente de derivatização quiral opticamente puro, formando dois derivados diastereoisoméricos que podem ser separados usando-se fases estacionárias

convencionais (aquirais). As reações mais comuns dos agentes de derivatização quiral envolvem a formação de amidas, carbamatos e uréias diastereoisoméricas. Embora neste caso possa-se usar fases aquirais, a formação da mistura diastereoisomérica nem sempre é fácil.<sup>[144,153]</sup>

Com o uso de um aditivo de fase móvel quiral, um composto enantiomericamente puro é adicionado continuamente à fase móvel do CLAE e a separação dos complexos diastereoisoméricos formados pode então ser feita com CLAE convencional ou de fase reversa.<sup>[153]</sup>

Contudo, a metodologia que se tem mostrado mais atrativa é a separação direta com o uso de uma fase quiral estacionária. A resolução direta de enantiômeros é possível desde que exista reconhecimento quiral entre a mistura racêmica e o seletor quiral.<sup>[144,153,154]</sup>

Não existe uma fase estacionária quiral universal capaz de solucionar todos os problemas de separação, mas sim diversas fases com diferentes princípios de separação. As mais utilizadas são as fases estacionárias protéicas e as de polímeros helicoidais. Em muitos casos, a única maneira de realizar a resolução do par de enantiômeros é através da seleção de uma coluna apropriada, variando a percentagem ou o tipo de modificador orgânico para controlar a retenção dos enantiômeros.<sup>[154]</sup>

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a conversão e a enantiosseletividade de reações de redução de compostos carbonílicos ( $\beta$ -cetoésteres e acetofenonas substituídas) em meio orgânico e em sistema bifásico, utilizando como biocatalisador células íntegras de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em diferentes condições, na forma livre ou imobilizada com ou sem a adição de açúcares.

### 2.2 Específicos

- Cultivar uma linhagem de levedura de laboratório (cepa W303-1A), bem como uma linhagem poliplóide industrial (L70), em meio rico contendo diferentes fontes de carbono (glicose, ácido láctico ou etanol-glicerol) visando induzir (ou reprimir) a produção de enzimas oxidoredutoras.

- Utilizar as leveduras cultivadas em laboratório, ou o fermento de pão comercial, como biocatalisadores na redução de substratos carbonílicos (acetoacetato de etila,  $\alpha$ -cloroacetofenona, *p*-nitroacetofenona, *p*-metoxiacetofenona, *p*-hidroxiacetofenona, *m*-nitroacetofenona e *p*-nitrobenzoilacetato de etila) em meio orgânico e em sistema bifásico, para a produção de álcoois opticamente puros.

- Determinar a melhor forma de utilização do biocatalisador: na forma livre; imobilizado em montmorilonita K10; com adição de água ou solução de açúcar (trealose ou sacarose), e verificar a eficiência destes dissacarídeos na proteção das células em meio orgânico, acompanhando o consumo de sacarose e trealose durante a redução biocatalítica;

- Comparar os resultados obtidos com as células cultivadas em laboratório com aqueles utilizando o fermento de pão comercial, e verificar quais os melhores sistemas biocatalíticos para cada substrato.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes

Peptona bacteriológica (Biobrás), extrato de levedura (Biobrás), glicose (GLI) (Sigma), ácido láctico (LAC) (Vetec), glicerol 85% (Vetec) e etanol 96% (ETOH) (Grupo Química) foram utilizados na preparação dos meios de cultivo. O *n*-hexano (Vetec) foi utilizado como meio orgânico. Ácido cítrico (Vetec) e  $K_2HPO_4$  (Vetec) foram utilizados na preparação da solução tampão. As células de levedura foram imobilizadas em montmorilonita K10 (Mont-K10) (Fluka) e revestidas com gel de gelatina (G) (Sigma G2500, Tipo A). Foram feitas adições ao meio reacional de soluções de sacarose (S) ou trealose (T) (Sigma). Acetoacetato de etila (**25**) (Vetec), *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) (Acros),  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) (Fluka), *p*-nitroacetofenona (**21**) (Aldrich Chemical Co.), *m*-nitroacetofenona (**20**) (Acros), 4-hidroxiacetofenona (**55**) (Acros) e 4-metoxiacetofenona (**56**) (Aldrich Chemical Co.), foram utilizados como substratos carbonílicos sem purificação prévia. Os produtos racêmicos utilizados como padrões na CGQ foram obtidos através da reação de redução das respectivas cetonas com  $NaBH_4$  (Aldrich Chemical Co.).

#### 3.2 Equipamentos

A levedura foi cultivada em incubadora orbital (Nova Ética N480). As células foram coletadas com o uso da centrífuga Sorvall RT 6000B. A absorbância dos meios de cultivo foi medida em espectrofotômetro Beckman DU-7. As reações de biorredução foram realizadas em banho tipo Dubnoff (Marconi HW2000) e em *shaker* orbital CERTOMAT MO (B. Braun Biotech International). A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em um aparelho Philips XL30, do Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC, sendo que as amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro em metalizador modelo P-2 Diod Sputtering System. As reações de redução foram analisadas e os produtos quantificados

no cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-14B com detector de ionização de chama (FID, *flame ionization detector*). A quantificação dos dissacarídeos foi feita no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10A. A rotação óptica dos álcoois quirais foi determinada no polarímetro Polartronic E (Schmidt-Haensch). As análises de infravermelho (IV) foram feitas em um espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR 16PC em pastilha de KBr. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{HMRN}$ ) foram obtidos em espectrômetro Bruker (200 MHz) ou Varian (400 MHz), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS,  $\delta=0,00$ ) e clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente.

### **3.3 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***

Utilizou-se a cepa haplóide W303-1A (*MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100*), fornecida pela Profa. Dra. Anita D. Panek da Universidade Federal do Rio de Janeiro, ou a cepa poliplóide L70 (Labatt Breweries Company Limited of Canada), uma levedura de panificação. As linhagens foram mantidas em ágar YP a 4°C. Alternativamente, foi utilizado o fermento de pão comercial (FP) biológico, seco (Emulzint LTDA ou Fleischmann), armazenado sob refrigeração.

### **3.4 Condições de Cultivo**

As cepas foram crescidas em batelada utilizando-se meio de cultura rico YP (2% (p/v) peptona e 1% (p/v) extrato de levedura) contendo três diferentes fontes de carbono: 4% de glicose; ou 2% de etanol e 3% de glicerol; ou 2% de ácido láctico. O pH foi ajustado para 5,0 com solução de HCl ou de KOH, os meios foram autoclavados a 121°C durante 20 min e inoculados com 0,5% (v/v) de uma pré-cultura, crescida por 48 h em meio YP contendo 2% (p/v) de

glicose. Os frascos foram incubados a 30°C, sob agitação orbital constante a 160 rpm.

O crescimento celular foi determinado espectrofotometricamente a 570 nm. O meio de cultivo foi diluído em água destilada a fim de se obter medidas de absorvância  $\leq 0,3$ .<sup>[81]</sup> As células em fase de crescimento exponencial (determinada a partir da curva de crescimento), antes da exaustão da fonte de carbono, foram coletadas por centrifugação (2,600g, 3 min) e lavadas com água gelada, antes de serem utilizadas nos experimentos de redução dos compostos carbonílicos.

O peso seco das células foi estimado a partir da **Equação 3**;<sup>[81]</sup>

$$\text{Peso seco (g/L)} = 0,35 \times A_{570} \times D \quad (3)$$

onde  $A_{570}$  é a absorvância do meio de cultivo a 570 nm,  $D$  é o fator de diluição das amostras e 0,35 é o fator de conversão de peso úmido para peso seco da levedura *S. cerevisiae*.

### 3.5 Dosagem das Fontes de Carbono e dos Dissacarídeos

Para acompanhar o consumo da fonte de carbono no meio de cultivo, foram dosadas, espectrofotometricamente, as concentrações de glicose, ácido láctico e glicerol.

A concentração de glicose no meio foi dosada enzimaticamente com o kit comercial Glicose Enz Color seguindo as instruções do fabricante (Bio Diagnóstica). Este ensaio baseia-se na reação da glicose oxidase, que catalisa a oxidação da glicose a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, através de uma reação oxidativa, catalisada pela peroxidase, formando antipirilquinonimina de cor vermelha. A intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose, verificada através da absorvância.<sup>[155]</sup>

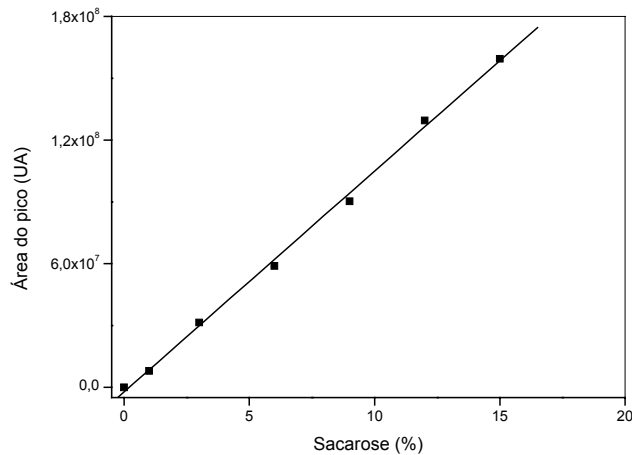


O consumo de ácido láctico foi determinado enzimaticamente com o uso do kit comercial Lactat PAP seguindo as instruções do fabricante (Rolf Greiner Biochemica). A lactato oxidase catalisa a reação de conversão do lactato para piruvato, que reage com peroxidase, 4-aminoantipirina e fenol formando um cromógeno. A absorbância deste cromóforo é proporcional à concentração de lactato na amostra.<sup>[156]</sup>

A dosagem de glicerol foi realizada enzimaticamente com o kit comercial Triglicérides PP (Gold Analisa Diagnóstica) seguindo as instruções do fabricante. O glicerol é fosforilado pela glicerolquinase formando glicerolfosfato que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Em uma reação oxidativa catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com o 4-clorofenol e 4-aminoantipirina produzindo antipirilquinonimina de cor vermelha, cuja absorbância é diretamente proporcional à concentração de triglicérides na amostra.<sup>[157]</sup>

Para a determinação das concentrações de trealose e sacarose no meio reacional, alíquotas das células da cepa W303-1A foram retiradas a cada 24 h dos frascos de reação, fervidas por 5 min e armazenadas a -18°C. Realizou-se uma extração aquosa destas células e a quantidade de açúcar presente no extrato foi determinada. Também foi preparada uma reação controle, onde células previamente fervidas foram adicionadas ao meio reacional.

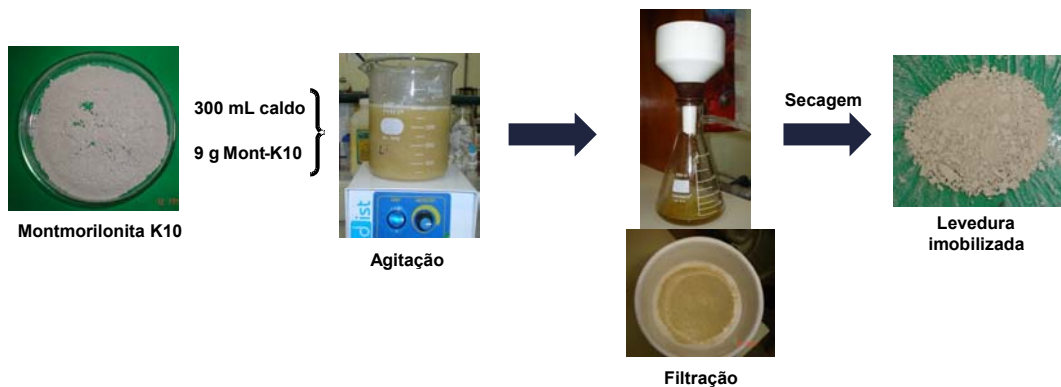
A quantificação dos dissacarídeos foi feita por CLAE com coluna Supelcogel C-610H. A análise foi realizada a 40°C, com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% como fase móvel. A partir da curva de calibração (**Figura 30**), determinou-se a percentagem (p/v) de dissacarídeos nas alíquotas retiradas das células.



**Figura 30.** Curva de calibração utilizada para a quantificação da percentagem de sacarose ( $R = 0,99901$ ).

### 3.6 Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em Mont-K10

As células crescidas em lactato ou em glicerol-etanol foram imobilizadas diretamente no meio de cultura (**Figura 31**). Adicionou-se Mont-K10 na proporção de 3:1 (suporte:célula, p/p) dentro do caldo, submetendo-o em seguida à agitação vigorosa durante 4 h. As células adsorvidas foram coletadas por filtração a vácuo em funil de Büchner, secas na capela à temperatura ambiente por aproximadamente 12 h, e moídas cuidadosamente em gral. As células imobilizadas foram então utilizadas na redução dos substratos carbonílicos.



**Figura 31.** Imobilização do biocatalisador em montmorilonita K10.

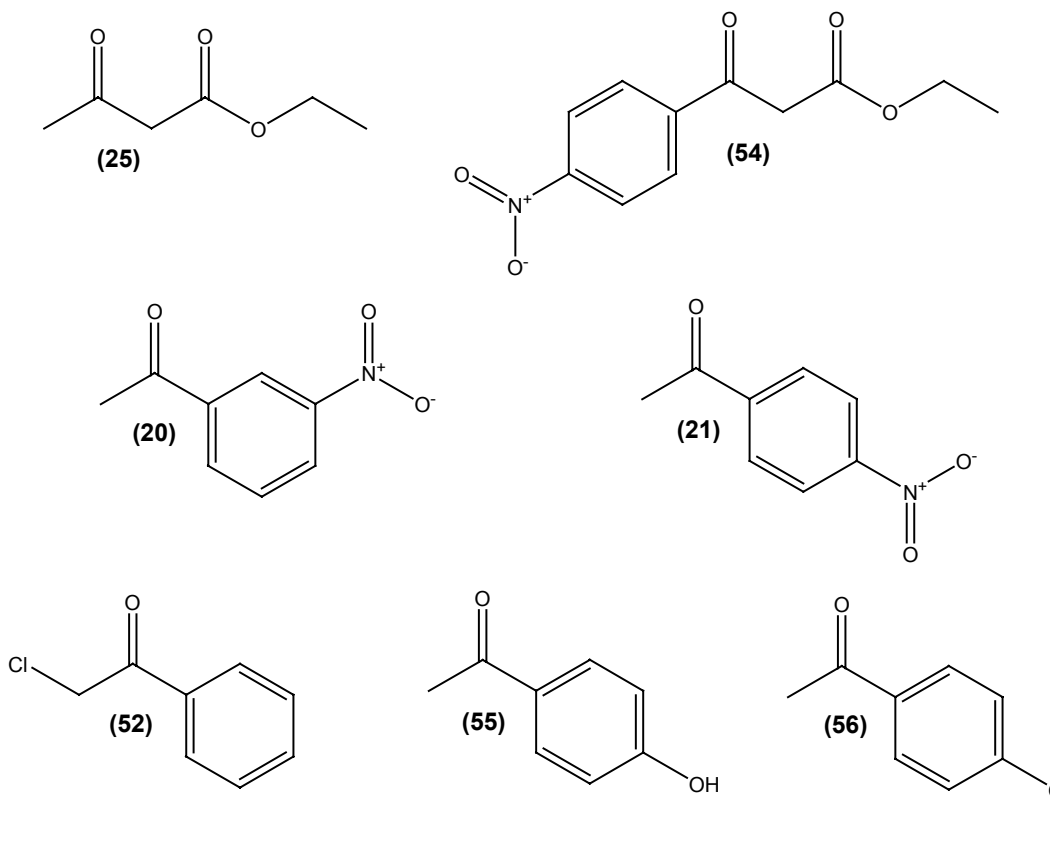
O fermento de pão comercial seco foi solubilizado em água destilada antes da adição do suporte. Adicionou-se a montmorilonita na proporção de 3:1 (suporte:célula, p/p)<sup>[17]</sup> e seguiu-se o mesmo procedimento utilizado na imobilização das células cultivadas em laboratório.

Em alguns experimentos, recobriu-se o FP imobilizado em Mont-K10 com gelatina. Dissolveu-se 1 g de gelatina em 10 mL de água, sob leve aquecimento. Após completa dissolução, adicionou-se a solução de gelatina ao biocatalisador imobilizado. Depois de seco, o FP imobilizado e recoberto com gelatina foi utilizado nos experimentos de biorredução.

As quantidades utilizadas de FP variaram para cada substrato e serão especificadas no decorrer de Resultados e Discussão.

### 3.7 Substratos e Padrões Racêmicos

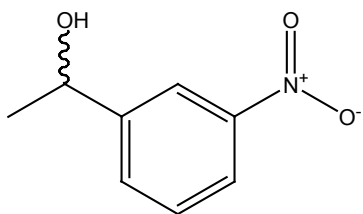
Para a obtenção dos padrões racêmicos, os substratos carbonílicos **20**, **21**, **25** e **52**, bem como o *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**), a *p*-hidroxiacetofenona (**55**) e a *p*-metoxiacetofenona (**56**), cujas estruturas podem ser visualizadas na **Figura 32**, foram reduzidos com NaBH<sub>4</sub>, segundo a metodologia descrita por Vogel<sup>[158]</sup> com algumas modificações. Em um balão de reação de fundo redondo, adicionou-se 1,0 mmol do substrato carbonílico dissolvido em aproximadamente 20 mL de metanol e 3,0 mmol do agente redutor, controlando-se a temperatura (entre 20 e 25°C) com banho de gelo. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila, 8:2. Após o consumo do reagente na placa cromatográfica, o metanol foi evaporado, e ao final, a reação foi tratada com 15 mL de solução saturada de NaCl e extraída com 60 mL de éter etílico. A fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub> e o solvente foi evaporado em rotaevaporador. Os correspondentes álcoois racêmicos, **22**, **23**, **26**, **53**, **57**, **58** e **59**, foram submetidos às análises de IV, <sup>1</sup>HRMN e CGQ.



**Figura 32.** Estruturas dos substratos carbonílicos utilizados nas reações de biorredução.

A caracterização química dos álcoois racêmicos é apresentada a seguir.

### 1-(3-nitrofenil)etanol (23)



**<sup>1</sup>HRMN:**  $\delta$ (ppm) 8,16 (s, 1H), 8,02 (d, 1H), 7,64 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 4,94 (q,  $J = 6,5$  Hz, 1H), 3,09 (s, OH), 1,47 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H).

**IV** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3355 (-OH), 1529 e 1351 ( $\text{N}=\text{O}$ )<sub>2</sub> ( $\text{ArNO}_2$ ), 875 (C-N).

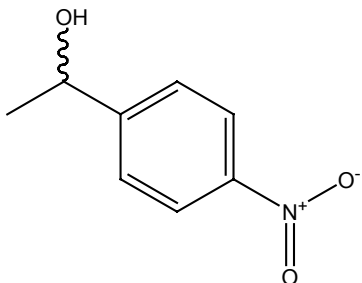
**CGQ:** t.r. = 34,9 min (-) e 37,8 min (+)

$\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3$

M.M = 167,2

Sólido, p. f. 62,5°C

### 1-(4-nitrofenil)etanol (24)



**<sup>1</sup>HRMN:**  $\delta$ (ppm) 8,16 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H), 7,53 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 5,01 (q,  $J = 5,2$  Hz, 1H), 2,69 (s, OH), 1,50 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H).

**IV** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3376 (-OH), 1519, 1346 ( $\text{NO}_2$ ), 854 (C-N).

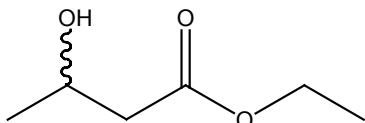
**CGQ:** t.r. = 30,2 min (-) e 35,8 min (+)

$\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3$

M.M = 167,2

Líquido, p. e. 307,1°C

### 3-hidroxibutanoato de etila (26)



$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$

M.M = 132,2

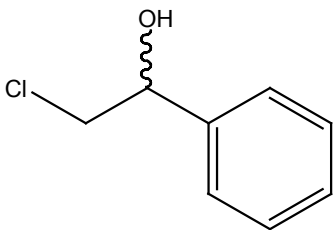
Líquido, p. e. 185°C

**<sup>1</sup>HRMN:**  $\delta$ (ppm) 4,12 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 4,03 (m, 1H), 2,79 (s, OH), 2,40 (m, 2H), 1,30 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H), 1,21 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H).

**IV** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3432 (-OH), 1727 (C=O), 1223 e 1084 (C-C(C=O)-O).

**CGQ:** t.r. = 5,6 min (+) e 5,9 min (-)

### 2-cloro-1-feniletanol (53)



**<sup>1</sup>HRMN:**  $\delta$ (ppm) 7,25 – 7,40 (m, 5H), 4,88 – 4,90 (dd,  $J = 8,7$  e 3,5 Hz, 1H), 3,72- 3,75 (dd,  $J = 11,2$  e 3,5 Hz, 1H), 3,62 – 3,67 (dd,  $J = 11,2$  e 8,7 Hz, 1H), 1,68 (s, OH).

**IV** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3405 (-OH), 1494 (C=C Ar), 1085 (-C-O), 768 (-C-Cl).

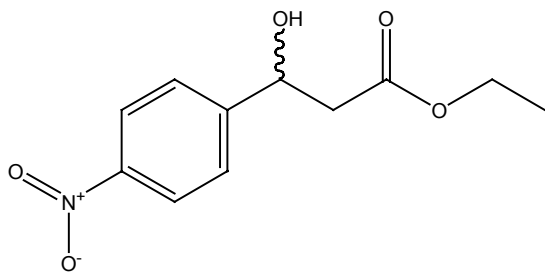
**CGQ:** t.r. = 17,8 min (+) e 18,3 min (-)

$\text{C}_8\text{H}_9\text{ClO}$

M.M = 156,6

Líquido, p. e. 254,9°C

### 3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (57)



**<sup>1</sup>HRMN:** δ(ppm) 8,21 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,56 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 5,24 (m, 1H), 4,13 (q, *J* = 7,6 Hz, 2H), 3,75 (s, OH), 2,74 (m, 2H), 1,28 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H).

**IV (cm<sup>-1</sup>):** 3430 (-OH), 1716 (-C=O), 1516 e 1349 (NO<sub>2</sub>), 1228 e 1079 (C-C(C=O)-O), 855 (C-N).

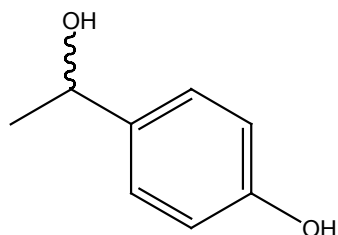
**CGQ:** t.r. = 42,1 min (-) e 45,3 min (+)

C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>

M.M = 239,1

Líquido, p. e. 397,3°C

### 1-(4-hidroxifenil)etanol (58)



**<sup>1</sup>HRMN:** δ(ppm) 7,08 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,98 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,76 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,65 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 5,42 (s, OHAr), 3,42 (q, *J* = 5,6 Hz, 1H), 2,87 (s, OH), 1,29 (d, *J* = 5,5 Hz, 3H).

**IV (cm<sup>-1</sup>):** 3379 (-OH), 2972 (-C-H), 1238 (-C-O).

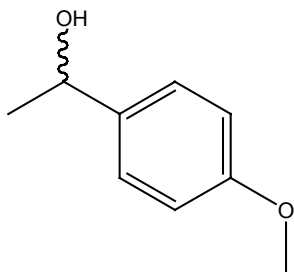
**CGQ:** t.r. = 43,1 min (-) e 45,2 min (+)

C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>

M.M = 138,2

Sólido, p. f. 135-136°C

### 1-(4-metoxifenil)etanol (59)



**<sup>1</sup>HRMN:** δ(ppm) 7,20 (dd, *J* = 7,3 Hz, 2H), 6,90 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,42 (q, *J* = 5,6 Hz, 1H), 3,80 (s, 3H), 2,19 (s, OH), 1,46 (d, *J* = 5,5 Hz, 3H).

**IV (cm<sup>-1</sup>):** 3375, 2969 (-C-H), 1245 (-C-O).

**CGQ:** t.r. = 35,2 min e 37,7 min

C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

M.M = 152,2

Líquido, p. e. 254,3°C

### 3.8 Reações de Biorredução

As células livres ou imobilizadas foram utilizadas na biotransformação dos compostos carbonílicos citados na **Figura 32**. Adicionou-se o biocatalisador a frascos erlenmeyer de 125 mL com tampa esmerilhada contendo 40 mL de *n*-hexano ( $\log P = 3,5$  <sup>[96]</sup>), ou 25 mL de solução tampão ácido cítrico/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 4,5) <sup>[159]</sup> e 25 mL de *n*-hexano, onde 1,5 mmol do substrato pró-quiral foi previamente solubilizado. Para os substratos pouco solúveis em *n*-hexano, a completa solubilização foi alcançada com a adição de algumas gotas de DMSO.

Água destilada ou solução de açúcar (trealose ou sacarose) foi lentamente gotejada ao meio reacional, a fim de proteger a levedura do solvente orgânico. Os frascos reacionais foram submetidos à agitação contínua em banho termostatizado tipo Dubnof a 30°C (quando FP foi utilizado), ou em agitador orbital tipo *shaker* a 25°C (quando as células cultivadas em laboratório foram usadas). Periodicamente foram retiradas alíquotas do meio reacional, e a formação dos produtos analisada por CGQ.

A separação das células do produto de reação foi feita por filtração. Após evaporação do solvente orgânico, o álcool quiral produzido foi submetido à análise polarimétrica para a determinação da atividade óptica.

As quantidades utilizadas de biocatalisador e das soluções de açúcares (assim como suas concentrações), variam conforme o experimento, e serão detalhadas no decorrer da apresentação dos Resultados e Discussão.

### 3.9 Determinação da Conversão e do Excesso Enantiomérico

Alíquotas do meio reacional foram retiradas periodicamente e analisadas no cromatógrafo gasoso equipado com uma coluna capilar de fase estacionária quiral, CHROMPACK ou VARIAN (chirasil - DEX CB 25 m x 0,25 mm ID x 0,25

µm) para a determinação do excesso enantiomérico e da percentagem de conversão.

Para a análise dos produtos das reações dos β-cetoésteres, as temperaturas inicial e final da coluna foram de 70°C e 150°C, respectivamente, com taxa de aquecimento de 2°C/min. Para a análise dos produtos obtidos com as acetofenonas substituídas, as temperaturas inicial e final da coluna foram de 90°C e 150°C, respectivamente. A pressão do gás carreador (H<sub>2</sub>) foi de 75 kPa e as temperaturas do injetor e do detector de 250°C e 275°C, respectivamente. O tempo de retenção dos álcoois quirais foi confirmado com a injeção dos padrões racêmicos.

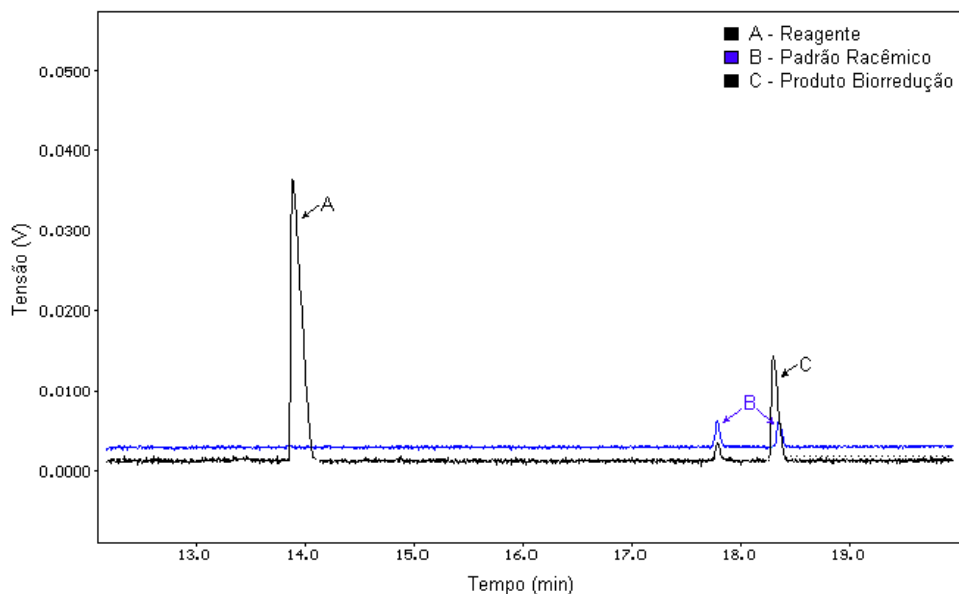
As áreas dos picos dos substratos e dos produtos foram comparadas, e a soma total das áreas foi considerada como 100%. O grau de seletividade na obtenção preferencial de um dos enantiômeros durante a redução das carbonilas pró-quirais, foi avaliada em termos de excesso enantiomérico (ee), definido pela **Equação 4**.<sup>[2]</sup>

$$ee (\%) = \frac{(R - S)}{(R + S)} \times 100 \quad (4)$$

onde R e S são as quantidades relativas dos enantiômeros (R) e (S).

A **Figura 33** apresenta um cromatograma obtido na redução da α-cloroacetofenona (**52**) mediada por fermento de pão comercial protegido por trealose.<sup>[17]</sup> A percentagem de conversão, calculada pela soma das áreas dos enantiômeros formados, foi de 45%, e o ee, calculado conforme a **Equação 4**, foi de 80% para o enantiômero (R)-(**53**).





**Figura 33.** Cromatograma obtido por CGQ para uma alíquota de 48 h de reação de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) (A) com o sistema FP/T. O produto da biotransformação (*R*)-**53** (C) está sobreposto com o padrão racêmico (B).

### 3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para verificar a condição morfológica das células do fermento de pão comercial antes e durante a redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) em *n*-hexano. As células foram coletadas do meio reacional e secas em capela. Após fixar as amostras em suporte adequado, estas foram recobertas por uma fina camada de ouro antes da análise por MEV. Foram obtidas ampliações de 1000X e 4000X.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

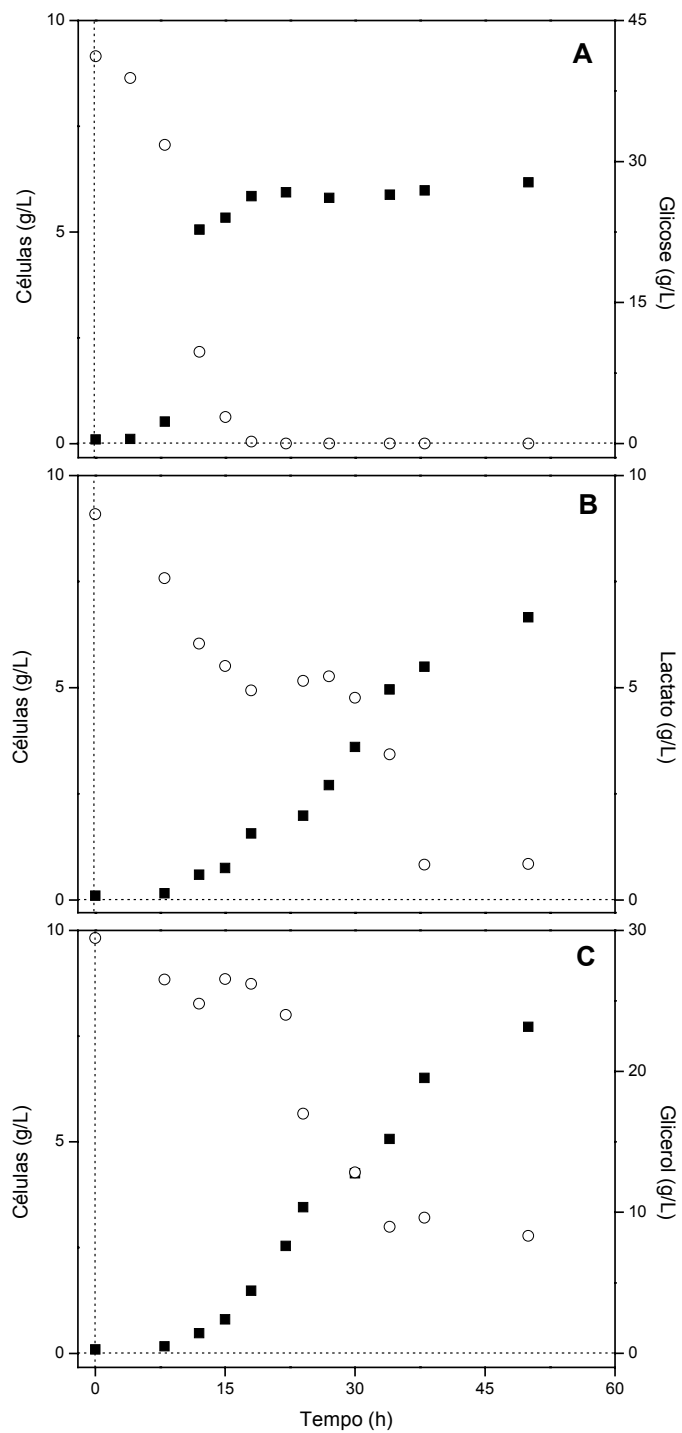
Os resultados obtidos com os experimentos de biorredução de substratos carbonílicos serão apresentados em função da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada como biocatalisador. Primeiramente, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos com a cepa de laboratório W303-1A em meio orgânico, a influência da adição de açúcares e do método de imobilização. Em seguida, serão abordadas as reações utilizando a cepa industrial L70 em *n*-hexano, o efeito da imobilização em Mont-K10 e do uso de sistema bifásico. Por fim, serão avaliados os experimentos com o uso do fermento de pão comercial imobilizado e em sistema bifásico, e feitas as devidas comparações com dados reportados na literatura.

### 4.1 Estudos com a Cepa de Laboratório W303-1A

#### 4.1.1 Curvas de crescimento

Inicialmente foram determinadas as curvas de crescimento da levedura W303-1A nos diferentes meios de cultivo, a fim de estabelecer o tempo apropriado de coleta das células. Para garantir uma alta atividade enzimática, o biocatalisador foi coletado ao final da fase logarítmica de crescimento, sem que a fonte de carbono fosse esgotada, garantindo assim o metabolismo fermentativo para as células cultivadas em glicose, e respiratório (ou oxidativo) para as cultivadas em lactato ou em glicerol-etanol.

As curvas de crescimento de *S. cerevisiae* W303-1A utilizando as diferentes fontes de carbono estão apresentadas na **Figura 34**. Para as medidas de absorvância, as amostras foram previamente tratadas conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4.



**Figura 34.** Variação da concentração celular em função do tempo para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A a 30°C em (A) glicose, (B) lactato ou (C) glicerol-etanol. Biomassa (■) e fonte de carbono (○).

As curvas indicam que, para as células cultivadas em glicose que é fonte de carbono fermentável e repressora da cadeia respiratória, a fase exponencial de crescimento encerra em torno de 12 h de cultivo, atingindo em média 5 g/L de biomassa. As células cultivadas em fontes de carbono respiráveis (lactato ou glicerol-etanol), indutoras da síntese de desidrogenases, atingiram o final da fase logarítmica após 30 h de crescimento, atingindo em média 4 g/L de biomassa.

Observa-se também na **Figura 34**, que as fontes de carbono ainda estavam presentes no meio de cultivo no momento de coleta das células, garantindo o metabolismo fermentativo para a levedura crescida em glicose, e oxidativo para as células crescidas em glicerol-etanol e lactato. Nota-se na **Figura 34B** que a concentração inicial de lactato (10 g/L) corresponde à metade da quantidade adicionada ao meio de cultivo. Como a dosagem desta fonte de carbono foi realizada enzimaticamente, conclui-se que apenas uma das enzimas, a D- ou a L-lactato oxidase está presente no kit utilizado para a determinação de lactato, visto que adicionou-se 20 g/L da mistura racêmica para o crescimento da levedura.

A diferença no tempo de consumo das fontes de carbono pode ser explicada pelos metabolismos diferenciados da levedura quando se utiliza uma fonte de carbono fermentável, no caso da glicose, e fontes de carbono respiráveis, como o lactato ou glicerol-etanol. Durante a glicólise, a glicose é degradada durante uma série de reações catalisadas enzimaticamente, gerando ATP, NADH e piruvato. A molécula de piruvato pode então seguir três rotas metabólicas distintas. Em organismos aeróbicos, e sob condições aeróbicas, o piruvato é oxidado para formar o grupo acetil da acetil-coenzima A, que é então oxidado totalmente a CO<sub>2</sub> pelo ciclo de Krebs. Os elétrons gerados durante as reações de oxidação são fornecidos ao O<sub>2</sub> através de uma série de reações que ocorrem na mitocôndria, a respiração mitocondrial.<sup>[23]</sup>

A segunda rota metabólica para o piruvato é sua redução a lactato, através da fermentação láctica, aceitando elétrons da coenzima NADH. A

terceira via do catabolismo do piruvato leva à produção de etanol, que ocorre sob condições anaeróbicas. Esta é chamada fermentação alcoólica e ocorre em duas etapas: a descarboxilação do piruvato a acetaldeído e redução do acetaldeído a etanol.<sup>[23]</sup>

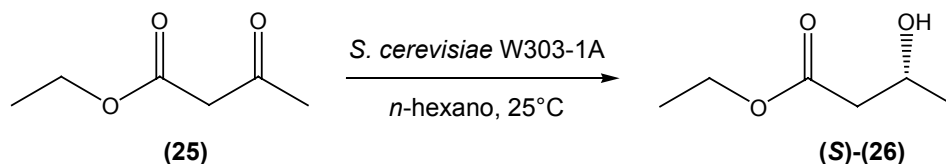
Na maioria dos organismos, outras hexoses além da glicose podem entrar na via glicolítica sendo convertidas em frutose.<sup>[23]</sup> Organismos aeróbicos facultativos, como *S. cerevisiae*, fermentam a glicose e produzem etanol quando este açúcar está presente em concentrações acima de 0,8 mM, mesmo em presença de oxigênio, a fim de produzir energia mais rapidamente.<sup>[80,81,85,160]</sup> Este comportamento também está associado à intenção de colonizar rapidamente um determinado habitat, pois a produção de etanol em grandes quantidades elimina as espécies competidoras, sendo que *S. cerevisiae* pode utilizar o álcool produzido como fonte de carbono respirável após o esgotamento da glicose.<sup>[161]</sup>

O consumo de lactato pelas células de *S. cerevisiae* que foram pré-cultivadas em glicose durante a produção da pré-cultura, levou mais tempo que o consumo da glicose, pois estas não possuem inicialmente o co-transporte próton-lactato, necessário para captar o lactato do meio cultivo para dentro das células. O gene que codifica para este transportador, *JEN1*, é reprimido pela presença de glicose, e induzido na presença de lactato,<sup>[86,87,162]</sup> permitindo que, após uma fase de adaptação, as células fossem capazes de consumir esta fonte de carbono e produzir biomassa.

Assim como o lactato, o glicerol também necessita de um transporte ativo a fim de ser metabolizado pela levedura, e este co-transporte, realizado na presença dos genes *FPS1*, *GUP1*, *GUP2* e *GUT1*, também é reprimido na presença de açúcares fermentáveis.<sup>[163]</sup>

#### 4.1.2 Efeito da adição de trealose

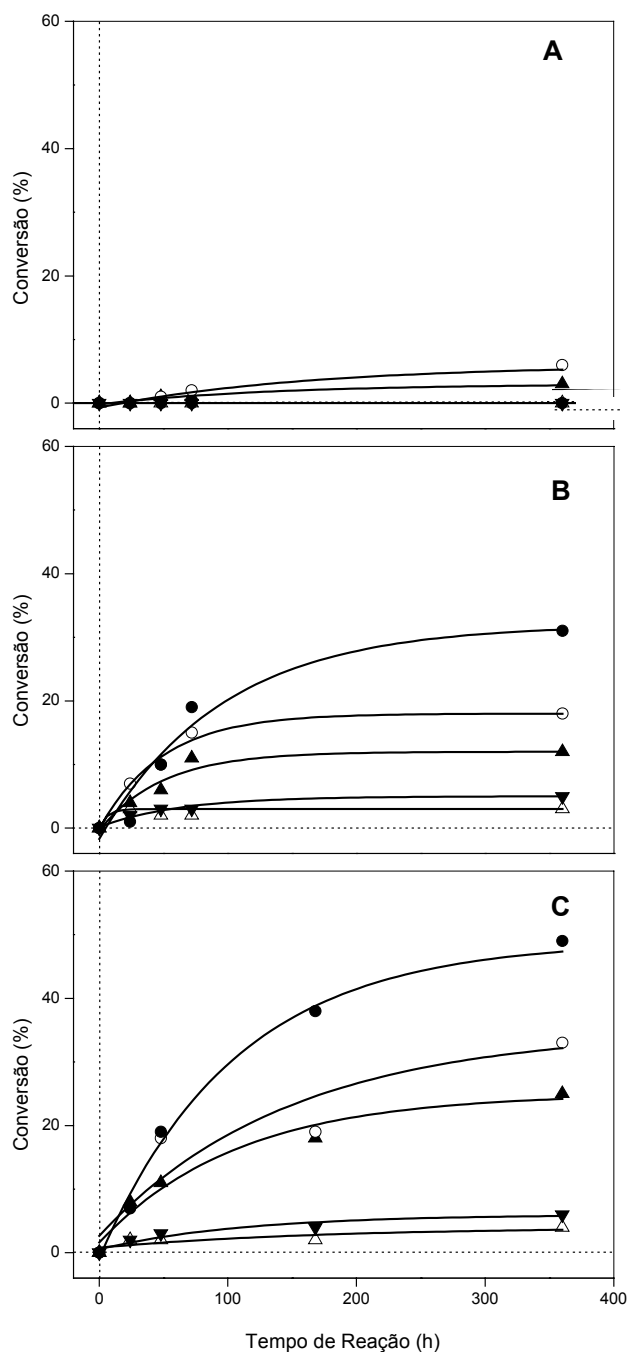
O possível efeito protetor da trealose foi primeiramente avaliado durante a redução do acetoacetato de etila (**25**) em *n*-hexano, mediada por *S. cerevisiae* W303-1A (**Figura 35**).



**Figura 35.** Redução biocatalítica do acetoacetato de etila (**25**).

As percentagens de conversão a (S)-**26** utilizando as células de *S. cerevisiae* W303-1A cultivadas nas diferentes fontes de carbono e protegidas pela trealose, podem ser visualizadas na **Figura 36**. O ee do produto (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) foi > 99% em todas as reações realizadas sob estas condições.

A partir da purificação parcial do produto de biorredução **26**, filtrando as células de levedura e evaporando o solvente orgânico, determinou-se por polarimetria a rotação óptica do álcool quiral,  $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = +47$  (0,01 g/mL, clorofórmio). Através da comparação com dados da literatura para o álcool (S)-3-hidroxi-butanoato de etila, cujo valor de  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  é de  $+43^{[164]}$  confirmou-se a configuração absoluta do álcool (S)-(+)-**26** como o produto da biorredução. Esta diferença entre o valor de  $\alpha$  obtido e o reportado na literatura pode ser devido a presença de impurezas oriundas do meio reacional, visto que a purificação do produto foi parcial.



**Figura 36.** Conversões a (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A cultivada em glicose (A), lactato (B), ou glicerol-etanol (C), e com adição das quantidades indicadas (mL) de solução de trealose a 10%: 0,8 (▲), 1,6 (○), 2,4 (●), ou de água: 0,8 (Δ) e 1,6 (▼).

Observou-se pouca conversão a produto quando as células de levedura crescidas em glicose (**Figura 36A**) foram utilizadas como biocatalisador, e mesmo após a adição de diferentes concentrações de trealose, foram obtidas quantidades mínimas do produto (6-8% de conversão). Estes valores são similares aos obtidos quando as células crescidas em lactato ou glicerol-etanol foram utilizadas sem a adição deste açúcar (**Figuras 36B e 36C**). Estes resultados indicam a falta de enzimas capazes de reduzir o acetoacetato de etila nas células reprimidas pela glicose, nas condições reacionais utilizadas, pois a maioria das que reduzem o acetoacetato de etila são codificadas por genes conhecidamente reprimidos pela glicose, conforme já reportado na literatura.<sup>[76, 165]</sup>

Entretanto, nota-se que a adição de trealose ao meio reacional contendo as células crescidas em lactato ou em glicerol-etanol aumenta significativamente a produção do álcool quiral (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**), obtendo aproximadamente 50% de conversão quando foram utilizadas as células cultivadas em glicerol-etanol (**Figura 36C**). A adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% também favoreceu as maiores conversões a produto (31%) quando foram utilizadas as células cultivadas em lactato (**Figura 36B**).

O excesso enantiomérico do produto foi > 99% em todas as reações, já que o álcool quiral (S)-**26** foi o único enantiômero formado, independente da fonte de carbono fornecida para o crescimento do biocatalisador. A adição de maiores quantidades de solução de trealose, bem como o aumento da concentração da solução do dissacarídeo para 20% não resultou em conversões superiores a produto. Resultados similares foram obtidos quando se adicionou 2,4 mL da solução de trealose a 10% ou 1,2 mL de uma solução a 20% ao meio reacional, sugerindo que estas quantidades de água não influenciaram significativamente o sistema biocatalítico estudado.

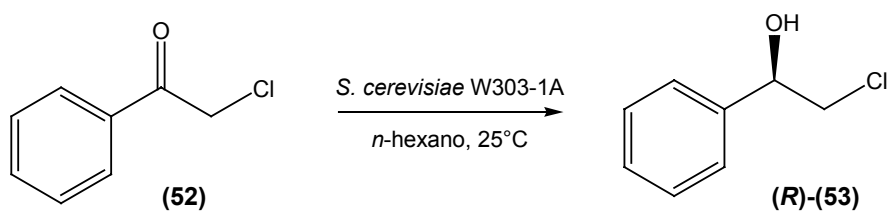
A capacidade da trealose proteger estruturas celulares da desestabilização causada por situações de estresse ou por agentes



desnaturantes está bem documentada na literatura, onde vários estudos mostram a sua proteção *in vitro* bem como *in vivo* de membranas e proteínas.<sup>[166]</sup> De fato, o acúmulo de trealose tem sido relacionado com a capacidade de leveduras de tolerar condições ambientais adversas.<sup>[131,137,138,167,168]</sup> As propriedades vítreas das soluções de trealose, somada à habilidade deste açúcar em formar ligações de hidrogênio com moléculas das superfícies de biomoléculas são características fundamentais que determinam seu efeito protetor pronunciado.<sup>[131,141]</sup> Conforme já mencionado, em *S. cerevisiae*, a trealose é um importante carboidrato de reserva, e representa cerca de 20% do peso seco da célula, dependendo das condições de cultivo e do estágio de vida. Foi também sugerido que o metabolismo respiratório confere às leveduras maior tolerância ao estresse, pois durante a respiração mais trealose pode ser sintetizada do que durante o metabolismo fermentativo.<sup>[168]</sup>

Assim, os resultados apresentados na **Figura 36**, onde as maiores conversões a (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) foram obtidas utilizando células cultivadas em lactato e, principalmente com as cultivadas em glicerol-etanol, podem ser uma consequência não apenas da indução das enzimas oxidorrredutoras durante o metabolismo aeróbico mas também de maiores concentrações de trealose acumuladas por estas células, garantindo uma atividade catalítica satisfatória em meio orgânico.

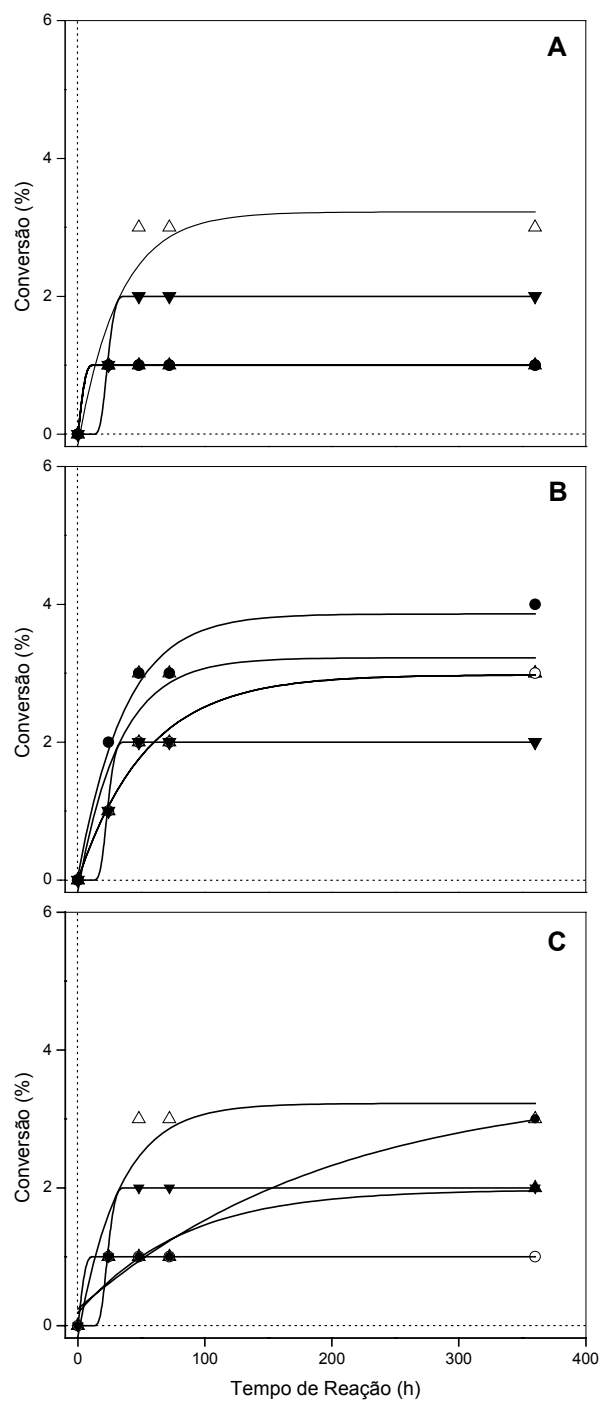
O efeito protetor da trealose também foi avaliado durante a redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) em *n*-hexano, mediada por *S. cerevisiae* W303-1A (**Figura 37**).



**Figura 37.** Redução biocatalítica da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**).

As percentagens de conversão a 2-cloro-1-feniletanol (**53**) utilizando as células de *S. cerevisiae* W303-1A cultivadas nas diferentes fontes de carbono e protegidas pela trealose, podem ser visualizadas na **Figura 38**.

A configuração absoluta do álcool quiral obtido majoritariamente foi determinada a partir da medida polarimétrica da rotação óptica do produto de biorredução, após purificação parcial. O valor de  $[\alpha]_D^{25}$  para o álcool (*R*)-(-)-2-cloro-1-feniletanol citado na literatura é  $-50^{[169]}$ , enquanto que o obtido foi de  $-36,4$  (0,05 g/mL, *n*-hexano). Esta diferença pode ser devido à presença do outro enantiômero, reagente e/ou impurezas do meio reacional. Por comparação com dados obtidos da literatura para o (*R*)-2-cloro-1-feniletanol, confirmou-se a obtenção do álcool (*R*)-(-)-**53**. Este procedimento foi utilizado para a determinação da configuração absoluta dos outros álcoois quirais obtidos nas reações de biorredução.



**Figura 38.** Conversões a 2-cloro-1-feniletanol (**53**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A cultivada em glicose (A), lactato (B), ou glicerol-etanol (C), e com adição das quantidades indicadas (mL) de solução de trealose a 10%: 0,8 (▲), 1,6 (○), 2,4 (●), ou de água: 0,8 (△) e 1,6 (▼).

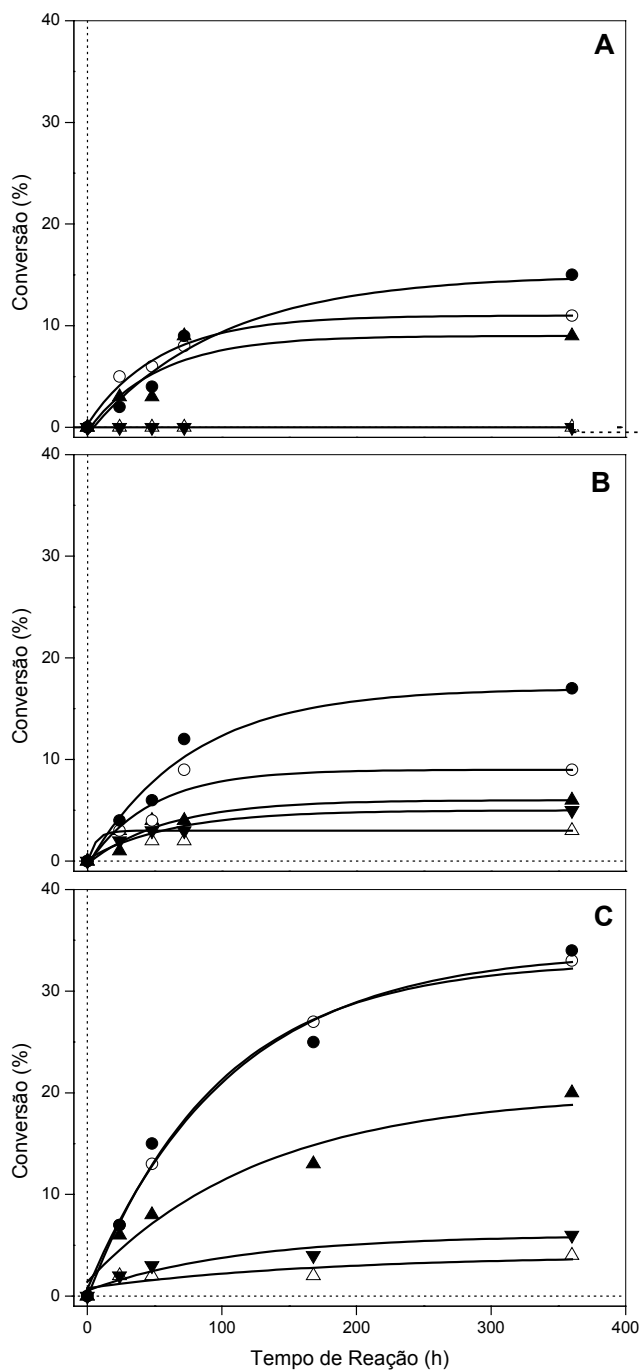
Como pode se observar na **Figura 38**, a cepa W303-1A não foi capaz de reduzir a acetofenona **52** eficientemente. Tanto as células cultivadas em glicose como as crescidas em meios indutores da produção de oxidoredutases forneceram conversões de 1-4%. A adição de trealose também não se mostrou eficaz na proteção celular durante a redução deste substrato, e inclusive propiciou menores conversões. O excesso enantiomérico variou entre 40 e 70%, indicando uma baixa seletividade destas células na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona, possivelmente devido ao efeito estéreo causado pelo anel aromático do substrato e/ou formação de produtos de hidrólise.

Está bem reportado na literatura que a  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) é tóxica para as células.<sup>[18,170]</sup> A inerente “fragilidade” da cepa de laboratório haplóide frente ao estresse causado pelo solvente orgânico associada à toxicidade do substrato, pode ter incapacitado a levedura W303-1A de reduzir a cetona **52**, inibindo quase que totalmente a sua atividade biocatalítica.

#### 4.1.3 Efeito da adição de sacarose

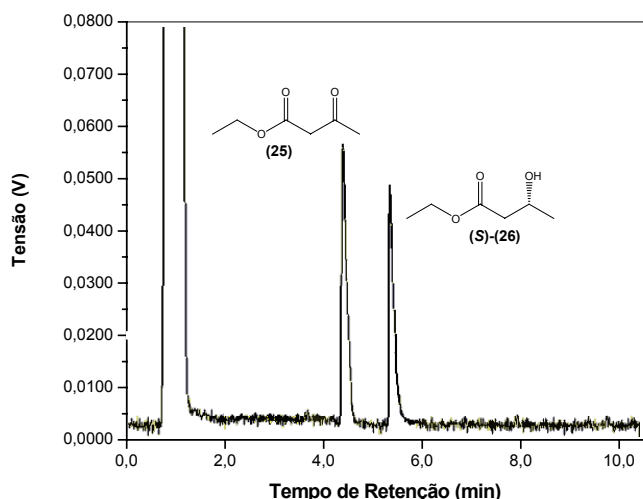
A fim de comparar a proteção da trealose com um outro dissacarídeo, foi avaliado o efeito da adição de sacarose durante a redução do acetoacetato de etila (**25**) em *n*-hexano, mediada por *S. cerevisiae* W303-1A (vide **Figura 35**).

As percentagens de conversão a (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) utilizando as células de *S. cerevisiae* W303-1A cultivadas nas diferentes fontes de carbono, e protegidas por sacarose, podem ser visualizada na **Figura 39**. Na ausência de sacarose não houve conversão a produto quando as células cultivadas em glicose foram utilizadas, resultado este que está de acordo com o apresentado na **Figura 36A**. Contudo, nota-se que a adição de sacarose ao meio reacional aumentou significativamente a capacidade destas células em produzir o álcool (S)-**26**, convertendo cerca de 15% do substrato **25** quando adicionou-se 2,4 mL de solução de sacarose a 10% (**Figura 39A**).



**Figura 39.** Conversões a (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A cultivada em glicose (A), lactato (B), ou glicerol-etanol (C), e com adição das quantidades indicadas (mL) de solução de sacarose a 10%: 0,8 (▲), 1,6 (○), 2,4 (●), ou de água: 0,8 (Δ) e 1,6 (▼).

Utilizando as células cultivadas em lactato (**Figura 39B**), os valores de conversão obtidos foram da mesma ordem de grandeza dos obtidos com as células crescidas em glicose (**Figura 39A**). Os maiores valores de conversão a produto (36%) foram novamente obtidos pelas células crescidas em glicerol-etanol (**Figura 39C**). O cromatograma de uma alíquota da biorredução do acetoacetato de etila mediada por células da cepa W303-1A crescidas em glicerol-etanol, após 15 dias de reação, pode ser observado na **Figura 40**.



**Figura 40.** Cromatograma de CGQ para uma alíquota da reação de redução do acetoacetato de etila (**25**) em *n*-hexano a 25°C com células cultivadas em glicerol-etanol e adição de 2,4 mL de sacarose a 10%, após 15 dias. O produto (S)-(+)-3-hidroxibutanoato de etila (**26**) foi obtido com 36% de conversão (ee > 99%). [Condições experimentais: Inj. = 250°C, Det. = 275°C, T<sub>i</sub> = 70°C, T<sub>f</sub> = 150°C, Δ<sub>aq</sub> = 2°C/min, P<sub>H<sub>2</sub></sub> = 75 kPa].

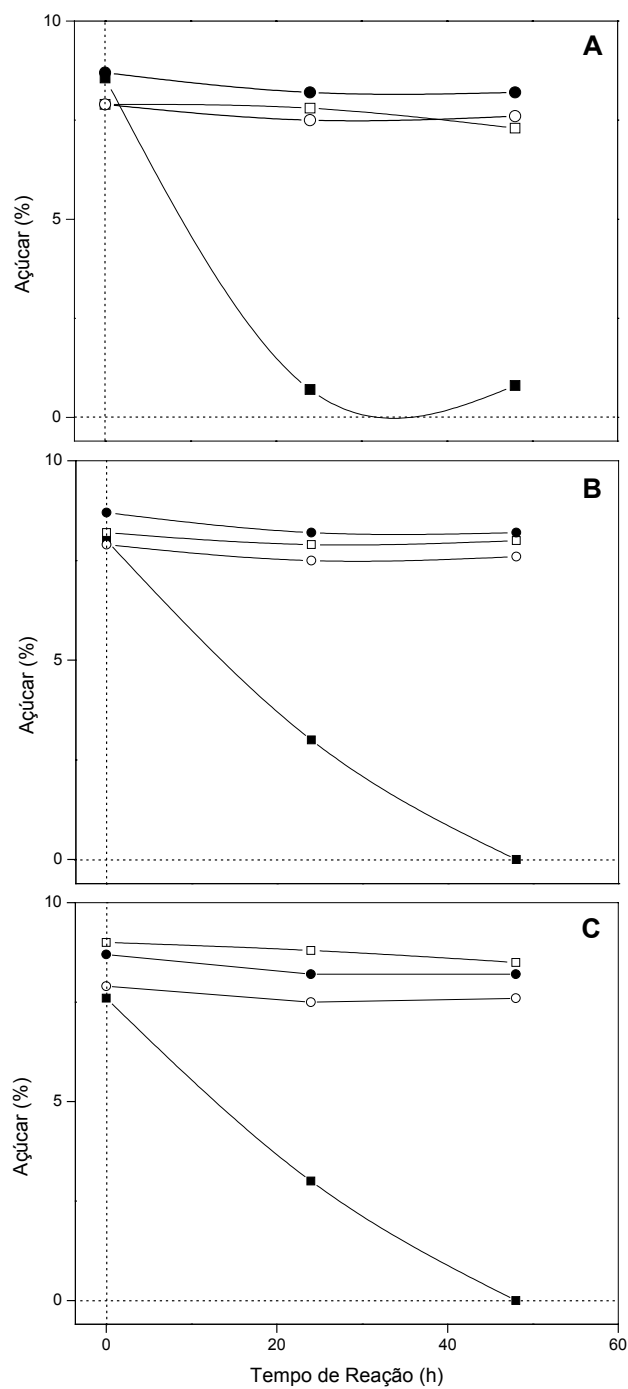
A adição de maiores quantidades de solução de sacarose, bem como o aumento da concentração da solução do dissacarídeo para 20%, não resultou em acréscimos significativos nas conversões a produto. Embora o ee de (S)-(+)-**26** tenha sido > 99% com as células de levedura crescidas em lactato e em glicerol-etanol, o ee variou de 30-50% quando foram empregadas as células cultivadas em glicose, formando também o enantiômero (*R*). Estes resultados

sugerem que uma redutase diferente está atuando na redução de **25** pelas células reprimidas pela glicose e incubadas na presença de sacarose.

Com estes resultados inesperados, obtidos com o uso das células cultivadas em glicose durante a redução do acetoacetato de etila (**25**), tornou-se necessário verificar se a levedura estaria consumindo os açúcares adicionados durante as reações de biorredução em *n*-hexano.

Sabendo que ambos os dissacarídeos utilizados possuem baixa lipofilicidade,<sup>[171]</sup> não se espera que estes sejam incorporados à fase orgânica do sistema biocatalítico, o que foi confirmado pela reação controle onde células mortas foram utilizadas (**Figura 41**). Como pode ser observado na **Figura 41A**, não ocorreu o consumo de trealose pelas células cultivadas em glicose. Contudo, no caso da sacarose, o açúcar foi rapidamente hidrolisado em 24h de reação, produzindo glicose e frutose que também foram consumidas rapidamente, sendo que após 2 dias de reação o açúcar já tinha sido completamente consumido pelas células.

Nestas condições, as células pré-crescidas em glicose passariam a exibir um metabolismo respiratório durante o consumo da sacarose, presente em baixa concentração, e conseqüentemente produziriam as enzimas oxidorreduzidoras necessárias para reduzir o substrato carbonílico.<sup>[81-83]</sup>



**Figura 41.** Variações nas percentagens de sacarose (■) ou trealose (□) residual no meio reacional durante a biorredução do acetoacetato de etila (**25**) mediada por *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A pré-crescida em glicose (A), lactato (B) ou glicerol-etanol (C), e reações controle contendo células inativadas, com sacarose (●) ou trealose (○).



Estes resultados indicam que enquanto a trealose está provavelmente atuando como um protetor celular sem ser consumido pelas células, a sacarose está sendo usada como uma fonte de carbono. A baixa estereoespecificidade das células cultivadas em glicose e incubadas com sacarose está de acordo com resultados publicados por Rodríguez e *col.* e por Kaluzna e *col.*, onde se verificou que algumas redutases de *S. cerevisiae*, tais como *FAS1* e *FAS2*, convertem o acetoacetato de etila (**25**) ao enantiômero (*R*)<sup>[66,76]</sup> sendo que estas enzimas são induzidas durante o crescimento da levedura em sacarose.<sup>[172]</sup>

Pode ser observado na **Figura 41** que a trealose também não foi consumida pelas células cultivadas em lactato ou em glicerol-etanol, e que o consumo de sacarose foi mais lento do que pela levedura pré-crescida em glicose (**Figuras 41B e 41C**). Com os sistemas utilizando células crescidas em glicerol-etanol, que promoveram boas conversões a produto e alta estereoespecificidade, obteve-se melhor desempenho quando a trealose foi adicionada ao meio reacional em comparação com a sacarose.

Muitos mono e dissacarídeos possuem a habilidade de evitar a desnaturação de biomoléculas,<sup>[141,142]</sup> o que pode estar relacionado com o número de grupos OH equatoriais, capazes de organizar as moléculas de água através de ligações de hidrogênio. A trealose possui um número maior de grupos hidroxila na posição equatorial do que a sacarose,<sup>[131]</sup> sendo capaz de se ligar mais fortemente à camada aquosa ao redor do biocatalisador, evitando assim sua desnaturação.<sup>[136]</sup> O alto valor da temperatura de transição da fase vítrea da trealose e de suas soluções aquosas, quando comparado a outros dissacarídeos, é outro fator relacionado ao seu efeito protetor pronunciado.<sup>[137]</sup>

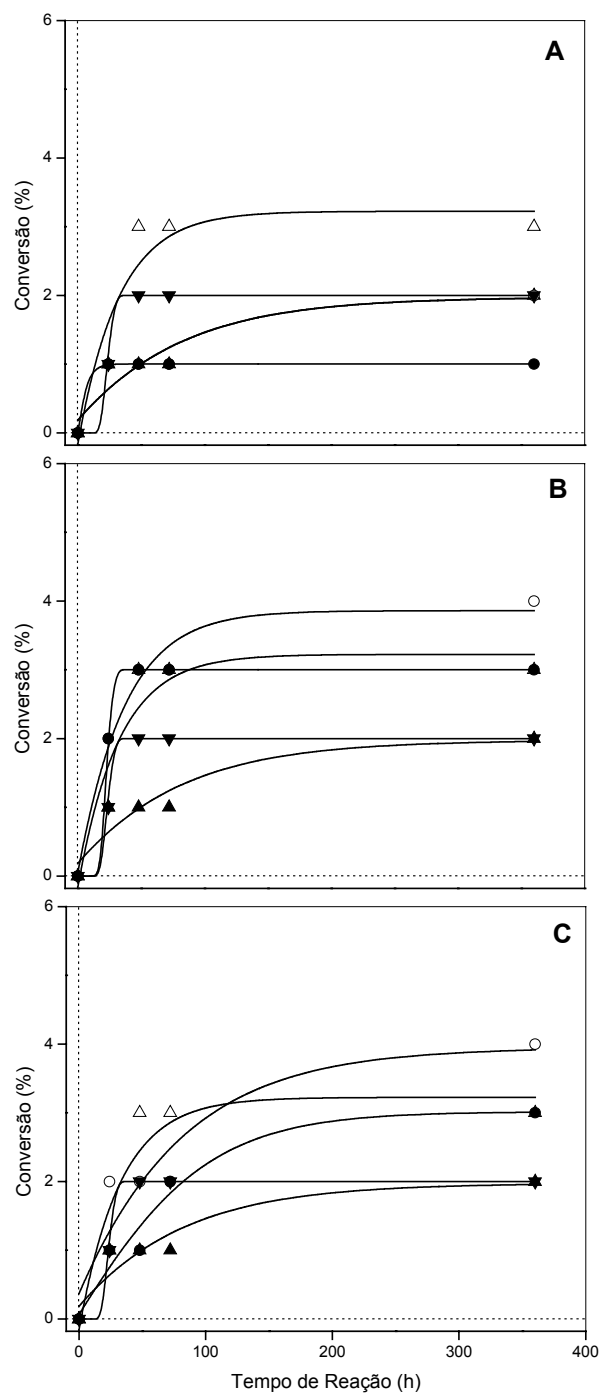
Recentemente, Magazu e *col.* confirmaram o efeito protetor pronunciado da trealose através de estudos utilizando espalhamento de nêutrons, cujos resultados indicaram que os dissacarídeos, em geral, possuem um efeito destrutivo sobre a estrutura tetraédrica coordenada da água pura. Os autores observaram que o sistema trealose/água apresenta uma maior cristalinidade do

que os sistemas sacarose/água, o que explicaria porque as soluções de trealose possuem um efeito protetor mais significativo sobre as células de levedura, quando comparadas com soluções de sacarose.<sup>[173]</sup>

O efeito da sacarose na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (vide **Figura 37**) também foi avaliado. As percentagens de conversão a 2-cloro-1-feniletanol (**53**) utilizando as células de *S. cerevisiae* W303-1A cultivadas nas diferentes fontes de carbono, e protegidas por sacarose, podem ser visualizadas na **Figura 42**.

Novamente as células da cepa W303-1A não foram eficientes na biorredução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**), mesmo quando sacarose foi adicionada ao meio reacional. As conversões a produto foram, no geral, bastante baixas (1-4%), independentemente da fonte de carbono utilizada no crescimento do biocatalisador (**Figura 42**). O excesso enantiomérico variou entre 20 e 80%, e o enantiômero (*R*)-**53** foi formado predominantemente. A configuração absoluta no álcool quiral foi confirmada por medidas de rotação óptica, conforme descrito anteriormente.

Estes resultados são bastante similares aos apresentados na **Figura 38**, onde a adição de trealose também não se mostrou eficaz na proteção das células durante a redução da halocetona **52**. A alta toxicidade do substrato às células, bem como o impedimento estereo foram provavelmente os fatores responsáveis pelo baixo desempenho do sistema biocatalítico na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**).

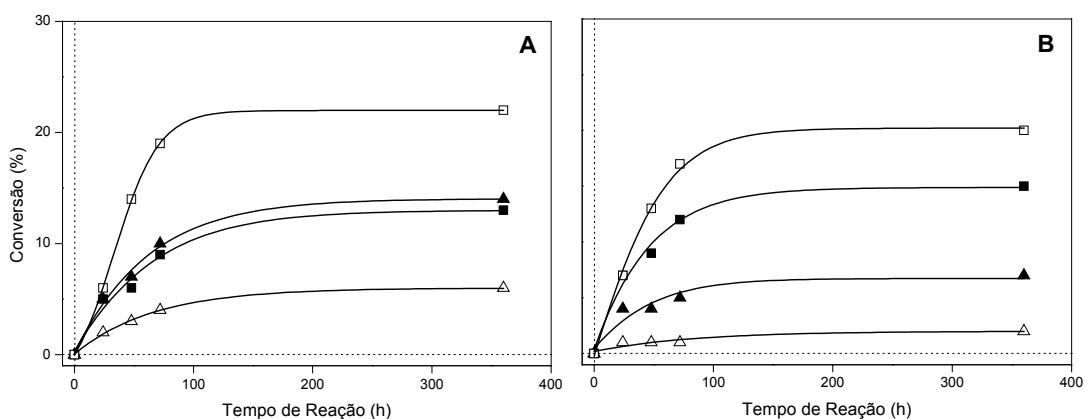


**Figura 42.** Conversões a 2-cloro-1-feniletanol (**53**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A cultivada em glicose (A), lactato (B), ou glicerol-etanol (C), e com adição das quantidades indicadas (mL) de solução de sacarose a 10%: 0,8 (▲), 1,6 (○), 2,4 (●), ou de água: 0,8 (△) e 1,6 (▼).

#### 4.1.4 Efeito protetor da imobilização

Considerando os resultados obtidos nos estudos sobre a adição de dissacarídeos nas reações de biorredução em *n*-hexano, as células de *S. cerevisiae* W303-1A cultivadas em lactato e em glicerol-etanol foram imobilizadas em Mont-K10 e utilizadas como biocatalisador na redução do acetoacetato de etila (**25**) e da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**). Diferentes soluções de trealose foram adicionadas ao meio reacional, a fim de se avaliar o efeito sinérgico da imobilização e da adição do açúcar.

As percentagens de conversão a (S)-**26** utilizando as células de *S. cerevisiae* W303-1A cultivadas em lactato ou em glicerol-etanol, e protegidas por trealose, podem ser visualizadas na **Figura 43**.



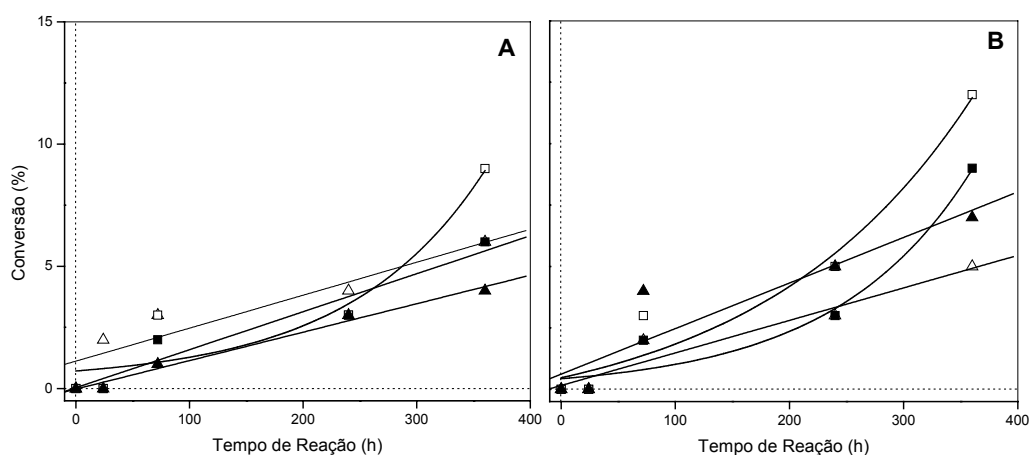
**Figura 43.** Conversões a (S)-(+)-3-hidroxiacetato de etila (**26**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A crescida em lactato (A) ou glicerol-etanol (B), imobilizada em Mont-K10, e com adição de (▲) 0,8 mL de solução de trealose a 10%, ou 1,2 (■) e 3,2 mL (□) de solução de trealose a 20%, ou 0,8 mL de água (Δ).

A cepa W303-1A imobilizada reduziu **25** com alta enantiosseletividade ( $ee > 99\%$ ). As conversões ao álcool (S)-(+)-3-hidroxiacetato de etila (**26**) foram mais baixas (~20%) do que as obtidas com os sistemas utilizando células

livres (vide **Figuras 36 e 39**). Foram observados desempenhos similares com as células cultivadas em lactato (**Figura 43A**) e em glicerol-etanol (**Figura 43B**) após a imobilização.

Novamente a adição de trealose foi importante para o aumento das conversões ao produto de redução do acetoacetato de etila (**25**). Nas reações onde apenas a água foi adicionada, as conversões foram < 5%. Os melhores sistemas com células imobilizadas na redução do acetoacetato de etila (**25**), foram aqueles quando foram adicionados 3,2 mL de solução de trealose a 20%.

As percentagens de conversão a **53** utilizando as células de *S. cerevisiae* W303-1A cultivadas em lactato ou em glicerol-etanol, e protegidas por trealose, podem ser visualizadas na **Figura 44**.



**Figura 44.** Conversões a 2-cloro-1-feniletanol (**53**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A crescida em lactato (A) ou glicerol-etanol (B), imobilizada em Mont-K10, e com adição de (▲) 0,8 mL de solução de trealose a 10%, ou 1,2 (■) e 3,2 mL (□) de solução de trealose a 20%, ou 0,8 mL de água (△).

Como pode ser observado na **Figura 44**, a imobilização das células de *S. cerevisiae* W303-1A em Mont-K10 foi bastante eficaz na proteção da

levedura na redução da halocetona **52**. As conversões ao álcool 2-cloro-1-feniletanol (**53**) aumentaram significativamente (~12%), quando comparadas às obtidas com as células não imobilizadas (~4%). Provavelmente, a barreira física do suporte abrandou o efeito tóxico do substrato sobre as células, permitindo a reação de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**). Entretanto, a seletividade das reações foi bastante baixa, e o ee variou de 1 a 30%, sendo detectada por CGQ a formação da mistura racêmica em alguns casos. Ao contrário, na redução do acetoacetato de etila (**25**), a seletividade das células imobilizadas permaneceu alta, indicando que a enantiosseletividade das reações de redução de substratos carbonílicos depende também da estrutura do substrato.

As células cultivadas em glicerol-etanol (**Figura 44B**) forneceram conversões a produto um pouco mais altas que as cultivadas em lactato (**Figura 44A**), embora a diferença não seja significativa. Neste estudo, a adição da trealose foi importante no aumento das conversões ao álcool **53**, evidenciando um efeito sinérgico da imobilização e da adição do açúcar, o que não foi observado na redução de **25**. Nestas condições a utilização das células imobilizadas (vide **Figura 43**) forneceu conversões mais baixas (~20%) que as obtidas com as livres cultivadas em glicerol-etanol (~50%) (vide **Figura 36C**).

A imobilização de células por adsorção é um método simples e eficaz para proteger o biocatalisador.<sup>[1,18,106]</sup> Entretanto, é difícil determinar o quanto a imobilização é eficiente na retenção da atividade catalítica das células vivas em solvente orgânico.<sup>[91,174]</sup> Na mistura reacional, a água adicionada é particionada entre o biocatalisador, o suporte e o meio reacional. A capacidade do suporte em atrair a água pode então influenciar a quantidade de água disponível para as células e, conseqüentemente, a atividade catalítica.<sup>[103]</sup> A fim de promover a formação de uma fina camada de água ao redor das células, é desejável a utilização de um suporte poroso hidrofílico, como aluminas, bentonita, ou argilas como a montmorilonita. Entretanto, quando o meio reacional utilizado é praticamente anidro, o suporte hidrofílico pode competir com o biocatalisador pela água disponível,<sup>[91]</sup> o que poderia ser a razão das conversões mais baixas

(~20%) a (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) observadas nestes experimentos com as células imobilizadas (vide **Figura 43**), em comparação às conversões obtidas com as células livres (~50%) (vide **Figura 36**).

Embora a imobilização das células em Mont-K10 seja uma metodologia bastante interessante para a utilização (e reutilização) de células de levedura em meio orgânico, outros estudos são necessários visando o aumento das conversões e da enantiosseletividade com os sistemas aqui testados.

#### 4.1.5 Redução de outros substratos carbonílicos

A partir dos resultados obtidos com os estudos de proteção celular, definiu-se para a levedura W303-1A o melhor sistema biocatalítico: o uso das células frescas cultivadas em glicerol-etanol e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (vide **Figura 36C**). Estas condições foram utilizadas para a biorredução de outros substratos de interesse sintético, tais como a *p*-nitroacetofenona (**21**), o *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**), a *p*-hidroxiacetofenona (**55**) e a *p*-metoxiacetofenona (**56**). As percentagens de conversão e os excessos enantioméricos estão apresentados na **Tabela 2**.

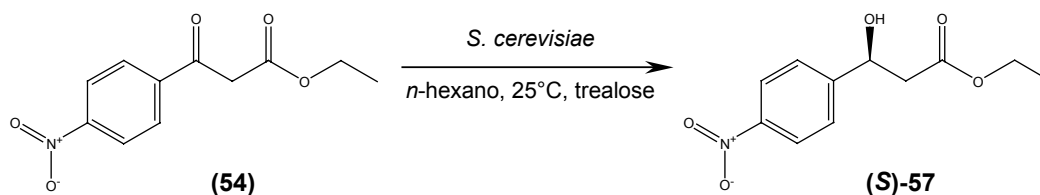
**Tabela 2.** Percentagens de conversão e excessos enantioméricos da redução de substratos carbonílicos mediada pela cepa de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A cultivada em glicerol-etanol e protegida por trealose.

Substratos Carbonílicos	%c (ee,%)			
	24h	48h	7d	15d
<i>p</i> -nitroacetofenona ( <b>21</b> )	-	-	-	-
<i>p</i> -nitrobenzoilacetato de etila ( <b>54</b> )	7 (>99)	8 (>99)	8 (>99)	10 (>99)
<i>p</i> -hidroxiacetofenona ( <b>55</b> )	-	-	-	-
<i>p</i> -metoxiacetofenona ( <b>56</b> )	-	-	-	-

Na redução da *p*-nitroacetofenona (**21**), da *p*-hidroxiacetofenona (**55**) e da *p*-metoxiacetofenona (**56**) não foi verificada a formação de produtos após 15 dias de reação, nas condições reacionais estudadas. Provavelmente, a quantidade de células utilizada (600 mg) não foi suficiente para reduzir estes substratos, pois para observar a formação de produto de biorredução destas acetofenonas substituídas utilizando o fermento de pão comercial, foi necessário utilizar 10 vezes mais do biocatalisador para reduzir 1,5 mmol de cada substrato (resultados apresentados no item 4.3.1).

Utilizando diferentes linhagens do fungo *Aspergillus terreus* na biorredução de acetofenonas nitro-substituídas em meio aquoso, Comasseto e *col.* obtiveram 98% de conversão aos álcoois quirais correspondentes.<sup>[57]</sup> A quantidade de fungo utilizada foi de 1,5-2,0 g por reação, que é consideravelmente maior que a usada neste estudo (600 mg). Além disso, a quantidade de substrato utilizada por Comasseto e *col.* foi de apenas 5 mg (0,03 mmol), sugerindo que a alta concentração de substrato utilizada neste estudo (1,5 mmol) pode ter inibido a ação da levedura.

Ao contrário do observado para as acetofenonas substituídas, 600 mg de células da cepa W303-1A foram suficientes para converter o  $\beta$ -cetoéster *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) ao álcool (*S*)-**57** em *n*-hexano (**Figura 45**).



**Figura 45.** Biorredução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**).

Após purificação parcial, a estereoquímica do álcool quiral foi determinada por polarimetria, observando-se a rotação óptica do produto de biorredução,  $[\alpha]_D^{25} = -8,5$  (0,05 g/mL, clorofórmio). Por comparação com dados da literatura ( $[\alpha]_D^{22} = -30,1$ )<sup>[175]</sup> confirmou-se a configuração absoluta do álcool, sendo (*S*)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**).



A reação apresentou excelente enantiosseletividade ( $ee > 99\%$ ), mas as conversões ao álcool (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**) foram moderadas (7-10%), se comparadas às obtidas com a redução do acetoacetato de etila (**25**) (vide **Figura 36**).

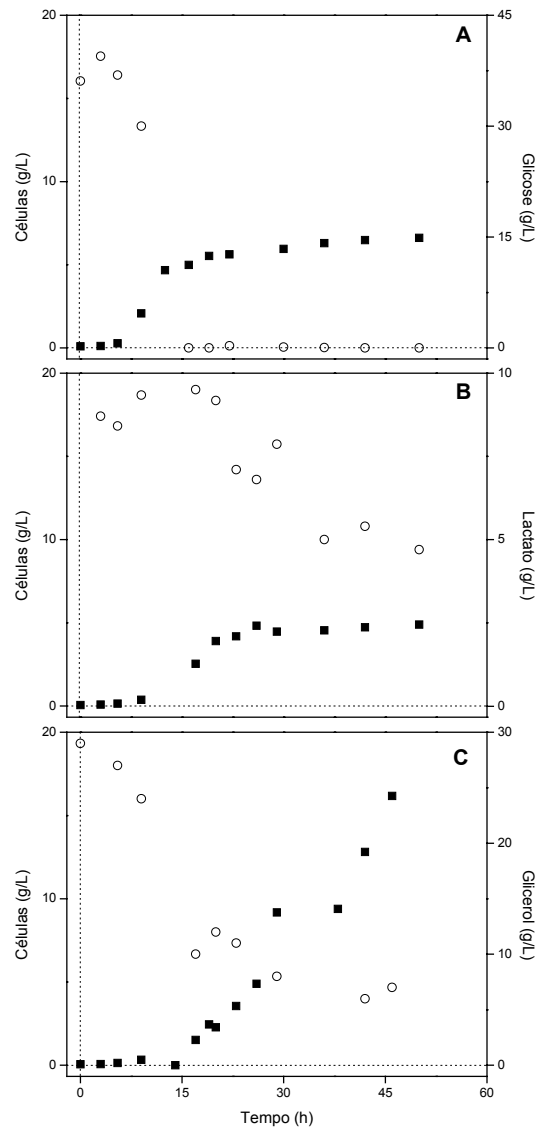
A presença do anel benzênico na estrutura do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**), bem como a sua alta massa molar quando comparado ao acetoacetato de etila (**25**) podem ter dificultado o acesso deste substrato nos sítios catalíticos da maioria das redutases da cepa W303-1A. Além disso, as cepas haplóides, como no caso da W303-1A, possuem apenas uma cópia de cada gene em seus cromossomos, o que é uma desvantagem quando comparadas às cepas comerciais, que são geralmente poliplóides e portanto possuem um metabolismo mais robusto. Como reportado por Kaluzna e *col.*, as redutases da levedura *S. cerevisiae* apresentam alta estereoespecificidade para diferentes  $\beta$ -cetoésteres, mas a atuação de diferentes enzimas simultaneamente dentro das células acabam por diminuir a eficiência do biocatalisador.<sup>[76]</sup> Apesar destes fatores, pode-se postular que esta cepa apresenta uma eficiência catalítica moderada para este substrato, pois converteu 10% em produto, após 15 dias de reação.

De modo geral, a cepa de laboratório W303-1A não se apresentou como um biocatalisador interessante para fins sintéticos, visto que os valores de conversão aos álcoois quirais obtidos foram moderados. Entretanto, esta cepa apresentou alta enantiosseletividade na redução dos dois  $\beta$ -cetoésteres testados, **25** e **54**, o que é um resultado bastante promissor para o emprego desta cepa como um biocatalisador quiral em síntese orgânica. Por outro lado, a cepa de laboratório W303-1A mostrou-se bastante adequada para o estudo da influência das condições de cultivo sobre o desempenho das células em reações de redução de carbonilas. O efeito protetor da adição de dissacarídeos ao meio reacional, bem como da imobilização das células em Mont-K10 também foi avaliado para a cepa W303-1A e observou-se um efeito protetor pronunciado da trealose sobre as células em meio orgânico na redução de todos os substratos carbonílicos testados.

## 4.2 Estudos com a Cepa de Panificação L70

### 4.2.1 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento da cepa L70 cultivadas em glicose, lactato e em glicerol-etanol estão apresentadas na **Figura 46**.



**Figura 46.** Variação da concentração celular em função do tempo para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* L70 a 30°C em (A) glicose, (B) lactato e (C) glicerol-etanol. Biomassa (■) e fonte de carbono (○).

As curvas de crescimento da cepa industrial L70 mostram que, para as células crescidas em glicose, a fase logarítmica termina após cerca de 12 h de cultivo, formando em média 4,5 g/L de biomassa. As células cultivadas em lactato também atingiram em média 4,5 g/L de biomassa no final da fase exponencial de crescimento, que durou cerca de 27 h. A levedura cultivada em glicerol-etanol formou o dobro de biomassa que a crescida em lactato, (9 g/L de células em média), ao final da fase logarítmica, que se encerrou após 30 h de cultivo.

Nota-se também na **Figura 46**, que as fontes de carbono ainda estavam presentes no meio de cultivo, garantindo o metabolismo fermentativo para as células crescidas em glicose, e oxidativo para as crescidas em etanol-glicerol ou lactato, quando estas foram coletadas para serem utilizadas nas reações de biorredução.

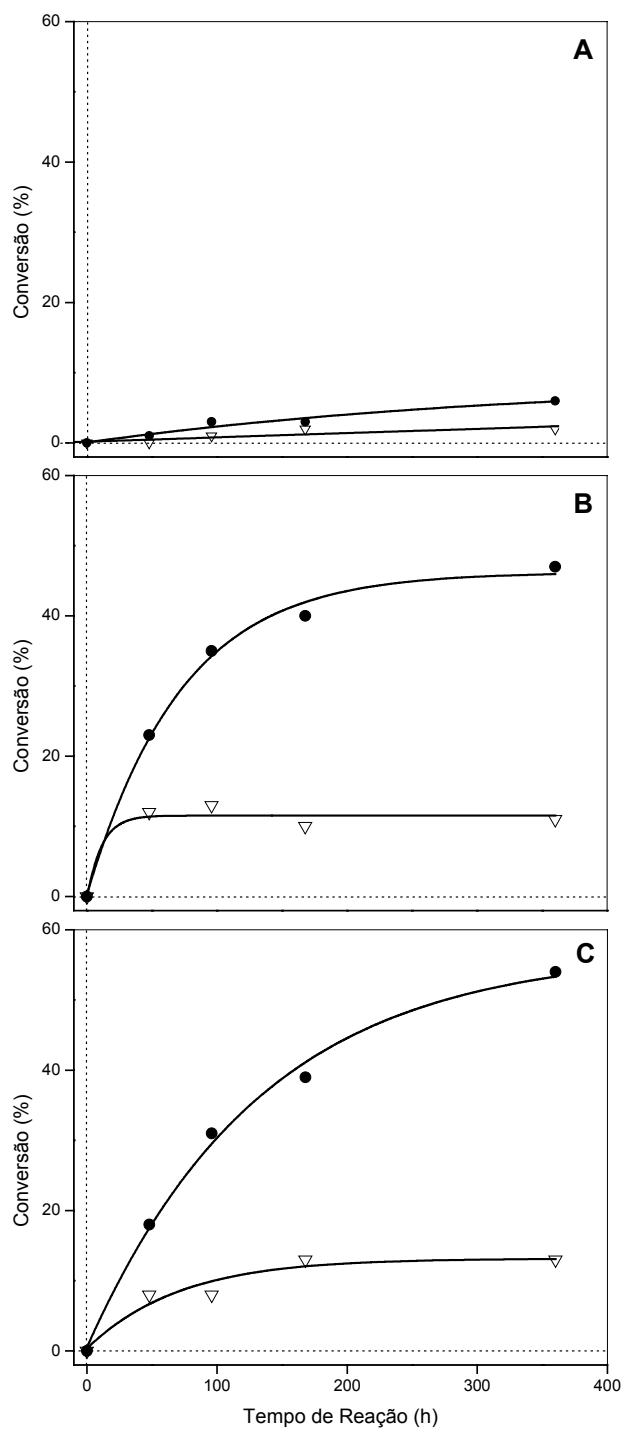
Comparando o crescimento da cepa industrial L70 (**Figura 46**) com o da W303-1A (vide **Figura 34**) observa-se uma grande semelhança no crescimento em glicose, fonte de carbono repressora da síntese de desidrogenases, bem como em lactato, fonte de carbono respirável. O rápido consumo da glicose se deve ao metabolismo fermentativo da levedura cultivada nestas condições, como descrito por Otterstedt e *col.*<sup>[160]</sup> O consumo de lactato ocorre mais lentamente que o da glicose, pois as cepas foram pré-crescidas em glicose durante o preparo do inóculo, e a presença de fonte de carbono fermentável reprime o transporte ativo de ácido láctico para dentro das células. Resultados similares foram observados por Lodi e *col.*<sup>[86,87]</sup> assim como por Cássio e *col.*<sup>[162]</sup>

Em glicerol-etanol, contudo, as curvas das duas leveduras são bastante distintas, e a cepa industrial mostrou maior capacidade de metabolizar estas fontes de carbono, produzindo mais biomassa no mesmo tempo de cultivo. Entretanto, como pode ser visto na **Figura 46C**, o consumo de glicerol pela cepa L70 foi similar ao da W303-1A (vide **Figura 34C**), sugerindo que a diferença na produção de biomassa foi devido ao consumo de etanol.

Provavelmente essa diferença se deve ao fato da cepa industrial ter uma maior facilidade de crescimento em etanol, pois se trata de uma cepa comercial poliplóide, selecionada por apresentar alta produção de biomassa.

#### *4.2.2 Redução de substratos carbonílicos em n-hexano*

A cepa industrial de *S. cerevisiae* L70 foi utilizada primeiramente na redução do acetoacetato de etila (**25**) em *n*-hexano. As percentagens de conversão ao álcool (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) utilizando as células cultivadas nas diferentes fontes de carbono, protegidas por 2,4 mL de solução de trealose a 10%, podem ser visualizadas na **Figura 47**. O ee do produto (S)-(+)-**26** foi > 99 % em todas as reações estudadas.



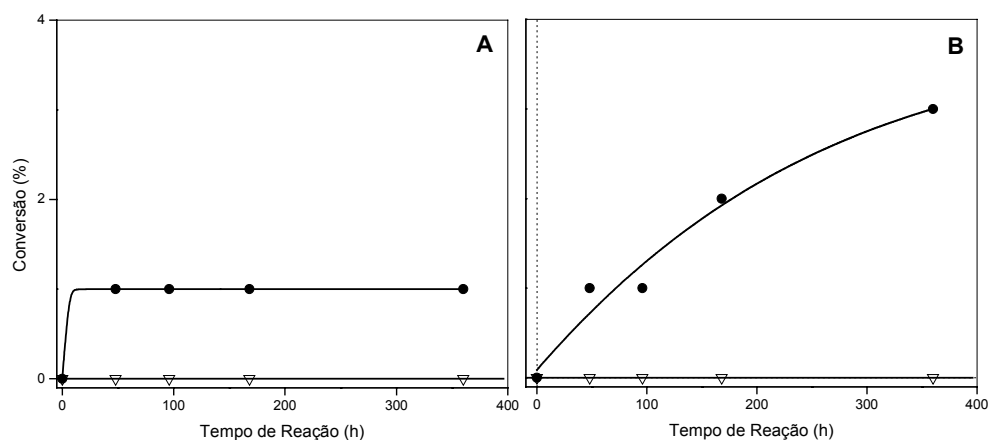
**Figura 47.** Conversões a (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* L70 cultivada em glicose (A), lactato (B), ou glicerol-etanol (C), e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (●), ou de 2,4 mL de água (▽).

Observa-se na **Figura 47A** que as células reprimidas, cultivadas em glicose, não foram capazes de reduzir o acetoacetato de etila (**25**), resultado este que está de acordo com os obtidos na redução com a cepa W303-1A (vide **Figura 36A**). Novamente, a repressão do metabolismo respiratório pela glicose impediu a biossíntese das oxidoredutases, e foi formado muito pouco do produto (1-5%). As células cultivadas em glicose não foram capazes de sintetizar as enzimas necessárias para reduzir o acetoacetato de etila, mesmo após vários dias de reação. Resultado similar já havia sido observado com a cepa W303-1A (vide **Figura 36A**).

As células cultivadas em lactato (**Figura 47B**) ou em glicerol-etanol (**Figura 47C**) reduziram **25** com alta seletividade (ee > 99%), e os valores de conversão foram similares aos obtidos com a cepa W303-1A (~50%). Fica mais uma vez evidente a importância da adição de trealose ao meio reacional, promovendo um aumento significativo nas conversões ao álcool quiral (S)-(+)-3-hidroxiacetato de etila (**26**), quando comparadas às obtidas nas reações onde apenas a água foi adicionada. O melhor resultado obtido na redução do acetoacetato de etila (**25**) em *n*-hexano foi obtido com as células da levedura L70 cultivadas em glicerol-etanol, sendo de 54% de conversão após 15 dias.

Para as reações de redução subsequentes dos substratos carbonílicos *p*-nitroacetofenona (**21**),  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**), *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**), *p*-hidroxiacetofenona (**55**) e *p*-metoxiacetofenona (**56**), em solvente orgânico, a levedura *S. cerevisiae* L70 foi cultivada apenas em lactato ou em glicerol-etanol.

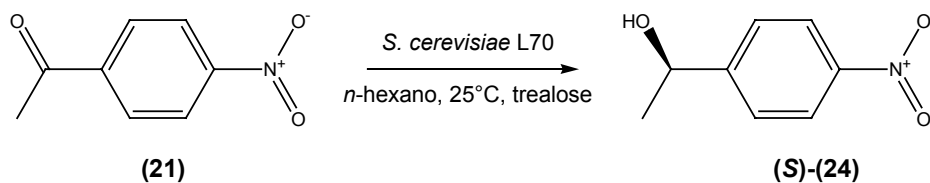
As percentagens de conversão a 2-cloro-1-feniletanol (**53**) utilizando as células de *S. cerevisiae* L70 cultivadas em lactato ou em glicerol-etanol, protegidas por 2,4 mL de uma solução de trealose a 10%, podem ser visualizadas na **Figura 48**.



**Figura 48.** Conversões a 2-cloro-1-feniletanol (**53**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* L70 cultivada em lactato (A) ou glicerol-etanol (B), e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (●), ou de 2,4 mL de água (▽).

Assim como a cepa W303-1A (vide **Figura 38**), a L70 não foi capaz de reduzir eficientemente a  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**). As conversões não foram superiores a 3% e a seletividade variou entre 50 e 99%, em média. Com adição de água e ausência de açúcar protetor não houve formação de produto, mesmo após 15 dias de reação (**Figura 48**).

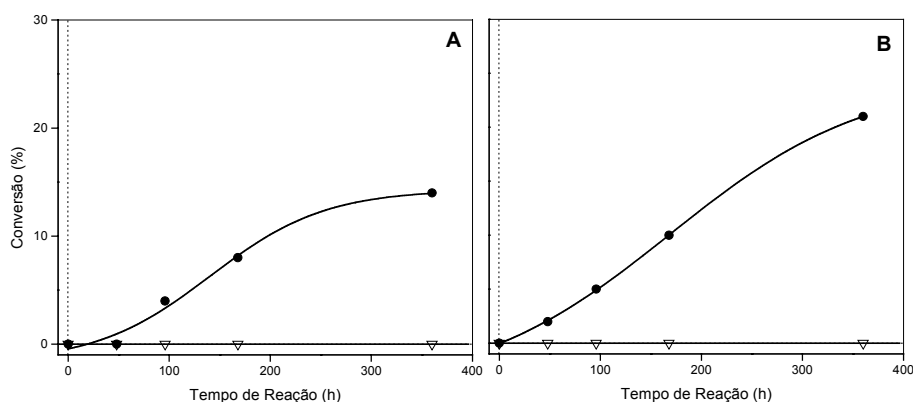
Ao contrário da cepa W303-1A, a L70 reduziu a *p*-nitroacetofenona (**21**) com alta enantiosseletividade (ee > 99%), produzindo o álcool quiral (S)-(-)-1-(4-nitrofenil)etanol (**24**) (**Figura 49**).



**Figura 49.** Biorredução da *p*-nitroacetofenona (**21**).

A configuração absoluta do produto de biorredução da *p*-nitroacetofenona (**21**) foi determinada através da medida polarimétrica da rotação óptica do álcool produzido, parcialmente purificado. Observou-se para o enantiômero formado, o valor de  $[\alpha]_D^{25}$  de -6,94, (0,03 g/mL, clorofórmio). Em seguida, comparou-se com dados obtidos da literatura,  $[\alpha]_D^{25} = -29,7^{[176]}$  e confirmou-se a obtenção do composto quiral (S)-(-)-1-(4-nitrofenil)etanol (**24**).

As percentagens de conversão ao álcool (S)-**24** em *n*-hexano obtidas com a cepa L70 cultivada em lactato ou em glicerol-etanol, com adição de trealose a 10% ou de água podem ser observadas na **Figura 50**.



**Figura 50.** Conversões a (S)-(-)-1-(4-nitrofenil)etanol (**24**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* L70 cultivada em lactato (A) ou glicerol-etanol (B), e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (●), ou de 2,4 mL de água (▽).

Como pode ser observado na **Figura 50**, quando solução de trealose foi adicionada ao meio reacional, a cepa L70 reduziu o substrato **21** com conversões moderadas (~20%). Resultados semelhantes foram observados por Andrade e *col.* na redução desta acetofenona utilizando *Coriandrum sativum* como biocatalisador. O álcool (S)-**24** foi obtido com 16% de conversão e ee > 98%.<sup>[177]</sup>

As células cultivadas em etanol-glicerol obtiveram melhor desempenho que as em lactato na redução desta acetofenona, convertendo-a em 21% ao



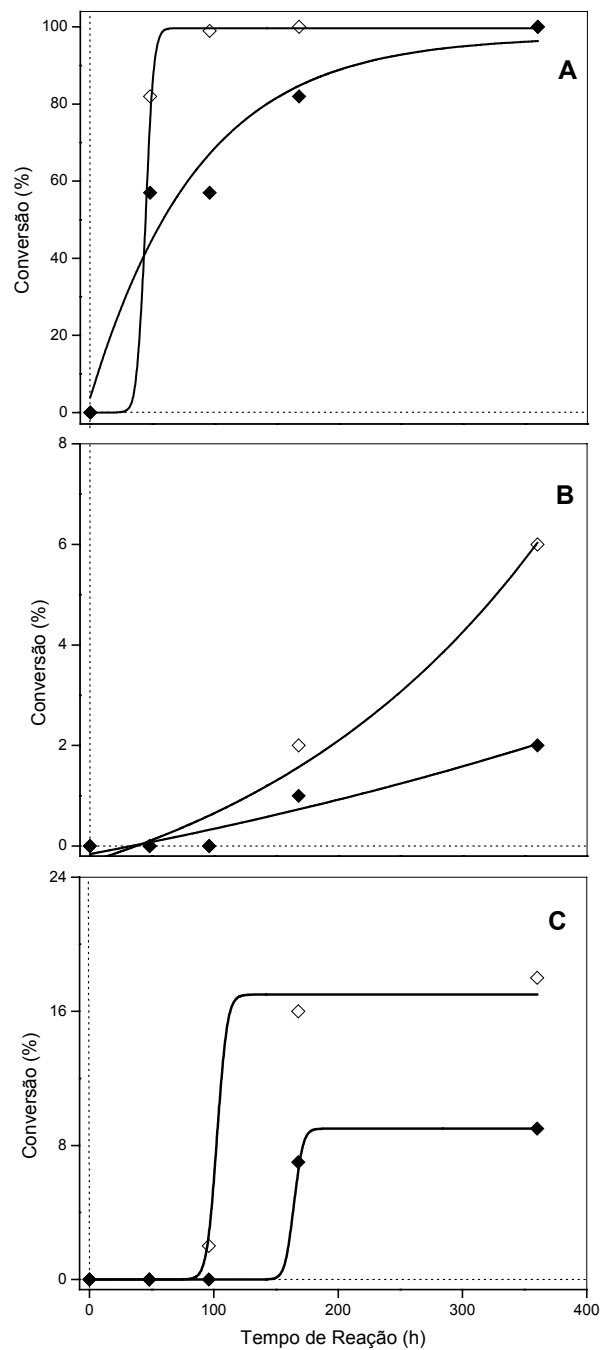
álcool quiral (S)-(-)-1-(4-nitrofenil)etanol (**24**). Na ausência de trealose, não houve formação do produto, corroborando o efeito protetor deste açúcar.

Não foi observada formação de produto na redução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) pelas células da levedura *S. cerevisiae* L70 cultivadas em lactato ou em glicerol-etanol, após 15 dias de reação. Este resultado não era esperado, considerando que com a cepa W303-1A cultivada em glicerol-etanol a conversão do  $\beta$ -cetoéster **54** ao álcool (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**) foi de 10% e com ee > 99% (vide **Tabela 2**). Este resultado sugere uma grande diferença existente entre as oxidoredutases produzidas pelas duas cepas de *S. cerevisiae*, provavelmente devido ao maior consumo de etanol pela L70 durante o crescimento em glicerol-etanol, induzindo assim a biossíntese de redutases diferentes das da W303-1A quando cultivada nesta fonte de carbono.

A cepa L70 de *S. cerevisiae* não foi capaz de reduzir a *p*-hidroxiacetofenona (**55**) nem a *p*-metoxiacetofenona (**56**). Nenhum produto foi observado após 15 dias (360 h) de reação, nas condições reacionais testadas.

#### 4.2.3 Efeito protetor da imobilização

A cepa L70 cultivada em lactato ou em glicerol-etanol foi imobilizada em Mont-K10 e submetida às reações de redução dos substratos carbonílicos *p*-nitroacetofenona (**21**), acetoacetato de etila (**25**),  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) e *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**). As percentagens de conversão aos respectivos álcoois, utilizando as células imobilizadas de *S. cerevisiae* L70 cultivadas em lactato ou em glicerol-etanol, com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10%, pode ser visualizada na **Figura 51**. Não foram realizadas reações na ausência de solução de trealose, considerando que nos experimentos anteriores observou-se que sem a adição deste açúcar, não se obtiveram resultados satisfatórios.



**Figura 51.** Conversões a (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) (A), (R)-(-)-2-cloro-1-feniletanol (**53**) (B) e (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil) propanoato de etila (**57**) (C) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* L70 crescida em lactato (◇) ou glicerol-etanol (◆), imobilizada em Mont-K10, e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10%.

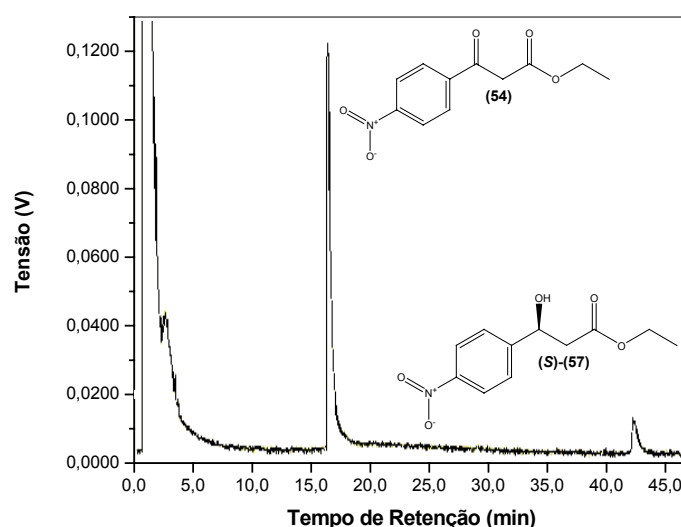
De modo geral, observa-se na **Figura 51** que as células da cepa industrial L70 cultivadas em lactato apresentaram melhor desempenho que as cultivadas em glicerol-etanol, quando imobilizadas em Mont-K10. As células cultivadas em lactato reduziram todos os substratos carbonílicos com maior eficiência que as crescidas em glicerol-etanol. Esta diferença não havia sido observada para as células da cepa W303-1A (vide **Figura 43**).

Na redução do acetoacetato de etila (**Figura 51A**), o sistema biocatalítico utilizando as células da cepa L70 crescidas em glicerol-etanol imobilizadas foi bastante eficaz, convertendo 100% do substrato ao álcool quiral (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**), com ee > 99%. A imobilização do biocatalisador aumentou as conversões ao produto **26**, em relação ao uso das células livres (vide **Figura 47**), onde um máximo de 54% do substrato foi convertido pelas células cultivadas em glicerol-etanol.

Após imobilização em Mont-K10, as células cultivadas em lactato apresentaram melhor comportamento que as crescidas em glicerol-etanol, reduzindo todo o substrato **25** em 96 h de reação. Este resultado diverge do observado para as células da cepa W303-1A imobilizadas no mesmo suporte (vide **Figura 43**). Quando utilizada na forma imobilizada, tanto as cultivadas em lactato como em glicerol-etanol apresentaram resultados similares, fornecendo conversões em torno de 20%, e as conversões obtidas com as células livres foram maiores na redução do acetoacetato de etila (**25**).

Na **Figura 51B** observa-se que a levedura L70 imobilizada em montmorilonita reduziu a  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) com pouca eficiência. Mesmo tendo aumentado as conversões em comparação ao uso das células livres (vide **Figura 48**), os valores continuaram baixos (máximo de 6%), sugerindo uma grande dificuldade das células em reduzir esta halocetona. O excesso enantiomérico, entretanto, foi > 99%, e apenas o álcool (R)-(-)-2-cloro-1-feniletanol (**53**) foi formado, indicando um aumento na seletividade do biocatalisador após a imobilização.

As células da cepa L70 imobilizadas em Mont-K10 reduziram o  $\beta$ -cetoéster *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) com alta seletividade (ee > 99%) em todas as reações estudadas (**Figura 51C**). Para a redução deste substrato, a imobilização da levedura foi fundamental, pois com as células livres não foi verificada a formação do produto **57**. As células cultivadas em lactato converteram 18% do substrato em 15 dias de reação, produzindo apenas o álcool (*S*)-**57**. A **Figura 52** mostra um cromatograma de uma alíquota após 15 dias de reação.



**Figura 52.** Cromatograma de CGQ para uma alíquota da reação de redução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) em *n*-hexano a 25°C com células cultivadas em lactato e imobilizadas em Mont-K10, após 15 dias. O produto (*S*)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**) foi obtido com 18% de conversão (ee > 99%). [Condições experimentais: Inj. = 250°C, Det. = 275°C, T<sub>i</sub> = 70°C, T<sub>f</sub> = 150°C, Δ<sub>aq</sub> = 2°C/min, PH<sub>2</sub> = 75 kPa].

A levedura L70 imobilizada em Mont-K10 não reduziu a *p*-nitroacetofenona (**21**) nas condições testadas, mesmo após 15 dias de reação. Talvez o meio reacional composto pelo solvente orgânico, suporte e solução de açúcar tenha dificultado a difusão do substrato até as células, impedindo que a reação ocorresse.

#### 4.2.4 Experimentos em sistema bifásico

A fim de verificar o desempenho das células cultivadas em lactato ou em glicerol-etanol em sistema bifásico, o biocatalisador foi utilizado na redução do acetoacetato de etila (**25**). As percentagens de conversão ao produto (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**) estão apresentados na **Tabela 3**. O excesso enantiomérico do álcool (S)-**26** em todas as reações foi > 99%.

**Tabela 3.** Percentagens de conversão na redução do acetoacetato de etila em sistema bifásico,\* mediada pela cepa de *Saccharomyces cerevisiae* L70 cultivada em lactato ou em glicerol-etanol.

Fonte de carbono	Conversão (%)			
	24h	48h	7d	15d
Lactato	10	15	21	43
Glicerol-Etanol	6	24	86	88

\* 25 mL de *n*-hexano + 25 mL de solução tampão ácido cítrico/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 4,5

Como pode se observar na **Tabela 3**, a cepa L70 cultivada em glicerol-etanol converteu eficientemente o acetoacetato de etila (**25**) em sistema bifásico, formando 86% do álcool quiral (S)-**26** em 7 dias de reação. Entretanto, o mesmo não aconteceu com as células crescidas em lactato, que converteram praticamente a metade da quantidade de substrato **25** que as crescidas em glicerol-etanol após 15 dias de reação. Estes resultados sugerem, mais uma vez, uma notável diferença entre as enzimas oxidorrredutoras produzidas pelas células cultivadas em lactato ou em glicerol-etanol.

O sistema bifásico, composto por *n*-hexano e tampão ácido cítrico/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 4,5) favoreceu a atuação das células cultivadas em glicerol-etanol, que tiveram um bom desempenho com este sistema. A grande vantagem em utilizar o sistema bifásico está no fato de que o substrato carbonílico solubiliza-se na fase orgânica enquanto as células estão na fase

aquosa,<sup>[105,125]</sup> diminuindo consideravelmente o estresse causado pelo contato direto do biocatalisador com o meio orgânico.

Contudo, comparando o desempenho das células cultivadas em glicerol-etanol em sistema bifásico com os resultados obtidos utilizando essas células imobilizadas em Mont-K10 (vide **Figura 51A**), verifica-se que, ao contrário do sistema bifásico, o método de imobilização por adsorção favoreceu as células cultivadas em lactato, que converteram 100% do acetoacetato de etila (**25**) em apenas 96 h de reação, enquanto que as cultivadas em glicerol-etanol somente converteram 100% do substrato **25** após 7 dias. Nota-se a partir destes resultados que o tipo de sistema utilizado na reação de biorredução influencia significativamente a atuação das células cultivadas em fontes de carbono diferentes. A levedura cultivada em lactato sobressaiu-se quando imobilizada em montmorilonita K10, enquanto a crescida em glicerol-etanol foi favorecida pelo sistema bifásico.

De modo geral, a cepa industrial L70 apresenta um potencial interessante para ser utilizada como catalisador quiral em síntese orgânica. A partir dos experimentos com a cepa L70 pôde-se verificar que além das modificações das condições de cultivo do biocatalisador, as alterações no sistema biocatalítico utilizado também têm um papel fundamental sobre o desempenho das células, e em especial no que se refere à conversão a produtos com alta enantiosseletividade.

### 4.3 Estudos com o Fermento de Pão Comercial

Os estudos utilizando o fermento de pão comercial em *n*-hexano foram iniciados por Zanotto<sup>[17,18]</sup> em nosso grupo de pesquisa. Foi verificada a importância da adição de açúcares (sacarose e trealose) ao meio reacional, bem como da imobilização do biocatalisador na redução do acetoacetato de etila (**25**) e da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**). A partir destes dados prévios, definiu-se a quantidade de fermento e de água (ou de solução de açúcar) a serem

utilizados nos sistemas biocatalíticos para a redução destes dois substratos carbonílicos. Essa metodologia, bem como a de imobilização do FP foi também utilizada neste estudo.

#### 4.3.1 Reações em *n*-hexano

As acetofenonas substituídas **20**, **21**, **55** e **56** foram submetidas à reação de redução mediada pelo fermento de pão comercial em *n*-hexano. A quantidade de FP utilizada foi de 6 g por reação. Essa quantidade foi maior do que a testada por Zanotto,<sup>[17]</sup> que utilizou 4 g do biocatalisador. Com esta quantidade de FP, e ausência de trealose, não foi observada a formação de produto na redução destas acetofenonas.

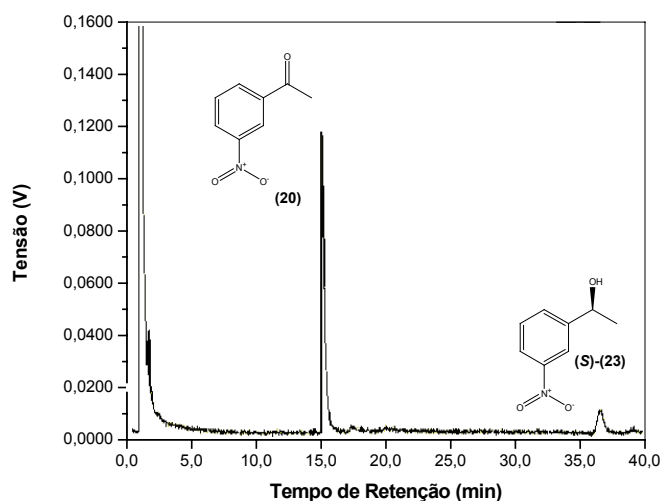
As percentagens de conversão e os excessos enantioméricos do produto, obtidos a partir das reações de redução das acetofenonas substituídas mediada pelo FP, com a adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% são apresentados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Percentagens de conversão e excessos enantioméricos (%) da redução de acetofenonas substituídas em *n*-hexano, mediada pelo fermento de pão comercial e adição de 2,4 mL de trealose a 10%.

Substratos Carbonílicos	%c (ee,%)			
	48h	96h	7d	15d
<i>m</i> -nitroacetofenona ( <b>20</b> )	5 (99)	5 (99)	13 (99)	17 (75)
<i>p</i> -nitroacetofenona ( <b>21</b> )	13 (8)	22 (13)	37 (9)	41 (7)
<i>p</i> -hidroxiacetofenona ( <b>55</b> )	-	-	4 (24)	24 (7)
<i>p</i> -metoxiacetofenona ( <b>56</b> )	-	4 (99)	8 (67)	10 (66)

Pode-se observar na **Tabela 4** que o FP foi capaz de reduzir as quatro acetofenonas substituídas em *n*-hexano. Este é um resultado interessante, visto que anteriormente, utilizando quantidade de fermento menor (4 g), e sem a adição de trealose, esses substratos não haviam sido reduzidos.<sup>[17]</sup>

Na redução da *m*-nitroacetofenona (**20**) o biocatalisador foi bastante seletivo, formando apenas um dos enantiômeros, o álcool (*S*)-(-)-1-(3-nitrofenil)etanol (**23**) em 7 dias de reação. As conversões a produto foram moderadas, alcançando 17% em 15 dias de reação (360 h). O cromatograma de uma alíquota após 15 dias de reação pode ser observado na **Figura 53**.



**Figura 53.** Cromatograma de CGQ para uma alíquota da reação de redução da *m*-nitroacetofenona (**20**) em *n*-hexano a 25°C com fermento de pão comercial protegido por 2,4 mL de solução de trealose a 10%. O produto (*S*)-(-)-1-(3-nitrofenil)etanol (**23**) foi obtido com 17% de conversão (ee > 99%). [Condições experimentais: Inj. = 250°C, Det. = 275°C,  $T_i = 70^\circ\text{C}$ ,  $T_f = 150^\circ\text{C}$ ,  $\Delta_{\text{aq}} = 2^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $\text{PH}_2 = 75 \text{ kPa}$ ].

A configuração absoluta do produto de biorredução da *m*-nitroacetofenona (**20**) foi obtida a partir da rotação óptica determinada polarimetricamente, após purificação parcial,  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -13,7$  (0,06 g/mL, clorofórmio). Por comparação com o  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  obtido da literatura, de  $+33,2$ <sup>[178]</sup> para o composto (*R*)-(+)-1-(3-nitrofenil)etanol (**23**), confirmou-se a obtenção do álcool quiral (*S*)-(-)-1-(3-nitrofenil)etanol (**23**) como produto da biorredução.

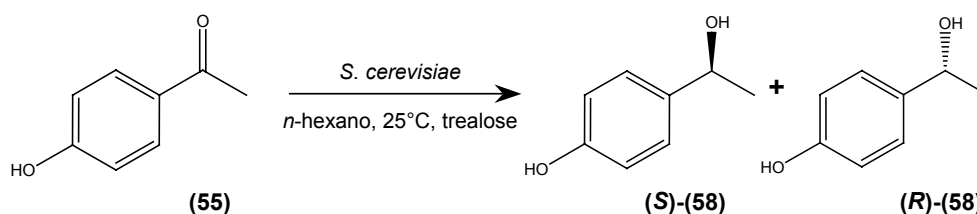
A *p*-nitroacetofenona (**21**) foi reduzida com mais eficiência pelo fermento de pão comercial em *n*-hexano do que a *m*-nitroacetofenona (**20**). As



conversões foram de 41% após 15 dias. Entretanto, a seletividade do biocatalisador para este substrato foi bastante baixa, e os dois enantiômeros (S)- e (R)-**24** foram produzidos simultaneamente (**Tabela 4**).

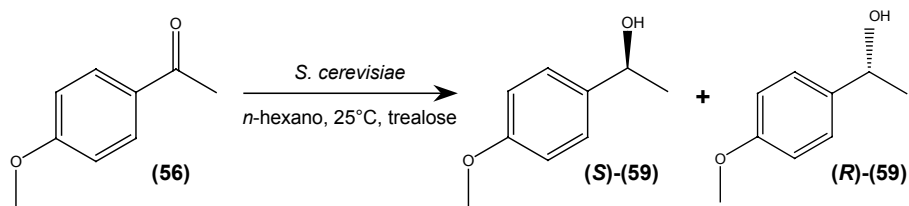
O fermento de pão, por ser produzido com a intenção de suportar condições de estresse tais como baixas temperaturas durante a estocagem e baixa atividade de água devido ao processo de liofilização, apresenta maior resistência ao solvente orgânico que as cepas cultivadas em laboratório. Por esta razão, o FP possui uma atividade catalítica maior em *n*-hexano. Provavelmente mais de uma redutase com estereoespecificidade diferente atue simultaneamente, e assim diminua a enantiosseletividade do álcool (S)-(-)-1-(4-nitrofenil)etanol (**24**).

Na biorredução da acetofenona **55** (**Figura 54**), o substrato somente começou a ser reduzido após um longo período de reação (7 dias). Após 15 dias, 24% da *p*-hidroxiacetofenona (**55**) havia sido convertida ao produto 1-(4-hidroxifenil)etanol (**58**), mas com baixa seletividade (ee = 7%) (**Tabela 4**).



**Figura 54.** Biorredução da *p*-hidroxiacetofenona (**55**).

Na redução da *p*-metoxiacetofenona (**56**) (**Figura 55**), o fermento de pão comercial foi pouco eficiente, quando comparado ao seu desempenho na redução das demais acetofenonas substituídas. Apenas 10% do substrato foi convertido ao produto 1-(4-metoxifenil)etanol (**59**) em 15 dias de reação, com moderada seletividade (ee = 66%) (**Tabela 4**). Utilizando as células de *Rhodotorula* sp em meio aquoso, Yang e *col.* obtiveram resultados mais interessantes na redução do substrato **56**. Observou-se 50% de conversão, com rendimento de 35%, ao álcool (S)-**59** (ee > 99%) em 24 h de reação.<sup>[178]</sup>

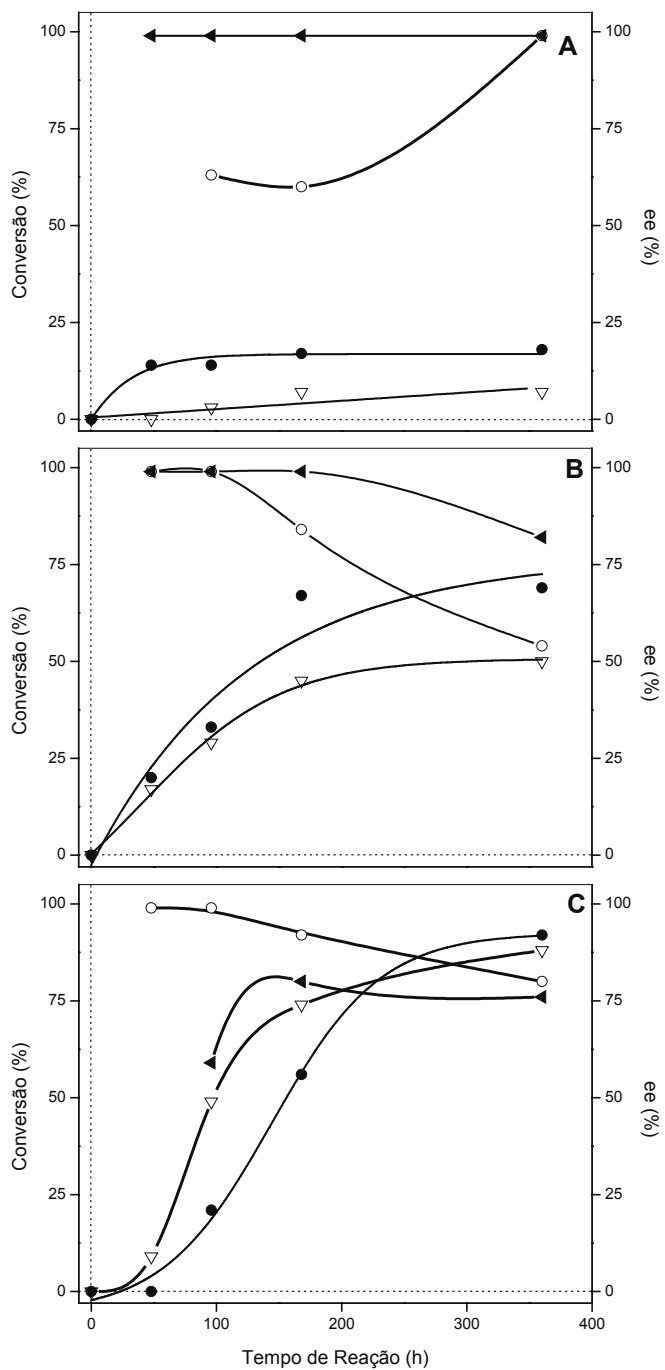


**Figura 55.** Biorredução da *p*-metoxiacetofenona (**56**).

Analisando as conversões a produto obtidas a partir da redução das acetofenonas com substituintes no anel benzênico, percebe-se que a *p*-nitroacetofenona (**21**) foi reduzida mais facilmente. Este era um resultado esperado, pois o grupamento nitro, sendo retirador de elétrons por efeito de ressonância e por efeito indutivo, deixa o carbono carbonílico da acetofenona mais deficiente em elétrons, ou seja, este adquire um caráter positivo mais acentuado, favorecendo o ataque nucleofílico do hidreto. Analogamente, pode-se associar as baixas percentagens de conversão obtidas na redução das acetofenonas contendo os grupos substituintes *p*-hidróxi ou *p*-metóxi, que são doadores de elétrons por efeito de ressonância, e à menor susceptibilidade do carbono carbonílico à adição nucleofílica, pois estes grupos deixam o carbono com caráter menos positivo.<sup>[27,180]</sup>

Quando se comparam os resultados obtidos na redução da *p*-nitroacetofenona (**21**) com a da *m*-nitroacetofenona (**20**), nota-se que o grupamento retirador de elétrons na posição *para* ao carbono carbonílico favorece a reação de redução, quando comparada à acetofenona *meta* substituída. Este resultado pode ser explicado a partir dos efeitos eletrônicos causados no anel benzênico. Quando o grupo nitro está na posição *para*, observa-se que, em uma das estruturas de ressonância, a carga positiva no anel aromático está no carbono próximo ao carbonílico. Este efeito não é observado com o substituinte em *meta*.<sup>[27,180]</sup>

Na redução do substrato *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) mediada pelo FP em *n*-hexano, foi feito um estudo da quantidade de biocatalisador. As conversões ao álcool **57** e os ee obtidos, utilizando 2, 4 e 6 g de FP e com adição de 2,4 mL de água ou solução de trealose a 10% estão na **Figura 56**.



**Figura 56.** Conversões a (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando 2 g (A), 4 g (B), ou 6 g (C) de fermento de pão comercial e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (●), ou 2,4 mL de água (▽), e os correspondentes excessos enantioméricos (%) das reações contendo solução de trealose a 10% (◄) ou água (○).

A redução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) vem sendo testada em diferentes sistemas biocatalíticos, devido à aplicação importante do álcool quiral (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**) e de seus análogos como precursores na síntese de fármacos importantes como fluoxetina, tomoxetina, nikomicinas e neopolimicinas.<sup>[78,79,175,181,182]</sup> Recentemente, Milagre e *col.* utilizaram as células livres da levedura *Pichia kluyeri* na redução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) em tampão citrato-fosfato com adição de glicose. Em condições reacionais otimizadas, o álcool S- (**57**) foi obtido com conversões > 97% e ee > 95%.<sup>[79]</sup> Em um outro estudo, Salvi e *col.* obtiveram 80% de conversão ao álcool (S)-**57** (ee > 98%) com o fungo *Rizhopus nivius* em meio aquoso, após testar diferentes espécies deste microrganismo na redução do β-cetoéster **54**.<sup>[175]</sup>

O sistema biocatalítico que se mostrou mais enantiosseletivo na redução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) em meio orgânico foi com 2g de FP e adição de trealose (**Figura 56A**), onde o ee manteve-se > 99% durante toda a reação, e apenas o enantiômero (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**) foi formado. Entretanto, as percentagens de conversão foram baixas (máximo de 18%), quando comparadas às dos sistemas utilizando 4 ou 6 g (**Figuras 56B e 56C**), ou quando comparadas às obtidas por Milagre e *col.* com as células da levedura *P. kluyeri* em meio aquoso.<sup>[79]</sup>

Quando 6 g de fermento de pão foi utilizado em meio orgânico na presença de trealose, o β-cetoéster **54** foi reduzido eficientemente, e 92% do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) foi convertido em 15 dias de reação (**Figura 56C**). Na reação onde apenas água foi adicionada, o FP também demonstrou bom desempenho, e obteve-se 88% do álcool **57**. O ee do produto das reações utilizando 6 g de FP com adição de trealose foi no máximo de 80%. Com a adição de água o ee do produto (S)-**57** diminuiu um pouco após 7 dias de reação, sendo de 92 para 80%.

Observa-se na **Figura 56C** que a adição de 6 g de FP à reação de redução do β-cetoéster (**54**) forneceu as maiores conversões ao produto **57**,

quando comparada ao uso de 2 ou 4 g do biocatalisador (**Figuras 56A e 56C**, respectivamente). Esta quantidade de levedura foi então utilizada nas reações de redução subsequentes desse substrato. Em geral, os valores de ee apresentaram uma pequena diminuição quando utilizou-se 4 ou 6 g de FP.

#### 4.3.2 Estudos com o Fermento de Pão Imobilizado

O fermento de pão comercial foi imobilizado em Mont-K10 e submetido às reações de redução dos substratos carbonílicos.

Primeiramente foi realizado um estudo complementar ao realizado por Zanotto, na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) mediada pelo FP imobilizado em Mont-K10, recoberto ou não por gelatina a 20°C.<sup>[17]</sup> A adição de açúcares (sacarose ou trealose) também foi avaliada.

As percentagens de conversão ao 2-cloro-1-feniletanol (**53**), bem como os excessos enantioméricos obtidos com os diferentes sistemas biocatalíticos testados, empregando 4 g do fermento de pão comercial<sup>[17]</sup> a 30°C podem ser observados na **Tabela 5**. A fim de comparação, os sistemas utilizando somente água (3,2 mL) ou soluções de açúcares (3,2 mL a 10%) foram também testados.

Ao contrário do observado por Qun e *col.*,<sup>[102]</sup> verificou-se neste trabalho que a tolerância do FP ao meio orgânico foi maior a 20°C que a 30°C. A  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) foi reduzida mais eficientemente quando o FP imobilizado, foi utilizado nas reações a 20°C sendo obtidas conversões e excessos enantioméricos maiores que a 30°C.<sup>[17]</sup>

**Tabela 5.** Percentagens de conversão e excessos enantioméricos (%) da redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) em *n*-hexano a 30°C, mediada pelo FP em diferentes sistemas biocatalíticos.

Entrada	Sistema Biocatalítico*	%c (ee,%)				
		24h	48h	72h	120h	168h
1	FP/H <sub>2</sub> O	14 (56)	15 (49)	14 (48)	15 (50)	16 (49)
2	FP/T	12 (62)	17 (52)	16 (52)	16 (55)	17 (53)
3	FP/S	12 (58)	13 (58)	12 (55)	15 (52)	15 (53)
4	FP/G/H <sub>2</sub> O	17 (46)	18 (46)	18 (33)	18 (42)	19 (42)
5	FP/G/T	9 (57)	9 (54)	10 (50)	10 (48)	12 (46)
6	FP/G/S	9 (64)	9 (56)	10 (57)	11 (59)	11 (54)
7	FP/K10/H <sub>2</sub> O	6 (65)	7 (62)	6 (63)	7 (65)	7 (76)
8	FP/K10/T	11 (80)	13 (68)	14 (68)	13 (72)	14 (69)
9	FP/K10/S	9 (81)	13 (76)	15 (70)	13 (70)	15 (72)
10	FP/K10/G/H <sub>2</sub> O	7 (78)	8 (76)	7 (80)	9 (72)	8 (76)
11	FP/K10/G/T	15 (99)	16 (72)	17 (71)	19 (74)	20 (75)
12	FP/K10/G/S	7 (75)	9 (68)	11 (73)	12 (69)	11 (67)

\*G = gelatina; T = solução de trealose; S = solução de sacarose, K10 = Mont-K10

Como pode ser observado na **Tabela 5**, de forma geral, as conversões ao produto **53** foram moderadas, não sendo superior a 20%. Nota-se que as percentagens de conversão não aumentam significativamente ao longo do tempo, ou seja, após 48h de reação, tem-se um “platô” e as conversões permaneceram praticamente constantes. Após atingirem um valor máximo de conversão, as células não foram capazes de continuar reduzindo a acetofenona **52**, talvez pela inibição de sua atividade catalítica causada pelo substrato ou produto. A seletividade das reações de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona foi, em geral, baixa quando as células livres foram empregadas (**Entradas 1-6**), aumentando com o uso da técnica de imobilização (**Entradas 7-12**).

A adição de trealose ou sacarose ao meio reacional, onde as células foram utilizadas na forma livre (**Entradas 2 e 3**), não melhorou as conversões a produto quando comparado com o resultado obtido com a adição de água

(**Entrada 1**). Com estes três sistemas, percebe-se que a seletividade foi um pouco maior nas reações com adição de açúcares. Entretanto, o ee não foi maior que 62% (**Entrada 2**).

Recobrando o FP com gelatina, percebe-se um pequeno aumento das conversões com o sistema FP/G/H<sub>2</sub>O (**Entrada 4**), quando comparado ao uso das células livres (**Entrada 1**). Porém, a seletividade da reação diminuiu. A adição de açúcares às células de FP recobertas com gelatina (**Entradas 5 e 6**) não foi uma boa estratégia, visto que as conversões diminuíram 8% em média, em relação às obtidas com o sistema onde apenas água foi adicionada (**Entrada 4**). Provavelmente o sistema formado por gelatina/açúcar formou uma barreira física maior que dificultou a difusão do substrato até o biocatalisador, diminuindo consideravelmente a formação de produto. Por outro lado, a enantioseletividade dos sistemas FP/G com adição de açúcar foi maior que a dos FP/G/H<sub>2</sub>O, principalmente com adição de sacarose (**Entrada 6**). Com este sistema, a reação foi mais lenta, porém mais seletiva.

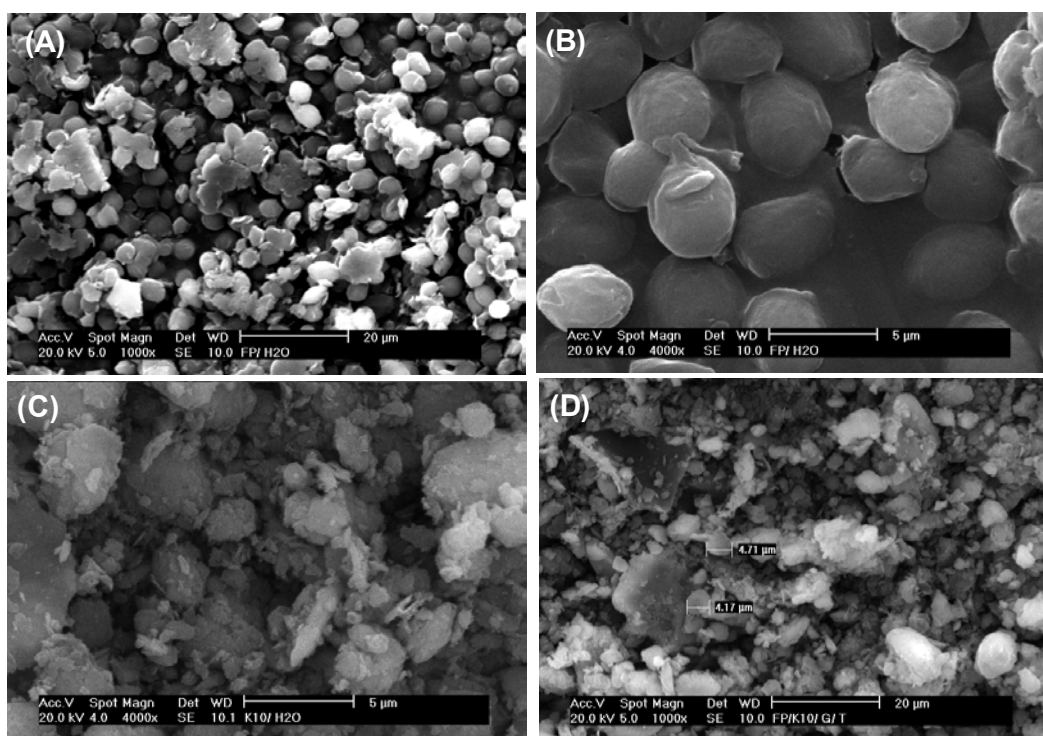
A imobilização do fermento de pão comercial em montmorilonita K10 favoreceu a seletividade para este substrato (**Entradas 7, 8 e 9**), e obteve-se o produto 2-cloro-1-feniletanol (**53**) com ee de 81%, utilizando sacarose (**Entrada 9**). As conversões foram maiores quando se adicionou açúcar (em torno de 15% para o sistema FP/K10/S) em comparação com os resultados obtidos com adição de água. Com as células imobilizadas e sem adição de açúcar, foram observadas baixas conversões a, sendo de no máximo 7% (**Entrada 7**).

Quando o biocatalisador imobilizado em Mont-K10 foi recoberto com gelatina, os resultados foram mais promissores. Com adição de trealose, o FP converteu 15% do substrato em 24h de reação, com ee > 99%, produzindo apenas o enantiômero (*R*)-(-)-2-cloro-1-feniletanol (**53**). Ao longo da reação, o ee manteve-se acima de 70%, e a conversão a produto foi de 20% após 7 dias de reação (**Entrada 11**). Os sistemas FP/K10/G contendo água (**Entrada 10**) ou sacarose (**Entrada 12**) levaram à formação do produto com boa seletividade

durante a reação, mas as conversões foram significativamente menores do que as obtidas com a adição de trealose.

Nestes experimentos, novamente pode-se constatar a importância da adição de açúcares para a proteção das células em meio orgânico, especialmente quando as células imobilizadas em montmorilonita são utilizadas. Quando adicionada ao sistema FP/K10/G, a trealose favoreceu a conversão a produto, bem como a enantiosseletividade da reação, comprovando mais uma vez, seu efeito protetor pronunciado (**Entrada 11**).

A fim de verificar a condição morfológica das células de FP empregadas na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**), estas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. A morfologia das células de *S. cerevisiae* antes e durante a redução da acetofenona (**52**) é apresentada na **Figura 57**.



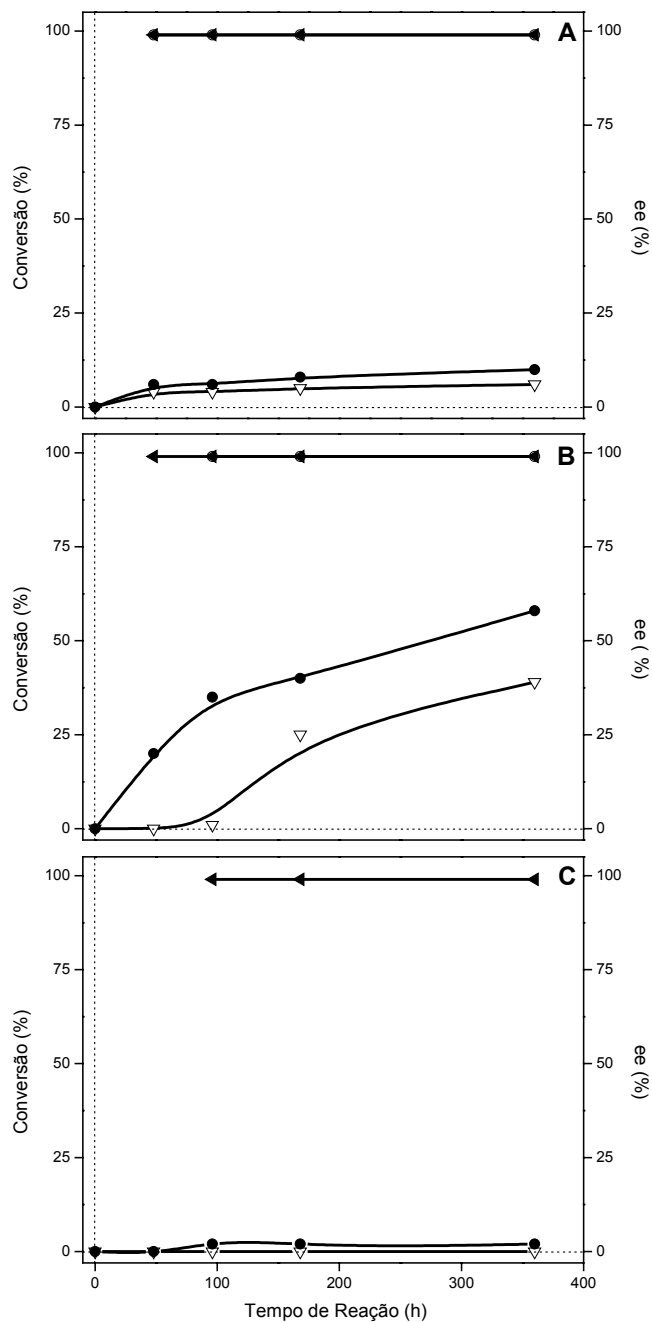
**Figura 57.** Microscopia eletrônica de varredura. (A) Fermento de pão hidratado (1000 x) e (B) 4000 x. (C) Montmorilonita K10 hidratada (4000 x) e (D) sistema FP/K10/G/T, após 48 h de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona em *n*-hexano (1000 x).



Verifica-se a diferença morfológica das células da levedura antes e após serem submetidas a reação de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona em *n*-hexano. As células intactas podem ser observadas nas **Figuras 57A** e **57B**, em diferentes ampliações, e na **Figura 57C** observa-se a montmorilonita K10 hidratada. Na **Figura 57D**, após 48 h de reação em *n*-hexano, as células apresentam uma morfologia distinta da observada inicialmente. Observa-se que estas foram danificadas pelas condições reacionais utilizadas, mesmo protegidas pela imobilização.

O FP imobilizado em montmorilonita K10 também foi utilizado na redução dos substratos carbonílicos **21**, **54** e **56**, com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10%. Reações contendo 2,4 mL de água também foram realizadas. As percentagens de conversão e os excessos enantioméricos dos respectivos produtos podem ser observados na **Figura 58**.

A imobilização do fermento de pão comercial em Mont-K10 não foi eficaz na redução da *p*-nitroacetofenona (**21**), como pode ser observado na **Figura 58A**. O biocatalisador reduziu apenas 10% da acetofenona em 15 dias de reação quando trealose foi adicionada. Utilizando as células livres na redução deste substrato, 41% do 1-(4-nitrofenil)etanol (**24**) foi formado em presença de trealose (vide **Tabela 4**). Entretanto, a seletividade das reações com o uso das células livres foi bastante baixa (ee entre 8 e 13%), enquanto que com o uso da levedura imobilizada, a reação foi enantiosseletiva (ee > 99%), e apenas o álcool (*S*)-**24** foi formado. A alta seletividade na redução de **21** com o uso das células de FP imobilizadas em Mont-K10 foi observada também na reação onde apenas água foi adicionada, indicando que o método de proteção que favoreceu a seletividade nesta reação foi a imobilização em K10.



**Figura 58.** Conversões a (S)-(-)-1-(4-nitrofenil)etanol (**24**) (A), (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**) (B) e 1-(4-metoxifenil)etanol (**59**) (C) em função do tempo de reação a 25°C, utilizando o fermento de pão comercial imobilizado em Mont-K10, e com adição de 2,4 mL de solução de trealose a 10% (●) ou 2,4 mL de água (▽), e os correspondentes excessos enantioméricos (%) das reações contendo solução de trealose a 10% (◀) ou água (○).

Na redução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**), com o FP imobilizado em Mont-K10 em presença de trealose obteve-se 58% do álcool (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**) após 15 dias de reação (**Figura 58B**). Apesar de não ter atingido os altos valores de conversão (92%) obtidos com o uso das células de FP livres em presença do açúcar (vide **Figura 56C**), as reações com o uso das células imobilizadas foram mais enantiosseletivas (ee > 99%), que com as células livres (ee < 80%). Estes resultados são concordantes com os observados por Milagre e *col.* na redução do benzoilacetato de etila (**41**), onde a maior seletividade foi obtida quando as células de *S. cerevisiae* foram imobilizadas em alginato de cálcio.<sup>[79]</sup>

A enantiosseletividade na redução de **54** também foi observada na reação com as células imobilizadas onde apenas água foi adicionada. Porém as conversões ao álcool quiral (S)-(-)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**) foram menores (máximo de 39%) que as obtidas em presença de solução de trealose a 10% (**Figura 58B**).

Assim como com as células livres (vide **Tabela 4**), o FP imobilizado em Mont-K10 não foi eficiente na redução da *p*-metoxiacetofenona (**56**). As conversões ao produto 1-(4-metoxifenil)etanol (**59**) foram bastante baixas (2%), mesmo na presença de trealose (**Figura 58C**). Novamente, os efeitos eletrônicos do grupo -OCH<sub>3</sub> sobre o carbono carbonílico<sup>[180]</sup> foram, provavelmente, o fator que dificultou a redução deste substrato.

Outro fator que explicaria o motivo das baixas conversões ao álcool **59** é a pequena quantidade de redutases específicas para este substrato presente nas células de *S. cerevisiae*. A fim de obter sistemas eficientes para a redução de aril-cetonas, Zhu e *col.* produziram 24 redutases recombinantes e as testaram na redução enantiosseletiva do substrato **56** em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,5. Apenas quatro das redutases produzidas foram consideradas eficientes na redução da acetofenona **56**, indicando a dificuldade em se obter um catalisador com bom desempenho para reduzir a *p*-metoxiacetofenona (**56**).<sup>[183]</sup>

#### 4.3.3. Reações em sistema bifásico

As reações de redução mediadas pelo fermento de pão em sistema bifásico (*n*-hexano/tampão ácido cítrico/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,5) foram realizadas utilizando os substratos carbonílicos **20**, **21**, **25**, **52**, **54**, **55** e **56**. As percentagens de conversão aos respectivos produtos **23**, **24**, **26**, **53**, **57**, **58** e **59**, bem como os correspondentes excessos enantioméricos podem ser observados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Percentagens de conversão e excessos enantioméricos (%) da redução dos substratos carbonílicos em sistema bifásico, mediada pelo fermento de pão comercial.

Substratos	%c (ee,%)			
	24h	48h	7d	15d
<i>m</i> -nitroacetofenona ( <b>20</b> )	-	-	2 (32)	5 (68)
<i>p</i> -nitroacetofenona ( <b>21</b> )	98 (93)	97(83)	-	-
acetoacetato de etila ( <b>25</b> )	76 (99)	100 (99)	100 (99)	100 (99)
$\alpha$ -cloroacetofenona ( <b>52</b> )	16 (99)	20 (99)	35 (99)	59 (99)
<i>p</i> -nitrobenzoilacetato de etila ( <b>54</b> )	64 (58)	66 (89)	63 (82)	57 (70)
<i>p</i> -hidroxiacetofenona ( <b>55</b> )	-	-	3 (99)	34 (99)
<i>p</i> -metoxiacetofenona ( <b>56</b> )	1 (99)	3 (90)	4 (82)	4 (89)

Observa-se na **Tabela 6** que, de modo geral e dependendo da estrutura do substrato, o sistema bifásico favoreceu boas conversões a produto. Na redução da *m*-nitroacetofenona (**20**), somente após 7 dias foi observada formação do álcool 1-(3-nitrofenil)etanol (**23**). As conversões observadas na redução deste substrato foram baixas, sendo de 5% após 15 dias de reação. A seletividade também não foi satisfatória. Em *n*-hexano e presença de trealose, o FP converteu 13% do substrato **20** em 7 dias de reação, formando apenas o enantiômero (S)-**23** (vide **Tabela 4**). Estes resultados indicam que para a redução enantiosseletiva deste substrato, o solvente orgânico com adição de trealose é o sistema biocatalítico mais indicado.

Ao contrário do observado na redução da *m*-nitroacetofenona (**20**) em sistema bifásico, o fermento de pão reduziu eficientemente a *p*-

nitroacetofenona (**21**), convertendo 98% do substrato em apenas 24 h de reação com boa seletividade (ee de 93%). Estes resultados são comparáveis aos obtidos por Yang e *col.* com as células de *Rhodotorula sp.* em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. A levedura converteu 100% de (**21**), com rendimento de 84%, ao álcool (S)- 1-(3-nitrofenil)etanol (**24**) (ee > 99%) em 3 h.<sup>[179]</sup>

Como pode ser observado na **Tabela 4**, em *n*-hexano e adição de trealose, as células de FP converteram apenas 41% do substrato **21** em produto, com excesso enantiomérico muito baixo (7%). Estes resultados indicam que para a redução da acetofenona **21**, o sistema bifásico é mais adequado.

A redução do acetoacetato de etila (**25**) pelo FP em sistema bifásico foi total em 48 h de reação, mantendo a alta enantiosseletividade (ee > 99%), e formando apenas o álcool (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**26**). Estes resultados confirmam a maior eficiência do fermento de pão comercial na redução do  $\beta$ -cetoéster **25** quando comparado às células da levedura L70, cultivada em laboratório. A cepa de panificação cultivada em glicerol-etanol reduziu 86% do substrato **25** em 7 dias de reação em sistema bifásico (vide **Tabela 3**). Entretanto, quando comparado aos resultados obtidos por Zanotto,<sup>[17,18]</sup> verifica-se que o meio orgânico com adição de água foi mais favorável ao FP, produzindo 100% do álcool quiral (S)-**26** após 48 h.

Em sistema bifásico, o fermento de pão reduziu enantiosseletivamente a  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**). Obteve-se com esse sistema biocatalítico uma conversão de 59% ao produto (R)-(-)-2-coro-1-feniletanol (**53**) com ee > 99% após 15 dias de reação. Esses são os maiores valores de conversão obtidos na redução de **52**, dentre todos os sistemas testados. Em *n*-hexano e com a presença de trealose, o FP converteu em 48 h de reação 45% da  $\alpha$ -cloroacetofenona em produto, com ee de 80%, em um estudo realizado anteriormente a 20°C.<sup>[17]</sup> Porém, ao longo do tempo de reação, a enantiosseletividade diminuiu para 60% de ee. Quando comparado aos

resultados obtidos a 30°C em *n*-hexano (vide **Tabela 5, Entradas 1, 2 e 3**), o sistema bifásico foi mais eficiente. Apenas 15% de **52** foi convertido ao produto **53** com ee de 55%. Estes resultados sugerem que o sistema bifásico diminuiu significativamente a toxicidade do substrato sobre as células, favorecendo a atuação das enzimas seletivas para o álcool (*R*)-**53**.

O *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) foi reduzido pelo FP, fornecendo 66% de conversão ao produto (**57**) com excesso enantiomérico de 89%, após 48 h de reação em sistema bifásico. Em *n*-hexano e com adição de trealose, o FP converteu 92% do substrato com ee de 80%. Porém, esses resultados foram observados somente após 15 dias de reação (**Figura 58C**). Ao utilizar o FP em sistema bifásico (*n*-hexano/tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 4,5) e com adição de glicose, Castelhana e *col.* obtiveram 100% de conversão na redução do β-cetoéster **54** em 16 h. Entretanto, o excesso enantiomérico foi bastante baixo (30%). Mudando o solvente orgânico por éter etílico no sistema bifásico, os autores observaram um aumento na enantiosseletividade (80%), porém, a conversão ao álcool **57** diminuiu para 70%.<sup>[180]</sup> Este resultado salienta também a influência do solvente orgânico na formação do sistema bifásico.

Na redução da *p*-hidroxiacetofenona (**55**), apenas após 7 dias de reação foi observada formação de produto, com conversão de apenas 3%. Esse comportamento também foi observado quando foi utilizado meio orgânico (vide **Tabela 4**). A reação foi enantiosseletiva em sistema bifásico, ao contrário do observado para a reação em *n*-hexano, e apenas um dos enantiômeros, o álcool (*S*)-**58** foi formado. Após 15 dias de reação, obteve-se o álcool com 34% de conversão, superando o valor obtido em meio orgânico, de 24% (vide **Tabela 4**). Para esse substrato o sistema bifásico aumentou o desempenho das células de FP, tornando a reação mais eficiente e enantiosseletiva (ee > 99%).

A configuração absoluta do produto de biorredução foi obtida a partir da medida polarimétrica da rotação óptica, após purificação parcial, sendo  $[\alpha]_D^{25} = -23,1$ . Comparando com o  $[\alpha]_D^{25}$  reportado na literatura para este composto, de

-44,8<sup>[184]</sup> confirmou-se o álcool (S)-(-)-1-(4-hidroxifenil)etanol como produto da biorredução da acetofenona **55**.

Em sistema bifásico, a levedura *S. cerevisiae*, assim como nos sistemas biocatalíticos testados anteriormente, não reduziu a *p*-metoxiacetofenona (**56**) eficientemente. Portanto, a rotação óptica, e conseqüentemente a configuração absoluta do álcool formado majoritariamente não foi determinada.

De modo geral, as acetofenonas substituídas **55** e **56** não foram reduzidas eficientemente pelas células de *S. cerevisiae*, quando se comparada com os resultados obtidos com o uso da raiz de cenoura (*Daucus carota*) como biocatalisador. Utilizando esta raiz em meio aquoso, Yadav e *col.* obtiveram em apenas 45 h de reação, 72% de conversão da *p*-metoxiacetofenona (**56**) ao correspondente álcool quiral (S)-**59** (ee de 94%). Resultados similares foram observados na redução da *p*-hidroxiacetofenona (**55**), obtendo-se 73% de conversão ao álcool (S)-**58** (ee de 91%) em 47h de reação.<sup>[185]</sup>

Portanto, pode-se verificar que o sistema bifásico foi bastante interessante na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**). Bons resultados também foram observados na redução da *p*-nitroacetofenona (**21**) e do acetoacetato de etila (**25**). Para estes substratos, a utilização do fermento de pão em sistema bifásico surge como uma estratégia promissora na obtenção dos respectivos álcoois quirais. Entretanto, a fim de aumentar as conversões e diminuir os tempos de reação, ainda são necessárias otimizações das condições reacionais.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados sobre a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalisador em reações de redução dos substratos carbonílicos **20**, **21**, **25**, **52**, **54**, **55** e **56** em diferentes sistemas biocatalíticos, as principais conclusões serão descritas, considerando o tipo de cepa utilizada. Em seguida, serão apresentadas as conclusões para cada um dos substratos, e as considerações finais.

### 5.1 *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A

- para a cepa W303-1A, observou-se que tanto o metabolismo (fermentativo ou respiratório) quanto o tipo de açúcar adicionado durante a reação influenciou significativamente nas conversões e na enantiosseletividade das biorreduções em solvente orgânico.

- a adição de trealose ao meio reacional contendo células livres ou imobilizadas promoveu um efeito positivo sobre o biocatalisador, permitindo a eficiente redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila (**25**) ao álcool (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila.

- a adição de sacarose ao meio reacional não é adequada, visto que as células consomem o dissacarídeo ao longo do tempo, e atuam pouco na proteção o biocatalisador frente ao solvente orgânico, promovendo inclusive em alguns casos, baixa seletividade.

- as células imobilizadas em montmorilonita K10 foram menos eficientes na conversão do acetoacetato de etila (**25**) do que as células livres. Conversões em torno de 20% foram observadas com o sistema imobilizado, enquanto que com as células livres obtiveram-se conversões da ordem de 50%.



- na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**), a cepa W303-1A não foi eficiente, mesmo com a adição de açúcares ao meio reacional, ou com a imobilização das células, o que se deve provavelmente à alta toxicidade do substrato.

- a cepa W303-1A cultivada em glicerol-etanol reduziu o *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) em meio orgânico em presença de trealose, convertendo 10% do substrato ao álcool quiral (S)-(-)-3-hidróxi-3-(4-nitrofenil) propanoato de etila (ee > 99%).

- não foi observada formação de produto na redução das acetofenonas substituídas quando a cepa W303-1A foi utilizada como biocatalisador após 15 dias.

## **5.2 *Saccharomyces cerevisiae* L70**

- utilizando a cepa industrial L70, observou-se resultados mais interessantes do ponto de vista sintético quando comparada à W303-1A. Mudanças no metabolismo destas células, bem como alterações do sistema biocatalítico influenciaram significativamente as reações de biorredução.

- com a cepa industrial L70 cultivada em glicerol-etanol, o acetoacetato de etila (**25**) foi reduzido ao álcool quiral (S)-(+)-hidroxibutanoato de etila (ee > 99%) em meio orgânico com adição de trealose, com conversões próximas às obtidas com a W303-1A (~50%).

- quando as células da cepa L70 cultivadas em lactato foram imobilizadas em Mont-K10, o substrato **25** foi totalmente reduzido em 96 h de reação com alta seletividade (ee > 99%), e em sistema bifásico, 86% do acetoacetato de etila (**25**) foi convertido em 7 dias pelas células cultivadas em glicerol-etanol. As células cultivadas em lactato não foram eficientes na redução deste substrato em sistema bifásico.

- a cepa L70, na forma livre com adição de trealose, bem como imobilizada em Mont-K10, não foi capaz de reduzir a  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) eficientemente em meio orgânico.

- o *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) foi reduzido com 18% de conversão e ee > 99% em sistema bifásico pela cepa L70 cultivada em lactato. Em reações com apenas *n*-hexano e adição de trealose, não foi observada formação de produto na redução deste  $\beta$ -cetoéster mesmo após 15 dias.

- a *p*-nitroacetofenona (**21**) foi reduzida enantiosseletivamente (ee > 99%) pelas células da cepa L70, com 21% de conversão em *n*-hexano na presença de trealose. Quando as células foram imobilizadas em Mont-K10, não foi observada formação de produto na redução deste substrato.

- não foi observada formação de produto na redução da *p*-hidroxiacetofenona (**55**) e da *p*-metoxiacetofenona (**56**) mediada pelas células da cepa L70 em *n*-hexano na presença de trealose.

### 5.3 Fermento de Pão Comercial

- o fermento de pão comercial foi o biocatalisador mais eficiente dentre os testados neste estudo. Todos os substratos carbonílicos foram reduzidos em meio orgânico, e variando os sistemas biocatalíticos, obteve-se biorreduções com alta seletividade.

- utilizando o fermento de pão comercial em sistema bifásico, o acetoacetato de etila (**25**) foi totalmente reduzido em 48 h com ee > 99%.

- na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) em *n*-hexano, o sistema FP/K10/G/T foi o mais eficiente, convertendo 20% do substrato em 7 dias de reação, com seletividade moderada (ee = 75%). Em sistema bifásico, o FP reduziu **52** eficientemente, com 59% de conversão ao álcool quiral (*R*)-(-)-1-pheniletanol e alta enantiosseletividade (ee > 99%).

- em *n*-hexano e adição de trealose, a quantidade de FP que forneceu as maiores conversões ao produto de redução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) foi 6 g, obtendo-se 92% de conversão com 80% de ee. Utilizando 2g do biocatalisador, a enantiosseletividade foi maior (ee > 99%), mas as conversões ao álcool (*S*)-**57** foram baixas.

- com o sistema FP/K10 em meio orgânico, o álcool quiral (*S*)-(-)-3-hidróxi-3-(4-nitrofenil)propanoato de etila (**57**) foi obtido com 58% de conversão e ee > 99%. Em sistema bifásico, o FP reduziu 66% de **54** com ee de 89% em 48 h.

- em *n*-hexano, 41% da *p*-nitroacetofenona (**21**) foi convertida a produto pelo FP, mas com baixa seletividade (ee = 7%). Quando o FP foi imobilizado em Mont-K10, 10% de **21** foi reduzido, mas com alta seletividade (ee > 99%). Em sistema bifásico, esta acetofenona foi reduzida eficientemente, formando o produto com 98% de conversão e ee = 93% em 24 h.

- na redução da *m*-nitroacetofenona (**20**), foi observado 17% de conversão e ee = 75% em *n*-hexano. Porém, apenas 5% de conversão foi observada em sistema bifásico.

- a *p*-hidroxiacetofenona (**55**) foi reduzida pelo FP em *n*-hexano com 24% de conversão a produto, mas com baixa seletividade (ee = 7%). Em sistema bifásico obteve-se 34% de conversão ao álcool quiral correspondente com ee = 99%.

- o fermento de pão comercial reduziu a *p*-metoxiacetofenona (**56**) em *n*-hexano com 10% de conversão e ee = 66%, e com 4% de conversão em sistema bifásico, onde a seletividade aumentou (ee = 89%).

#### 5.4 Redução de $\beta$ -cetoésteres

- na redução do acetoacetato de etila (**25**), o melhor sistema biocatalítico testado foi com o uso do fermento de pão comercial em sistema bifásico. O álcool quiral (S)-**26** foi obtido com ee > 99% em todas as reações estudadas, indicando a alta especificidade das redutases presentes nas células de *S. cerevisiae* para este substrato.

- o *p*-nitrobenzoilacetato de etila (**54**) foi reduzido enantiosseletivamente e com boas conversões a produto em meio orgânico pelo FP imobilizado em Mont-K10. Este sistema é bastante vantajoso visto que pode ser reutilizado.

#### 5.5 Redução de Acetofenonas

- na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona (**52**) foi possível obter um sistema biocatalítico bastante eficiente, utilizando o FP em sistema bifásico. O álcool quiral foi produzido com boas conversões e o ee manteve-se > 99% durante toda a reação.

- a *p*-nitroacetofenona (**21**) também foi reduzida enantiosseletivamente em sistema bifásico pelo fermento de pão comercial. Porém as conversões foram baixas.

- ao contrário do observado para o substrato **21**, o melhor sistema biocatalítico para a redução da *m*-nitroacetofenona (**20**) foi com o uso do FP em *n*-hexano, mas a enantiosseletividade foi moderada.

- utilizando o sistema bifásico, obteve-se alta enantiosseletividade na redução da *p*-hidroxiacetofenona (**55**) pelo FP, com conversões moderadas.

- nenhum sistema biocatalítico testado mostrou-se promissor na redução da *p*-metoxiacetofenona (**56**). Baixas conversões e pouca seletividade foram observadas.

## 5.6 Considerações Finais

A partir dos resultados apresentados, verifica-se a grande importância da otimização das condições reacionais de sistemas biocatalíticos. As reações de redução em *n*-hexano, mediadas por *S. cerevisiae* avaliadas neste estudo, mostraram-se fortemente influenciadas pelo tipo de cepa, metabolismo da levedura, adição de açúcares e método de imobilização.

Foram obtidos resultados bastante significativos quanto ao uso da trealose na proteção das células em meio orgânico, independente da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada. A presença deste dissacarídeo mostrou-se fundamental nas reações de biorredução testadas. O uso do sistema bifásico também contribuiu para o aumento das conversões das reações de redução, apresentando um excelente potencial para ser empregado como meio reacional na obtenção de compostos enantiomericamente puros.

De modo geral, obteve-se resultados bastante promissores na redução dos compostos carbonílicos estudados, com elevado excesso enantiomérico na formação de álcoois quirais de importante interesse sintético.

## 6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, propõe-se como continuidade a este trabalho, as seguintes etapas:

- Estudar o efeito da concentração dos substratos carbonílicos sobre os sistemas biocatalíticos.

- Imobilizar o biocatalisador em diferentes suportes, tais como crisotila, carvão ativo, polissacarídeos (amido, gelatina e caseinato de sódio) e polímeros sintéticos (PEO, PVA, etc.).

- Realizar estudos de reutilização dos sistemas contendo o biocatalisador imobilizado nos diferentes suportes.

- Avaliar a influência da adição de líquidos iônicos nos sistemas orgânico e bifásico, formando sistemas trifásicos.

- Aumentar a produção de enzimas de interesse através do uso de um promotor forte e de plasmídeos multicópia.

- Testar o sistema modificado geneticamente com outros substratos de interesse sintético, como por exemplo chalconas e derivados da xantoxilina, bem como a acetofenona e outras acetofenonas substituídas.

- Testar outras leveduras na redução dos substratos carbonílicos,

- Testar outros compostos na proteção das células, como dimetilssulfóxido e glicerol.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 FABER, K.; PATEL, R. Chemical biotechnology a happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 11, p. 517-519, 2000.
- 2 TEMBA, E. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F; DONNICI, C. L. Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. **Quím. Nova**, v. 26, n. 1, p. 112-122, 2003.
- 3 ISHIGE, T. H. K.; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 9, p. 174-180, 2005.
- 4 FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3.ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 402p.
- 5 DEMIRJIAN, D. S.; SHAH, P. C.; MORÍS-VARAS, F. Screening for novel enzymes In: FRESSNER, W. D. (Ed.). **Biocatalysis from Discovery to Application**. Berlin: Springer, 2000. p. 1-30.
- 6 CHARTRAIN, M.; GREASHAM, R.; MOORE, J.; REIDER, P.; ROBINSON, D.; BUCKLAND, B. Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 11, n. 4-6, p. 503-512, 2001.
- 7 DURÁN, N.; CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R. Biotransformations by microorganisms, organisms and enzymes: state of art. **Bol. Soc. Chil. Quím.**, v. 45, p. 109-121, 2000.
- 8 STEWART, J. D. Dehydrogenases and transaminases in asymmetric synthesis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 5, p. 120-129, 2001.
- 9 SEEBACH, D.; SUTTER, M. A.; WEBER, R. H. Bakers' yeast reduction of ethyl acetoacetate. In: ROBERTS, S. M. (Ed). **Biocatalysts for Fine Chemicals Synthesis**. Chicester: John Wiley & Sons, 1999.
- 10 ROBERTS, S. M.; TURNER, N. J.; WILLETTS, J.; TURNER, M. K. **Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Micro-organisms**. New York: Cambridge University Press, 1995.
- 11 CHAKRABORTY, A. A.; PHADKE, R. P.; CHAUDHARY, F. A.; SHETE, P. S.; RAO, B. S.; JASANI, K. D. Optimization of redox reactions employing whole cell biocatalysis. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21, p. 221-227, 2005.
- 12 FARDELONE, L. C.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Baker's yeast mediated asymmetric reduction of cinnamaldehyde derivatives. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 29, p. 41-45, 2004.

- 13 WIMMER, Z.; SAMAN, D.; ZAREVÚCKA, M.; WIMMEROVÁ, M. Synthesis of the respective *E*- and *Z*-isomers of ethyl 4-[(2-hydroxycyclohexyl) methylphenoxy-3-methyl-2-butenolate] using yeast whole cell bioreduction of the parent ketones. ***Tetrahedron: Asymmetry***, v. 16, p. 2810-2815, 2005.
- 14 BUQUE-TABOADA, E. M.; STRAATHOF, A. J. J.; HEIJNEN, J. J.; VAN DER WIELEN, L. A. M. Substrate inhibition and product degradation during the reduction of 4-oxoisophorone by *Saccharomyces cerevisiae*. ***Enz. Microb. Technol.*** v. 37, p. 625-633, 2005.
- 15 RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. ***Quím. Nova***, v. 24, n. 6, p. 893-897, 2001.
- 16 KAWAMOTO, T.; KANDA, T.; TANAKA, A. Preparation of an organic solvent-tolerant strain from baker's yeast. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, v. 55, p. 476-479, 2001.
- 17 ZANOTTO, S. P. **Utilização de Enzimas e Microrganismos para a Obtenção de Compostos Opticamente Ativos**. Florianópolis, 2003. 115 p. Tese (doutorado), Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 18 NASCIMENTO, M. G.; ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P, MORAN, P. J. S. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. ***Quím. Nova***, v. 25, n. 4, p. 567-571, 2002.
- 19 STEWART, J. D. Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. ***Curr. Opin. Biotechnol.***, v. 11, p. 363-368, 2000.
- 20 JOHANSON, T.; KATZ, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Strain engineering for stereoselective bioreduction of dicarbonyl compounds by yeast reductases. ***FEMS Yeast Res.***, v. 5, p. 513-525, 2005.
- 21 GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. ***Science***, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.
- 22 SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**. San Diego: Academic Press, 2000. 717p.
- 23 NELSON, D. L; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1152p.



- 24 LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. **Industrial Biotransformations**. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. 423p.
- 25 HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- 26 HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 89, p.17-34, 2003.
- 27 SOLOMONS, T. W. G. **Organic Chemistry**. 6.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 1218p.
- 28 PINHEIRO, S.; FERREIRA, V. F. Abordagens em química assimétrica. **Quím. Nova**, v. 21, n. 3, p. 312-318, 1998.
- 29 PILLI, R. A. Catálise assimétrica e o prêmio Nobel de química de 2001. Novos paradigmas e aplicações práticas. **Quím. Nova na Escola**, v. 14, p. 16-24, 2001.
- 30 KATZ, M.; FREJD, T.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Efficient anaerobic whole cell stereoselective bioreduction with recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 84, n. 5, p. 573-582, 2003.
- 31 SHIMIZU, S.; KATAOKA, M.; KITA, K. Chiral alcohol synthesis with yeast carbonyl reductases. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 5, p. 321-325, 1998.
- 32 CÁNOVAS, M.; IBORRA, J. L. Whole cell biocatalysts stabilization for L-carnitine production. **Biocatal. Biotransform.**, v. 23, n. 3-4, p. 149-158, 2005.
- 33 Disponível em <http://www.cancerbackup.org.uk/Treatments/Chemotherapy/Individualdrugs/Paclitaxel>. Acessada em 06/01/2007.
- 34 CAI, Y.; WU, Q.; XIAO, Y. M.; LV, DE-S.; LIN, X. F. Hydrolase-catalyzed Michael addition of imidazoles to acrylic monomers in organic medium **J. Biotechnol.**, v. 121, p. 330-337, 2006.
- 35 CARBALLEIRA, J. D.; ÁLVAREZ, E.; CAMPILLO, M.; PARDO, L.; SINISTERRA, J. V. *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018, a new whole cell biocatalyst for the stereoselective reduction of ketones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 951-962, 2004.
- 36 PINHEIRO, L.; MARSALIO, A. J. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 44, n. 2, p. 78-86, 2007.
- 37 GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

- 38 DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quím. Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- 39 KLIBANOV, A. M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Science**, v. 219, p.722-727, 1983.
- 40 DALLA-VECCHIA, R.; SEBRÃO, D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. **Process Biochem.**, v. 40, n. 8, p. 2677-2682, 2005.
- 41 SEBRÃO, D.; SILVA, V. D.; MOREIRA, M. A.; NASCIMENTO, M. G. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. *Aceito para publicação*. **Quím. Nova**, 2007.
- 42 TRAMPER, J. Applied biocatalysis: from product request to idea to product. In: CABRAL, J. M. S.; BEST, D.; BOROSS, L.; TRAMPER, J. (Eds). **Applied Biocatalysis**. Chur: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 1-46.
- 43 AMAO, Y.; WATANABE, T. Photochemical and enzymatic synthesis of methanol from formaldehyde with alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* and water-soluble zinc porphyrin. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 44, n. 1, p. 27-31, 2007.
- 44 HABRYCH, M.; RODRIGUEZ, S.; STEWART, J. D. Purification and identification of an *Escherichia coli*  $\beta$ -keto ester reductase as 2,5-diketo-D-glucanate reductase YqhE. **Biotechnol. Prog.**, v. 18, p. 257-261, 2002.
- 45 MUNRO, A. W.; TAYLOR, P.; WALKINSHAW, M. D. Structure of redox enzymes. **Cur. Opin. Biotechnol.**, v. 11, p. 369-376, 2000.
- 46 PEREIRA, R. S. The use of baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 18, n. 1, p. 25-83, 1998.
- 47 ADLERCREUTZ, P.; IBORRA, J. L.; SCHMIDT, E.; PEDERSEN, S. Applications. In: CABRAL, J. M. S.; BEST, D.; BOROSS, L.; TRAMPER, J. (Eds). **Appl. Biocatal.** Chur: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 109-156.
- 48 ZHANG, B.-L.; PIONNIER, S. Cofactor recycling mechanism in asymmetric biocatalytic reduction of carbonyl compounds mediated by yeast: which is the efficient electron donor? **Chem. Eur. J.**, v. 9, p. 3604-3610, 2003.
- 49 BAI, Y.; YANG, S.-T. Biotransformation of *R*-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid by D-lactate dehydrogenase and *Candida boidinii* cells containing formate dehydrogenase coimmobilized in a fibrous bed bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 92, n. 2, p. 137-146, 2005.

- 50 PEREIRA, R. S.; PAVÃO, F.; OLIVA, G. The use of molecular modelling in the understanding of configurational specificity (*R* or *S*) in asymmetric reactions catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* or isolated dehydrogenases. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 178, p. 27–31, 1998.
- 51 TEGONI, M.; BEGOTTI, S.; CABBILLAU, C. X-ray structure of two complexes of the Y143F flavocytochrome *b*<sub>2</sub> mutant crystallized in the presence of lactate or phenyl lactate. **Biochem.**, v. 34, p. 9840-9850, 1995.
- 52 MOWAT, C. G.; WEHENKEL, A.; GREEN, A. J.; WALKINSHAW, M. D.; REID, G. A.; CHAPMAN, S. K. Altered substrate specificity in flavocytochrome *b*<sub>2</sub>: structural insights into the mechanism of L-lactate dehydrogenation. **Biochem.**, v. 43, p. 9519-9526, 2004.
- 53 **Protein Data Bank**. Disponível em <http://www.pdb.org>. Acessada em 06/01/2007.
- 54 HOLLMANN, F.; SCHMID, A. Electrochemical Regeneration of oxidoreductases for cell-free biocatalytic redox reactions. **Biocatal. Biotransform.** v. 22, n. 2, p. 63-88, 2004.
- 55 BRZEZINSKA-RODAK, M.; ZYMANCZYK-DUDA, E.; KLIMEK-OCHAB, M.; KAFARSKI, P.; LEJCZAK, B. A simple and green procedure for the microbial effective synthesis of 1-phenylethyl alcohol in both enantiomeric forms. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, p. 511-513, 2006.
- 56 COMASSETO, J. V.; ASSIS, L. F.; ANDRADE, L. H.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M. Biotransformations of *ortho*-, *meta*- and *para*-aromatic nitrocompounds by strains of *Aspergillus terreus*: Reduction of ketones and deracemization of alcohols. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 39, p. 24-30, 2006.
- 57 XIE, Q.; WU, J.; XU, G.; YANG, L. Asymmetric Reduction of *o*-chloroacetophenone with *Candida pseudotropicalis* 104. **Biotechnol. Prog.**, v. 22, n. 5, p. 1301-1304, 2006.
- 58 XIAOJIAO, Y.; SHANJING, Y.; YIXIN, G. Asymmetric Reduction of acetophenone to  $\alpha$ -phenylethanol by *Candida valida* under compressed CO<sub>2</sub>. **Chin. J. Catal.**, v. 27, n. 7, p. 631-635, 2006.
- 59 TÜMERDEM, R.; TOPALA, G.; TURGUTB, Y. Asymmetric reduction of acetophenone using lithium aluminium hydride modified with some novel amino alcohol Schiff bases. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, p. 865–868, 2005.
- 60 CHELUCCI, G.; MURONI, D.; MANCA, I. Enantioselective reduction of acetophenone with PMHS and tin(II) complexes of chiral pyridine ligands. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, v. 225, p. 11–14, 2005.

- 61 COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIROS, S.; VASCONCELLOS, M. **Substâncias Carboniladas e Derivados**. 1. ed. Porto Alegre: Bookman, 2003, 411p.
- 62 PORRO, D.; BRAMBILLA, L.; RANZI, B. M.; MARTEGANI, E.; ALBERGHINA, L. Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for production of lactic acid. **Biotechnol. Prog.**, v. 11, p. 294-298, 1995.
- 63 VASCONCELOS, Y. Fermentação vantajosa. **Pesquisa FAPESP**, maio, n. 135, p. 67-69, 2007.
- 64 DUMAS, J. B. **Ann. Chim. Phys.**, v. 5, p. 3, 1874.
- 65 KAYSER, M. M.; MIHOVILOVIC, M. D.; KEARNS, J.; FEICHT, A.; STEWART, J. D. Baker's yeast-mediated reductions of  $\alpha$ -keto esters and an  $\alpha$ -keto- $\beta$ -lactam. Two routes to the paclitaxel side chain. **J. Org. Chem.**, v. 64, p. 6603-6608, 1999.
- 66 RODRÍGUEZ, S.; KAYSER, M. M.; STEWART, J. D. High stereoselective reagents for  $\beta$ -keto ester reductions by genetic engineering of baker's yeast. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 123, n. 8, p. 1547-1555, 2001.
- 67 MOLINARI, F.; GANDOLFI, R.; VILLA, R.; OCCHIATO, E. G. Lyophilised yeasts: easy-to-handle biocatalysts for stereoselective reduction of ketones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 3515-3520, 1999.
- 68 RODRÍGUEZ, S.; KAYSER, M. M.; STEWART, J. D. Improving the stereoselectivity of bakers' yeast reductions by genetic engineering. **Org. Lett.**, v. 1, n. 8, p. 1153-1155, 1999.
- 69 SHIEH, W.-R.; GOPALIN, A. S.; SIH, C. J. Stereochemical control of yeast reductions. 5. Characterization of the oxidoreductases involved in the reduction of  $\beta$ -keto esters. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 107, p. 2993-2994, 1985.
- 70 KAWAI, Y.; SAITOU, K.; HIDA, K.; DAO, D. H.; OHNO, A. Stereochemical control in microbial reduction. XXVIII. Asymmetric reduction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones with baker's yeast. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 69, p. 2633-2638, 1996.
- 71 JÖRG, G.; HÉMERY, T.; BERTAU, M. Effects of cell stress protectant glutathione on the whole-cell biotransformation of ethyl 2-chloro-acetoacetate with *Saccharomyces cerevisiae*. **Biocatal. Biotransform.**, v. 23, n. 1, p. 9-17, 2005.
- 72 EMA, T.; MORIYA, H.; KOFUKUDA, T.; ISHIDA, T.; MAEHARA, K.; UTAKA, M.; SAKAI, T. High enantioselectivity and broad substrate specificity of a carbonyl reductase: toward a versatile biocatalyst. **J. Org. Chem.**, v. 66, p. 8682-8684, 2001.

- 73 KALUZNA, I. A.; ANDREW, A. A.; BONILLA, M.; MARTZEN, M. R.; STEWART, J. D. Enantioselective reductions of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate by *Saccharomyces cerevisiae* dehydrogenases. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 17, p. 101-105, 2002.
- 74 HUGHES, T.; ROBINSON, M. D.; MITSAKAKIS, N.; JOHNSTON, M. The promise of functional genomics: completing the encyclopedia of a cell. **Cur. Opin. Microbiol.**, v. 7, p. 546-554, 2004.
- 75 RODRÍGUEZ, S.; SCHROEDER, K. T.; KAYSER, M. M.; STEWART, J. D. Asymmetric synthesis of  $\beta$ -hydroxy esters and  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy esters by recombinant *Escherichia coli* expressing enzymes from baker's yeast. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 2586-2587, 2000.
- 76 KALUZNA, I. A.; MATSUDA, T.; SEWELL, A. K.; STEWART, J. D. Systematic investigation of *Saccharomyces cerevisiae* enzymes catalyzing carbonil reductions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 126, p. 12827-12832, 2004.
- 77 EMA, T.; YAGASAKI, H.; OKITA, N.; NISHIKAWA, K.; KORENAGA, T.; SAKAI, T. Asymmetric reduction of a variety of ketones with a recombinant carbonyl reductase: identification of the gene encoding a versatile biocatalyst. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 6, p. 1075-1078, 2005.
- 78 ENGELKING, H.; PFALLER, R.; WICH, G.; WEUSTER-BOTZ, D. Reaction engineering studies on  $\beta$ -ketoester reductions with whole cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzym. Microb. Technol.**, v. 38, p. 536-544, 2006.
- 79 MILAGRE, C. D. F.; MILAGRE, H. M. S.; CASTELHANO, L. F.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Reduções microbiológicas de benzoilacetatos. **III Workshop de Biocatálise II Encontro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones**. São Paulo. Livro de Resumos, p. P68, 2006.
- 80 LODI, T.; ALBERTI, A.; GUIARD, B.; FERRERO, I. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DLD1 gene encoding the mitochondrial protein D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase by HAP1 and HAP2/3/4/5. **Mol. Gen. Genet.**, v. 262, p. 623-632, 1999.
- 81 STAMBUK, B. U. A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast  $\alpha$ -glucosidase. **Biochem. Educ.**, v. 27, p. 177-180, 1999.
- 82 LEI, F.; ROTBOLL, M.; JORGENSEN, S. B. A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biotechnol.**, v. 88, p. 205-221, 2001.
- 83 ALEXANDER, M. A.; JEFFRIES, T. W. Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. **Enzym. Microb. Technol.**, v. 12, p. 1-19, 1990.

- 84 KRUCKEBERG, A. L.; WALSH, M. C.; DAM, K. V. How do yeast cells sense glucose? **BioEssays**, v. 20, p. 972-976, 1998.
- 85 VAN HOEK, P.; VAN DIJKEN, J.; PRONK, J. T. Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 11, p. 4226-4233, 1998.
- 86 LODI, T.; FERRERO, I. Isolation of the DLD gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase. **Mol. Gen. Genet.**, v. 238, p. 315-324, 1993.
- 87 LODI, T.; FONTANESI, F.; GUIARD, B. Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast: the role of the lactate permease gen JEN1. **Mol. Genet. Genomics**, v. 266, p. 838-847, 2002.
- 88 PALLOTTA, M. L.; VALENTI, D.; IACOVINO, M.; PASSARELLA, S. Two separate pathways for D-lactate oxidation by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria which differ in energy production and carrier involvement. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1608, p. 104-113, 2004.
- 89 ANDRADE, R. P.; CASAL, M. Expression of the lactate permease gene JEN1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 32, p. 105-111, 2001.
- 90 SHERMAN, F. Getting started with yeast. **Methods Enzymol.**, v. 350, p. 3-41, 2002.
- 91 LEÓN, R.; FERNANDES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. Whole-cell biocatalysis in organic media. **Enzym. Microb. Technol.**, v. 23, p. 483-500, 1998.
- 92 DUMANSKI, P. G.; FLOREY, P.; KNETTIG, M.; SMALLRIDGE, A. J.; TREWHELLA, M. A. The baker's yeast-mediated reduction of conjugated methylene groups in an organic solvent. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 11, p. 905-908, 2001.
- 93 NORTH, M. Baker's yeast reduction of  $\beta$ -keto-esters in petrol. **Tetrahedron Lett.**, v. 37, n. 10, p. 1699-1702, 1996.
- 94 MEDSON, C.; SMALLRIDGE, A. J.; TREWHELLA, M. A. The stereoselective preparation of  $\beta$ -hydroxy esters using a yeast reduction in an organic solvent. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 7, p. 1049-1054, 1997.
- 95 ATHANASIOU, N.; SMALLRIDGE, A. J.; TREWHELLA, M. A. Baker's yeast reduction of  $\beta$ -keto esters and  $\beta$ -keto amides in an organic solvent system. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 11, p. 893-896, 2001.

- 96 LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 30, p. 81-87, 1987.
- 97 KLIBANOV, A. M.; Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, p. 241-246, 2001.
- 98 SCHMIDT, M.; STRENK, M. E.; BOYER, M. P.; FRITSCH, B. J. Importance of cell wall mannoproteins for septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 22, p. 715-723, 2005.
- 99 NAKAMURA, K.; KONDO, S.; KAWAI, Y.; OHNO, A. Reduction by baker's yeast in benzene. **Tetrahedron Lett.**, v. 32, n. 48, p. 7075-7078, 1991.
- 100 ROTTHAUS, O.; KRÜGER, D.; DEMUTH, M.; SCHAFFNER, K. Reductions of keto esters with baker's yeast in organic solvents - a comparison with the results in water. **Tetrahedron Lett.**, v. 53, n. 3, p. 935-938, 1997.
- 101 MOLINARI, F.; OCCHIATO, E. G.; ARAGOZZINI, F.; GUARNA, A. Microbial biotransformations in water/organic solvent system. Enantioselective reduction of aromatic  $\beta$ - and  $\gamma$ -nitroacetones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 9, p. 1389-1394, 1998.
- 102 QUN, J.; SHANJING, Y.; LEHE, M. Tolerance of immobilized baker's yeast in organic solvents. **Enzym. Microb. Technol.**, v. 30, p. 721-725, 2002.
- 103 KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. (eds). **Enzymatic Reactions in Organic Media**. 1. ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1996.
- 104 GRUNWALD, P. Experimental treatment of the laws of heterogeneous catalysis with immobilized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). **Biochem. Educ.**, v. 28, p. 96-99, 2000.
- 105 RAHMAN, M. B. A.; YUNUS, N. M. M.; HUSSEIN, M. Z.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Application of advanced materials as support for immobilisation of lipase from *Candida rugosa*. **Biocatal. Biotransform.**, v. 23, n. 3-4, p. 233-239, 2005.
- 106 KIM, M. I.; HAM, H. O.; Oh, S. D., PARK.; H. G.; CHANG, H. N.; CHOI, S. H. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. **J. Mol. Catal. B.: Enzym.**, v. 39, p. 62-68, 2006.
- 107 DRECHSLER, U.; FISCHER, N. O.; FRANKAMP, B. L.; ROTELLO, V. M. Highly efficient biocatalysts via covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on ethylene glycol-modified gold-silica nanocomposites. **Adv. Mat.**, v. 16, n. 3, p. 271-274, 2004.

- 108 HUANG, S. H.; LIAO, M. H.; CHEN, D. H.; Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, n. 3, p. 1095-1100, 2003.
- 109 CHIAPPE, C.; LEANDRI, E.; LUCCHESI, S.; PIERACINO, D.; HAMMOCK, B. D.; MORISSEAU, C. Biocatalysis in ionic liquids: the stereoconvergent hydrolysis of trans- $\beta$ -methylstyrene oxide catalyzed by soluble epoxide hydrolase. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 27, p. 243-248, 2004.
- 110 KIM, K.; SONG, B.; CHOI, M.; KIM, M. Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase. **Org. Lett.**, v. 3, n. 10, p. 1507-1509, 2001.
- 111 SOUZA, R. F.; PADILHA, J. C.; GONÇALVES, R. S.; DUPONT, J. Room temperature dialkylimidazolium ionic liquid-based fuel cells. **Electrochem. Comm.**, v. 5, n. 8, p. 728-731, 2003.
- 112 PILISSÃO, C.; NASCIMENTO, M. G. Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (*RS*)-methyl mandelate catalyzed by lipases. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, p. 428-433, 2006.
- 113 KRAGL, U.; ECKSTEIN, M.; KAFTZIK, N. Enzyme catalysis in ionic liquids. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, n. 6, p. 565-571, 2002.
- 114 SCHMIDT, B.; MEID, D.; KIESER, D. Safe and fast tetrazole formation in ionic liquids. **Tetrahedron**, v. 63, p. 492-496, 2007.
- 115 VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 9, n. 4, p. 113-148, 2000.
- 116 RAHMAN, M. B.; TAJUDIN, S. M.; HUSSEIN, M. Z.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. **Appl. Clay Sci.**, v. 29, p. 111– 116, 2005.
- 117 SHRIVER, D. F.; ATKINS, P.W. **Inorganic Chemistry**. 3.ed. Oxford: Oxford University Press, 1999. 763p.
- 118 **Clay-catalyzed RNA polymerization activity**. Disponível em <http://www.origins.rpi.edu/claycatalyzed.html>. Acessada em 15/01/2007.
- 119 MINISIN, B.; TSOBNANG, F. *Ab initio* comparative study of montmorillonite structural models. **Appl. Surf. Sci.**, v. 242, p. 21-28, 2005.
- 120 SORRILHA, A. E. P. M.; MARQUES, M.; JOEKES, I.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Reduction of phenylketones by immobilized baker's yeast. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 2, n. 2, p. 191-196, 1992.



- 121 MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; JOEKES, I.; BRENELLI, E. C. S.; LEITE, R. A. Reduction of  $\alpha$ -azidopropiophenone by immobilized baker's yeast. **Biocatal.**, v. 9, p. 321-328, 1994.
- 122 BARBIERI, C.; BOSSI, L.; D'ARRIGO, P.; FANTONI, G. P.; SERVI, S. Bioreduction of aromatic ketones: preparation of chiral benzyl alcohols in both enantiomeric forms. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 11, p. 415-421, 2001.
- 123 CARVALHO, M.; OKAMOTO, M. T.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Baker's yeast reduction of  $\alpha$ -haloacetophenones. **Tetrahedron**, v. 47, n. 12-13, p. 2073-2080, 1991.
- 124 MOREIRA, M. A.; BITENCOURT, T. B.; NASCIMENTO, M. G. Optimization of chemo-enzymatic epoxidation of cyclohexene mediated by lipases. **Synth. Commun.**, v. 5, p. 2107-2114, 2005.
- 125 HERNÁNDEZ, F. J.; DE LOS RIOS, A. P.; GÓMEZ, D.; RUBIO, M.; GLORIA VÍLLORA, G. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems. **Appl. Catal. B: Environ.**, v. 67, p. 121-126, 2006.
- 126 GRÖGER, H.; HUMMEL, W.; ROLLMANN, C.; CHAMOULEAU, F.; HÜSKEN, H.; WERNER, H.; WUNDERLICH, C.; ABOKITSE, K.; DRAUZ, K.; BUCHHOLZ, S. Preparative asymmetric reduction of ketones in a biphasic medium with an (S)-alcohol dehydrogenase under in situ-cofactor-recycling with a formate dehydrogenase. **Tetrahedron**, v. 60, p. 633-640, 2004.
- 127 CREMONESI, P.; CERREA, G.; SPORTOLETTI, G. Enzymatic dehydrogenation of steroids by beta-hydroxysteroid dehydrogenase in 2-phase system. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 159, p. 7-10, 1973.
- 128 HE, J.-Y.; SUN, Z.-H.; RUAN, W.-Q.; XU, Y. Biocatalytic synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxy-butanoate in an aqueous-organic solvent biphasic system using *Aureobasidium pullulans* CGMCC 1244. **Process Biochem.**, v. 41, p. 244-249, 2006.
- 129 CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, v. 223, n. 4637, p. 701-703, 1984.
- 130 SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 460-468, 1998.
- 131 SANO, F.; ASAKAWA, N.; INOUE, Y.; SAKURAI, M. A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. **Cryobiol.**, v. 39, p. 80-87, 1999.

- 132 HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 300-372, 2002.
- 133 MILLER, E. N.; INGRAM, L. O. Combined effect of betaine and trehalose on osmotic tolerance of *Escherichia coli* in mineral salts medium. **Biotechnol. Lett.**, v. 29, p. 213–217, 2007.
- 134 GANCEDO, C.; FLORES, C.-L. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p. 351-359, 2004.
- 135 SHIMA, J.; HINO, A.; YAMADA-IYO, C.; SUZUKI, Y.; NAKAJIMA, R.; WATANABE, H.; MORI, K.; TAKANO, H. Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker's yeast. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 7, p. 2841-2846, 1999.
- 136 FUJII, S.; OBUCHI, K.; IWAHASHI, H.; FUJII, T.; KOMATSU, Y. Saccharides that protect yeast against hydrostatic pressure stress correlated to the mean number of equatorial OH groups. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 60, n. 3, p. 476-478, 1996.
- 137 MAJARA, M., O.CONNOR-COX, E. S. C., AXCELL, B. C. Trehalose a stress protectant and stress indicator compound for yeast exposed to adverse conditions. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 54, n. 4, p. 221-227, 1996.
- 138 LODATO, P.; HUERGO, M. S.; BUERA, M. P. Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 52, p. 215-220, 1999.
- 139 SOTO, T.; FERNÁNDEZ, J.; VICENTE-SOLER, J.; CANSADO, J.; GACTO, M. Accumulation of trehalose by overexpression of *tps1*, coding for trehalose-6-phosphate synthase, causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 5, p. 2020-2024, 1999.
- 140 PAREDES, V.; FRANCO, A.; SOTO, T.; VICENTE-SOLER, J.; GACTO, M.; CANSADO, J. Different roles for the stress-activated protein kinase pathway in the regulation of trehalose metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. **Microbiol.**, v. 149, p. 1745-1752, 2003.
- 141 ANCHORDOQUY, T. J.; IZUTSU, K. I.; RANDOLPH, T. W.; CARPENTER, J.F. Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 390, n. 1, p. 35-41, 2001.
- 142 ZAYED, G.; ROOS, Y. H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochem.**, v. 39, p. 1081-1086, 2004.

- 143 CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CHAPMAN, D. Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 232, n. 1, p. 400-407, 1984.
- 144 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. New York.: John Wiley & Sons, 1997. 765p.
- 145 MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica**. 13.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. 1510p.
- 146 MARPLES, B. A. **Elementary Organic Stereochemistry and Conformational Analysis**. Vol. 34. London: The Royal Society of Chemistry, 1981. 82p.
- 147 BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 203-272.
- 148 AITKEN, R. A.; KILÉNYI, S. N. **Asymmetric Synthesis**. London: Blackie Academic & Professional, 1992. p. 1-63.
- 149 JENNINGS, W.; MITTFELDELT, E.; STREMPLE, P. **Analytical Gas Chromatography**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997, 389p.
- 150 NOVOTNY, M. Gas Chromatography. In: **Encyclopedia of Physical Science and Technology (Analytical Chemistry)**. 3. ed. London: Academic Press, 2001. p. 455-472.
- 151 MACHIDA, Y.; NISHI, H.; NAKAMURA, K.; NAKAI, H.; SATO, T. Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether. **J. Chromatogr. A**, v. 805, p. 85-92, 1998.
- 152 ETHUR, E. M. **Síntese e caracterização de  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas modificadas como fases estacionárias quirais em cromatografia gasosa capilar enantiosseletiva**. Santa Maria, 2004. 147 p. Tese (doutorado), Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria.
- 153 BOTOLLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: CANEVAROLO JR., S. V. (Coord.). **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004. p. 95-115.
- 154 JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 273-398.
- 155 Ficha técnica do kit comercial Glicose Enz Color (Bio Diagnóstica), 2000.

- 156 Ficha técnica do kit comercial Lactat PAP (Rolf Greiner Biochemica), 2002.
- 157 Ficha técnica do kit comercial Triglicérides PP (Gold Analisa Diagnóstica), 2002.
- 158 VOGEL, A. I. **A Text-Book of Practical Organic Chemistry**. 3. ed. London: Longman, 1974, 1188p.
- 159 MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes & Solventes**. 2. ed. São Paulo: Edgar Blücher Ltda, 1995. 629p.
- 160 OTTERSTED, K.; LARSSON, C.; BILL, R. M.; STAHLBERG, A.; BOLES, E.; HOHMANN, S.; GUSTAFSSON, L. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Rep.**, v. 5, n. 5, p. 1-6, 2004.
- 161 THOMSON, J. M.; GAUCHER, E. A.; BURGAN, M. F.; DE KEE, D. W.; LI, T.; ARIS, J. P.; BENNER, S. A. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. **Nat. Genet.**, v. 37, n. 6, p. 630-635, 2005.
- 162 CÁSSIO, F.; LEÃO, C.; UDEN, N. V. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 53, n. 3, p. 509-513, 1987.
- 163 NEVES, M. L. V. Glycerol transport in yeasts : physiological, molecular and phylogenetic approaches. Disponível em <http://hdl.handle.net/1822/856>. Acessada em 13/02/2007.
- 164 Catalog of Organic and Fine Chemicals, Acrós Organic, 2002/2003, Fisher Scientific, p. 1008.
- 165 DE RISI, J. L.; IYER, V. R.; BROWN, P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, v. 278, p. 680-686, 1997.
- 166 ELBEIN, A. D.; PAN, Y. T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiol.**, v. 13, p. 17R-27R, 2003.
- 167 CERRUTTI, P.; DE HUERGO, M. S.; GALVAGNO, M.; SCHEBOR, C.; BUERA, M. P. Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p. 575-580, 2000.
- 168 FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 25, p. 125-145, 2001.
- 169 TANIS, S. P.; EVANS, B. R.; NIEMAN, J. A.; PARKER, T. T.; TAYLOR, W. D.; HEASLEY, S. E.; HERRINTON, P. M.; PERRAULT, W. R.; HOHLER, R. A.;

DOLAK, L. A.; HESTERF, M. R.; SEESTG, E. P. Solvent and in situ catalyst preparation impacts upon Noyori reductions of aryl-chloromethyl ketones: application to syntheses of chiral 2-amino-1-aryl-ethanols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, p. 2154-2182, 2006.

170 Disponível em [http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha\\_completa1.asp?consulta=cloroacetofenona](http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=cloroacetofenona). Acessada em 16/01/2007.

171 MAZZOBRE, M. F.; ROMAN, M. V.; MOURELLE, A. F.; CORTI, H. R. Octanol–water partition coefficient of glucose, sucrose, and trehalose. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 1207-1211, 2005.

172 GASCH, A. P.; SPELLMAN, P. T.; KAO, C. M.; CARMEL-HAREL, O.; EISEN, M. B.; STORZ, G.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol. Biol. Cell.**, v. 11, p. 4241-4257, 2000.

173 MAGAZU, S.; MIGLIARDO, F.; RAMIREZ-CUESTA, A. J. Inelastic neutron scattering study on bioprotectant systems. **J. Royal Soc. Interface**, v. 2, p. 527-532, 2005.

174 KANDA, T.; MIYATA, N.; FUKUI, T.; KAWAMOTO, T.; TANAKA, A. Doubly entrapped baker's yeast survives during the long-term stereoselective reduction of ethyl 3-oxobutanoate in an organic solvent. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, p. 377-381, 1998.

175 SALVI, N. A.; CHATTOPADHYAY, S. Asymmetric reduction of 3-aryl-3-keto esters using *Rhizopus* species. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, p. 4918–4922, 2006.

176 HOMANN, M. J.; VAIL, R. B.; PREVITE, E.; TAMAREZ, M.; MORGAN, B.; DODDS, D. R.; ZAKS, A. Rapid identification of enantioselective ketone reductions using targeted microbial libraries. **Tetrahedron**, v. 60, n. 3, p. 787-797, 2004.

177 ANDRADE, L. H.; UTSUNOMIYA, R. S.; OMORI, A. T.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Edible catalysts for clean chemical reactions: bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 38, p. 84–90, 2006.

178 MA, Y.; LIU, H.; CHEN, L.; CUI, X.; ZHU, J.; DENG, J. Asymmetric transfer hydrogenation of prochiral ketones in aqueous media with new water-soluble chiral vicinal diamine as ligand. **Org. Lett.**, v. 5, n. 12, p. 2103-2106, 2003.

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

- 180 CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms**. 4. ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000, 822p.
- 181 CASTELHANO, L. F.; MILAGRE, C. D. F.; RODRIGUES, J. A. R. Biorredução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila por *Saccharomyces cerevisiae* em sistemas bifásicos e meio convencional. **28<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, 2005. T0859.
- 182 PADHI, S. K.; TITU, D.; PANDIAN, N. G.; CHADHA, A. Deracemisation of  $\beta$ -hydroxy esters using immobilised whole cells of *Candida parapsilosis* ATCC 7330: substrate specificity and mechanistic investigation. **Tetrahedron**, v. 62, n. 21, p. 5133-5140, 2006.
- 183 ZHU, D.; RIOS, B. E.; ROZZELL, J. D.; HUA, L. Evaluation of substituent effects on activity and enantioselectivity in the enzymatic reduction of aryl ketones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, p. 1541–1546, 2005.
- 184 WIESER, M.; FURUKAWA, H.; MORITA, H.; YOSHIDA, T.; NAGASAWA, T. Synthesis of (*S*)-1-(4-hydroxyphenyl)alcohols by eugenol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* E118. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 1627–1630, 1999.
- 185 YADAV, J. S.; NANDA, S.; REDDY, P. T.; RAO, A. B. Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root. **J. Org. Chem.**, v. 67, p. 3900-3903, 2002.

## 8 PRODUÇÃO ACADÊMICA (2003-2007)

### 8.1 Artigos

- ALBUQUERQUE, P. M.; WITT, M. A.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M.; G. Influence of sugars on enantioselective reduction using *Saccharomyces cerevisiae* in organic solvent. **Process Biochem.**, v. 42, p. 141-147, 2007.
- ALBUQUERQUE, P. M. ZANOTTO, S. P.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G. Optimization of reaction conditions on the reduction of  $\alpha$ -chloroacetophenone mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. **Em preparação.**

### 8.2. Trabalhos em Anais de Congressos

- ALBUQUERQUE, P. M.; WITT, M. A.; STAMBUK, Boris Ugarte; NASCIMENTO, Maria da Graça. Estudo comparativo do uso de açúcares para a proteção das células de *Saccharomyces cerevisiae* W3031A na redução do acetoacetato de etila. In: XII Encontro de Química da Região Sul, 2004, Guarapuava-PR. Anais do XII Encontro de Química da Região Sul, 2004. v. único.
- ALBUQUERQUE, P. M.; ZANOTTO, Sandra Patricia; WITT, M. A.; STAMBUK, Boris Ugarte; NASCIMENTO, Maria da Graça. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* comercial e da cepa W3031A na redução do acetoacetato de etila. In: Biotocatálisis y Biotransformaciones 2004 1er Encuentro Regional, 2004, Montevideo. Livro de Resumos, 2004. v. único.
- ALBUQUERQUE, P. M.; ZANOTTO, Sandra Patricia; STAMBUK, Boris Ugarte; NASCIMENTO, Maria da Graça. Estudos de proteção celular de *Saccharomyces cerevisiae* na redução de  $\alpha$ -cloroacetofenona em meio orgânico. In: XXVI Congreso Latinoamericano de Química e 27ª Reunión Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador. Livro de Resumos, 2004. v. único. p. QO131.
- ALBUQUERQUE, P. M.; WITT, M. A. ; ZANOTTO, Sandra Patricia; STAMBUK, Boris Ugarte; NASCIMENTO, Maria da Graça. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na biorredução do acetoacetato de etila em meio orgânico. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005, Recife-PE. Anais do XV Sinaferm, 2005. v. único.
- ALBUQUERQUE, P. M.; WITT, M. A.; ZANOTTO, Sandra Patricia; STAMBUK, Boris Ugarte; NASCIMENTO, Maria da Graça. Influence of the support on the reduction of ethyl acetoacetate by immobilized baker's

yeast. In: 11th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2005, Canela-RS. Abstracts Book, 2005. v. único.

- ALBUQUERQUE, P. M.; NASCIMENTO, Maria da Graça; PILISSAO, C.; STAMBUK, Boris Ugarte. Solvent Effects on the Enantioselectivity of Aminolysis and Reduction Biocatalytic Reactions. In: 8th Latin American Conference on Physiscal Organic Chemistry, 2005, Florianópolis-SC. Abstracts Book, 2005. v. único.
- ALBUQUERQUE, P. M.; WITT, M. A.; STAMBUK, Boris Ugarte; NASCIMENTO, Maria da Graça. Influência da adição de açúcares na redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila mediada por *Saccharomyces cerevisiae* W3031A. In: 28<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas. Livro de Resumos, 2005. v. Único.
- WITT, M. A.; ALBUQUERQUE, P. M.; ZANOTTO, Sandra Patricia; STAMBUK, Boris Ugarte; NASCIMENTO, Maria da Graça. Redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila mediada por fermento de pão imobilizado em diferentes suportes. In: XIII Encontro de Química da Região Sul, 2005, Florianópolis. Livro de Resumos, 2005. v. único.
- WITT, M. A.; ALBUQUERQUE, P. M.; FERREIRA, F. C. S.; STAMBUK, Boris Ugarte; NASCIMENTO, Maria da Graça. Imobilização do fermento de pão em suportes poliméricos para a redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila. In: III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo. Livro de Resumos, 2006. v. único.
- LISBOA, L.; ZANOTTO, Sandra Patricia; PEREIRA, J. O.; NASCIMENTO, Maria da Graça ; PILISSAO, C.; ALBUQUERQUE, P. M. Triagem de fungos amazônicos produtores de lipases. In: III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo. Livro de Resumos, 2006. v. único.
- FERREIRA, F. C. S.; ALBUQUERQUE, Patrícia M; STAMBUK, Boris U; NASCIMENTO, Maria da Graça. Biorredução de compostos carbonílicos em sistema bifásico. In: 14 SBQ SUL - XIV Encontro de Química da Região Sul, 2006, Erechim. 14 SBQSul - "Química na Sociedade: significados e implicações", 2006. v. único.
- DUTRA, V. S.; PIMENTEL, A.; ALBUQUERQUE, P. M.; NASCIMENTO, M.G. STAMBUK, B. U. Influência da quantidade de fermento de pão e da adição de trealose na redução do *p*-nitrobenzoilacetato de etila em *n*-hexano. Aceito para a 30<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.



